



Facultad de Veterinaria

Trabajo de  
Fin de Grado

**Efecto ascaricida de los  
hongos saprófitos  
*Clonostachys rosea* y  
*Trichoderma atrobrunneum***

Alba Díaz Valledor

**Grado en Veterinaria**

Año 2024

Modalidad del Trabajo: Experimental

# LICENCIA

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



## RESUMEN

Hoy en día, debido a la creciente dificultad para el control de *Ascaris suum* en explotaciones de porcino, junto con la pérdida económica que provoca por el decomiso de hígados y el menor crecimiento de los lechones, es necesaria la búsqueda de un método de control y prevención alternativo a los fármacos. Una opción esperanzadora podría encontrarse en el control biológico, mediante el uso de hongos saprófitos, que resolvería también el problema de las resistencias a las diferentes familias de fármacos antiparasitarios. En el presente estudio se analizó el efecto de los hongos como *Clonostachys rosea* y *Trichoderma atrobrunneum* sobre los huevos del nematodo. Para ello, se pusieron en contacto 19500 huevos del parásito y esporas de los hongos durante 45 días. Para comprobar la viabilidad y el funcionamiento del experimento durante el mismo, se realizaron cinco observaciones (días 0, 12, 25, 35 y 43 de exposición), valorando la morfología y el grado de desarrollo de los huevos. De este modo, se estableció que el hongo *C. rosea* realizaba un efecto ovistático durante este intervalo, que consistía en inhibir el desarrollo de los huevos, permaneciendo éstos viables pero sin embrionar. En cambio, *T. atrobrunneum* mostró un cierto efecto ovicida durante todo el experimento y efecto ovistático *reversible* hasta el día 35 de experimento, y a partir de ese momento, aumentó el porcentaje de huevos viables desarrollados. Estos resultados indican que la utilización de estos hongos saprófitos podría constituir una buena alternativa para la prevención de *A. suum* en explotaciones de porcino.

**Palabras clave:** *Ascaris suum*, control biológico, prevención, ovistático, ovicida.

## ABSTRACT

Nowadays the increasing constraint controlling *Ascaris Suum* in pig holdings, in addition to the economic loss incurred due to the livers forfeiture and a reduced piglet growth, requires the search of an alternative method of prevention and control for *Ascaris Suum* to drugs. A promising alternative may be found through biological control by the use of saprophytic fungi, which would also solve the problem of resistance shown by the different kinds of antiparastic agents. The present study was designed to analyze the effects of fungi, as *Clonostachys rosea* and *Trichoderma atrobrunneum*, on nematode eggs. For this matter, a parasite sample containing 19000 eggs was exposed to the fungus spores for a period of 45 days. In order to ascertain the viability as the effective implementation of this experiment during its course, five observations were made (days 0, 12, 25, 35 and 43 of exposure), assessing both morphology and degree of development of the eggs. The conducted study showed a different ovistatic effect from the fungus. On the one hand, fungus *C. rosea* had an ovistatic effect that carried out during the 45 days of the experiment, which consisted of inhibiting the development of the eggs, remaining its viability without embryonic development. On the other hand, *T. atrobrunneum* showed some ovicidal effect throughout the whole experiment, and a reversible ovistatic effect that lasted until day 35, after which the percentage of developed viable eggs was increased. The results show that the use of these saprophytic fungi could be a viable alternative for the prevention of *Ascaris Suum* in pig holdings.

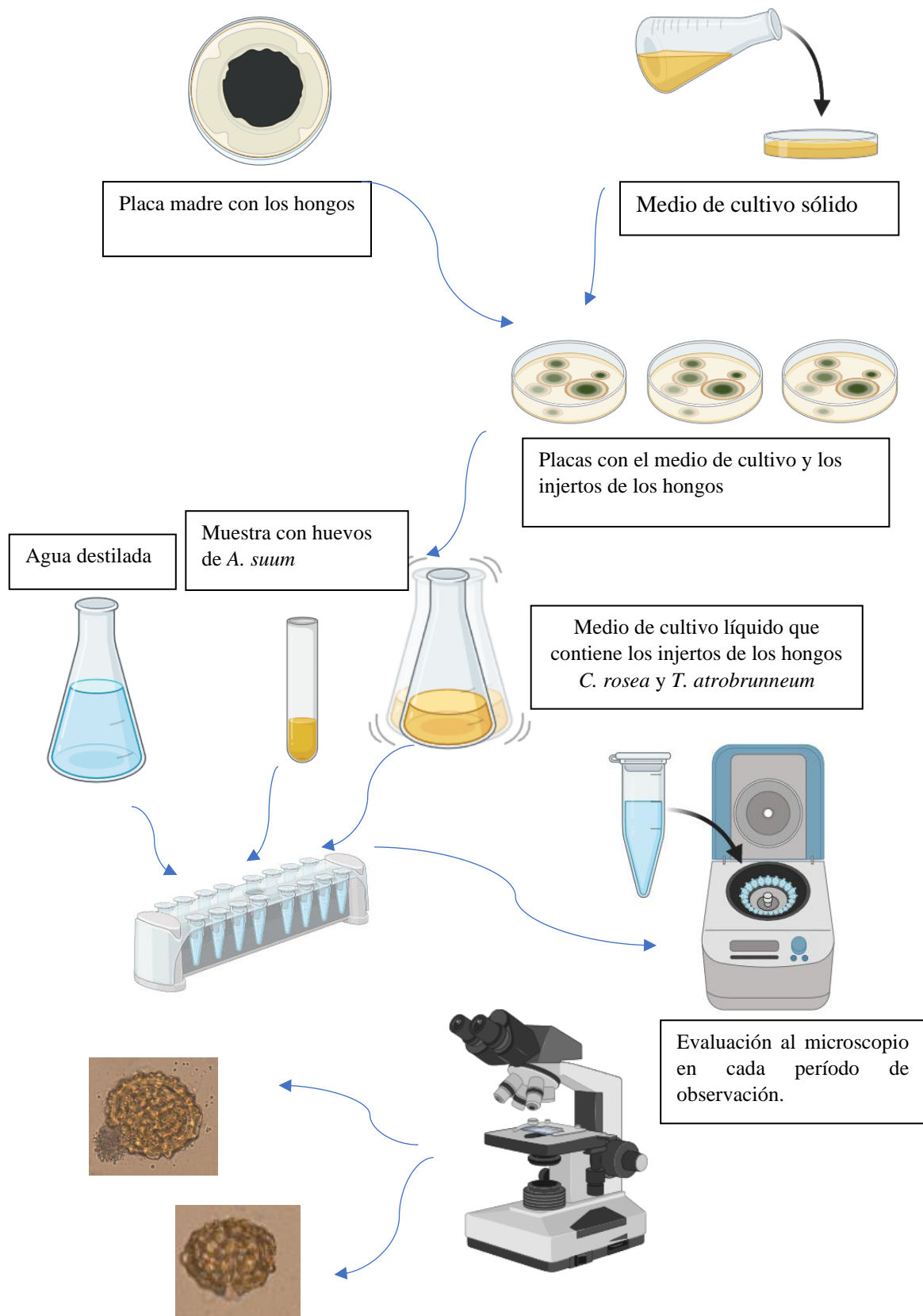
**Keywords:** *Ascaris suum*, biological control, prevention, ovistatic, ovicidal.

## RESUMO

Na actualidade, ante a crecente dificultade para controlar o *Ascaris suum* nas explotacións porcinas, unido ao prexuízo económico que provoca pola confiscación de fígados e o menor crecemento dos leitóns, é preciso buscar un método de control e prevención alternativo aos fármacos. Unha opción esperanzadora podería atoparse no control biolóxico, mediante o uso de fungos saprófitos, que tamén resolvería o problema da resistencia a diferentes familias de fármacos antiparasitarios. No presente estudo analizouse o efecto de fungos como *Clonostachys rosea* e *Trichoderma atrobrunneum* sobre os ovos de nematodos. Para iso puxéronse en contacto 19.500 ovos de parasitos e esporas de fungos durante 45 días. Para comprobar a viabilidade e o funcionamento do experimento durante o mesmo realizáronse cinco observacións (días 0, 12, 25, 35 e 43 de exposición), valorando a morfoloxía e o grao de desenvolvemento dos ovos. Deste xeito, estableceuse que o fungo *C. rosea* realizaba durante este intervalo un efecto ovistático, que consistía en inhibir o desenvolvemento dos ovos, deixándoos viables pero non embrionados. Por outra banda, *T. atrobrunneum* mostrou un certo efecto ovicida ao longo do experimento e un efecto ovistático reversible ata o día 35 do experimento, e a partir dese momento aumentou a porcentaxe de ovos viables desenvolvidos. Estes resultados indican que o uso destes fungos saprófitos podería constituir unha boa alternativa para a prevención de *A. suum* nas explotacións porcinas.

**Palabras chave:** *Ascaris suum*, control biolóxico, prevención, ovistático, ovicida.

# RESUMEN GRÁFICO



## ÍNDICE

|   |           |
|---|-----------|
| ABREVIATURAS .....  | 10        |
| <b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>   | <b>11</b> |
| <b>1.1. Principales parásitos en porcino. ....</b>  | <b>11</b> |
| <b>1.2. Control y prevención convencional de parásitos. ....</b>                              | <b>13</b> |
| <b>1.3. Control biológico. ....</b>   | <b>14</b> |
| <b>1.3.1. Hongos parasitoides en el control parasitario. ....</b>                             | <b>15</b> |
| <b>1.3.2. Mecanismos de acción de hongos parasitoides en el control parasitario. ....</b>     | <b>17</b> |
| <b>1.3.3. <i>Clonostachys rosea</i> .....</b>   | <b>18</b> |
| <b>1.3.4. <i>Trichoderma spp.</i>.....</b>  | <b>19</b> |
| <b>1.4. Ventajas e inconvenientes del empleo de hongos como antiparasitarios.....</b>         | <b>19</b> |
| <b>2. OBJETIVOS .....</b>   | <b>21</b> |
| <b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>   | <b>22</b> |
| <b>3.1. Hongos ovicidas <i>Clonostachys rosea</i> y <i>Trichoderma atrobrunneum</i>. ....</b> | <b>22</b> |
| <b>3.1.1. Cultivo de hongos en medio líquido.....</b>   | <b>23</b> |
| <b>3.2. Obtención, clasificación y concentración de huevos de <i>A. suum</i>.....</b>         | <b>23</b> |
| <b>3.2.1. Técnica de flotación en solución salina (McMaster). ....</b>                        | <b>24</b> |
| <b>3.3. Diseño experimental.....</b>  | <b>26</b> |
| <b>3.4. Evaluación del efecto de los hongos sobre los huevos de <i>A. suum</i>.....</b>       | <b>28</b> |
| <b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>   | <b>31</b> |
| <b>4.1. Evolución de los huevos de <i>A. suum</i>.....</b>                                    | <b>31</b> |
| <b>4.1.1. Grupo Testigo. ....</b>   | <b>31</b> |
| <b>4.1.2. Grupo expuesto a <i>C. rosea</i>. ....</b>  | <b>32</b> |
| <b>4.1.3. Grupo expuesto a <i>T. atrobrunneum</i>. ....</b>                                   | <b>32</b> |
| <b>4.1.4. Comparación entre los diferentes grupos. ....</b>                                   | <b>33</b> |
| <b>4.2. Porcentajes de variación de los huevos de <i>A. suum</i>.....</b>                     | <b>35</b> |
| <b>4.3 Interpretación de los resultados.....</b>  | <b>36</b> |
| <b>5. CONCLUSIONES .....</b>  | <b>38</b> |
| <b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>   | <b>39</b> |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Tabla 1.- Principales tratamientos antiparasitarios utilizados en ganado porcino.....</b>   | <b>14</b> |
| <b>Tabla 2.- Hongos parasiticidas testados frente a parásitos de diferentes especies animales.<br/>.....</b>   | <b>16</b> |
| <b>Tabla 3.- Diferentes estudios de los hongos <i>C. rosea</i> y <i>T. atrobrunneum</i> testados frente a<br/>parásitos de diferentes especies animales.....</b>   | <b>20</b> |
| <b>Tabla 4- Resultados de flotación y después de la concentración.....</b>   | <b>26</b> |
| <b>Tabla 5 - Porcentaje de variación sobre el valor de los huevos NV, VD y VND, en los grupos<br/>tratados con <i>T. atrobrunneum</i> o <i>C. Rosea</i> con respecto al valor de los mismos en el grupo<br/>testigo.....</b> | <b>35</b> |

## INDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1.- Ciclo biológico del nematodo <i>Ascaris suum</i> . .....   | 11 |
| Figura 2 - Los huevos de <i>A. suum</i> salen en las heces de los suidos sin embrionar.....   | 12 |
| Figura 3 - Hígado de suido con “manchas de leche”. .....  | 12 |
| Figura 4.- A) Material preparado para esterilizar en el autoclave. B) Recipiente con el hongo <i>T. atrobrunneum</i> . C) Recipiente con el hongo <i>C. rosea</i> . ..... | 23 |
| Figura 5 - Se recogieron heces de dos grupos de lechones mantenidos en la granja de la Fundación PRODEME en Monforte de Lemos (Lugo). .....                               | 24 |
| Figura 6 - Procedimiento de la técnica de flotación. ....   | 25 |
| Figura 7 - Esquema del diseño experimental. ....  | 27 |
| Figura 8 - Cronograma del experimento. ....   | 28 |
| Figura 9 - A la izquierda microscopio utilizado para realizar las observaciones. A la derecha, centrifugadora utilizada con cada tubo eppendorf del experimento.....      | 29 |
| Figura 10.- Huevos de <i>A. suum</i> en diferentes estadios de desarrollo. ....   | 30 |
| Figura 11.- Evolución de huevos de <i>A. suum</i> en el grupo Testigo. ....   | 31 |
| Figura 12.- Evolución de huevos de <i>A. suum</i> expuestos a <i>C. rosea</i> . ....  | 32 |
| Figura 13.- Evolución de huevos de <i>A. suum</i> expuestos a <i>T. atrobrunneum</i> . ....   | 33 |
| Figura 14.- Comparación del efecto de la exposición de huevos de <i>A. suum</i> a <i>C. rosea</i> y <i>T. atrobrunneum</i> . ....   | 35 |

**Todas las imágenes de esta memoria son originales y propiedad de la autora de este trabajo y del grupo COPAR.**

# ABREVIATURAS

*A. Suum* → *Ascaris suum*.

°C → grados centígrados.

*C. rosea* → *Clonostachys rosea*.

CWDEs → *Cell Wall Degrading Enzymes*

*D. flagrans* → *Duddingtonia flagrans*.

Esp → Esporas.

g → Gramos.

GMD → Ganancia media diaria.

hpg → Huevos por gramo de heces.

IC → Índice de conversión.

L → Litros

L1 → Larva 1.

L2 → Larva 2.

*M. circinelloides* → *Mucor circinelloides*.

mL → Mililitros.

NV → No viables.

P.i → Post infección.

Rpm → Revoluciones por minuto.

STH → *Soil-Transmitted Helminths*.

*T. atrobrunneum* → *Trichoderma atrobrunneum*.

μl → Microlitros.

μm → Micrómetros.

VD → Viables desarrollados.

VND → Viables no desarrollados

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Principales parásitos en porcino.

Los helmintos se describen entre los parásitos más comunes en todas las explotaciones porcinas del mundo, pero, por lo general, reciben menos atención que en otras especies, posiblemente porque no es frecuente que cursen con un cuadro clínico que provoque signos perceptibles por el ganadero (Roepstorff et al., 2011).

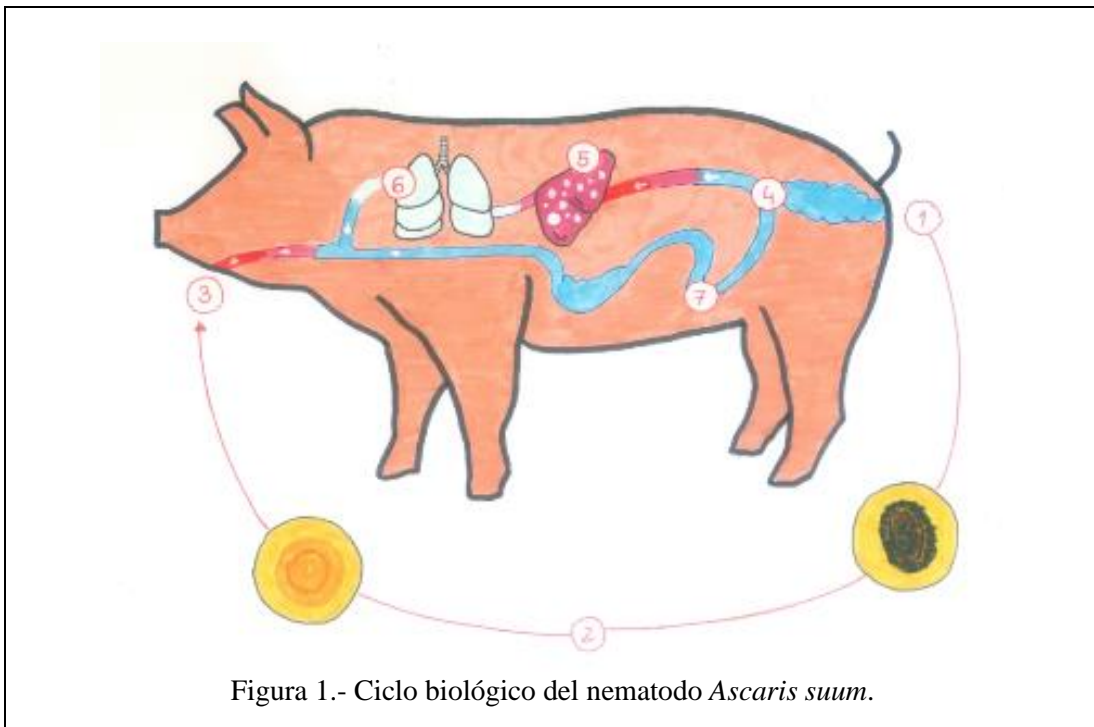


Figura 1.- Ciclo biológico del nematodo *Ascaris suum*.

El género *Ascaris* spp. pertenece al grupo de helmintos que se transmiten por el suelo. La especie encontrada en las explotaciones porcinas es *Ascaris suum*, nematodo de ciclo biológico directo, sin fases larvares de vida libre. El hospedador libera huevos con las heces al medio (suelo), donde se desarrollan las larvas 1 y 2 (L1 y L2). Los suidos se infectan al ingerir huevos con L2 que contaminan el suelo o que se encuentran adheridos a la piel de las progenitoras. En el interior del estómago o intestino delgado, las L2 eclosionan y penetran en la mucosa de ciego y colon y migran a través de la vena porta hasta el hígado (4º día pi) (Masure et al., 2013), donde provocan unas lesiones inflamatorias comúnmente conocidas como “manchas de leche”, que provocan el decomiso de dicha víscera (Dold & Holland, 2011). Después, a través de la vena cava caudal, se desplazan hasta los capilares pulmonares, donde permanecerán un tiempo hasta que los rompan para llegar a los alveolos. Esta migración provoca tos en el animal, que ayuda a las larvas a ascender por el árbol bronquial llegando hasta la faringe, donde las larvas serán deglutidas y

pasarán de nuevo al tracto digestivo (10-15 días pi). Una vez en el intestino delgado, maduran hasta adultos, donde las hembras, tras la cópula, eliminan los huevos que salen al medio con las heces (Cordero del Campillo & Rojo Vázquez, 2001; Bowman, 2022). El periodo de prepatencia o intervalo entre la infección y la aparición de huevos del nematodo en heces, dura entre 40- 60 días P.i dependiendo de la edad de los animales, y de si se trata de primoinfección o reinfección (Cordero del Campillo & Rojo Vazquez, 2001).



Figura 2 - Los huevos de *A. suum* salen en las heces de los suidos sin embrionar

Como se indicó previamente, *A. suum* se transmite por vía oro-fecal a través de huevos altamente resistentes a factores ambientales, lo que les permite mantenerse viables e infectantes en el suelo. En el caso de *A. suum* se ha demostrado que llegan a permanecer viables en el suelo durante 6 años (Roepstorff et al., 2011). Esta resistencia le viene conferida por su estructura, ya que en el huevo de *A. suum* se describen tres capas; la interna que es gruesa y transparente, constituida por una membrana vitelina interna de naturaleza lipídica e impermeable; la que se encuentra en el medio es una capa transparente y gruesa, y la más externa, que es una capa mamelonada y de color marrón (Soulsby, 1987).

El curso de la infección varía según la especie, y es importante tener en cuenta que *A. suum* provoca una respuesta inmunitaria que tiene como resultado la expulsión de la mayoría de las larvas a los 14-17 días pi en aquellos individuos que han sido expuestos previamente (Roepstorff et al., 2011). De este modo, la importancia de esta ascariosis radica



Figura 3 - Hígado de suido con "manchas de leche".

en la primoinfección, es decir en el riesgo de infección de los animales que comienzan su ciclo de engorde, ya que la reinfección en este caso no es importante porque los animales generan inmunidad y no se permite que la enfermedad siga su curso y se produzcan las "manchas de leche".

A pesar de su curso subclínico, se ha demostrado que este parásito ocasiona en los animales una disminución de la ganancia media diaria (GMD) y un aumento del índice de conversión (IC) (Vandekerckhove et al., 2019), aspecto que se relaciona con que las granjas que presentan un

número elevado de hígados decomisados muestran también un aumento del IC (Martínez-Pérez et al., 2017). Por estas razones, es necesario estudiarlas e intentar prevenirlas, pero, sobre todo, porque en zonas donde la higiene sea deficiente y haya una población elevada de cerdos parasitados, *A. suum* puede afectar también a personas y convertirse de este modo en zoonosis (Roepstorff et al., 2011).

La transmisión de *A. suum* y prevalencia de ascariosis entre las poblaciones de porcino depende de factores como sistemas de producción, clima, higiene, prácticas de manejo y tratamiento antihelmíntico (Dold & Holland, 2011; Bowman, 2022). Un factor importante a tener en cuenta en la parasitación por *A. suum*, es el **tipo de suelo en las explotaciones**, ya que las que presentan más del 50% de la superficie emparrillada tienen menor decomiso de hígados y el IC es menor (Martínez-Pérez et al., 2017). Este tipo de suelo disminuye la cantidad de heces en la superficie, reduciendo así la presión de infección, aunque se deben tener en cuenta otros factores como los protocolos de limpieza y desinfección. Otro factor a tener en cuenta es el sistema “todo dentro todo fuera”, el cual se asoció significativamente a una incidencia menor de *A. suum*, observando que las explotaciones que lo realizan tienen menor decomiso de hígados y los animales presentan menos tos.

En la actualidad, los sistemas de producción están cambiando, favoreciendo la transmisión de diferentes parásitos ya que la mayoría de las explotaciones tienen la posibilidad de que los cerdos salgan al exterior o que en los cubículos se encuentren varios animales. Además, se conoce la gran supervivencia y la infectividad de los huevos de *A. suum* en los pastos, que representan una amenaza para la cría de cerdos al aire libre.

Aparte de toda la problemática comentada anteriormente, la parasitación por *A. suum* interfiere en la pauta vacunal (Roepstorff et al., 2011; Vandekerckhove et al., 2019) así como la migración de las larvas por el pulmón facilita la infección con bacterias y virus, disminuyendo el bienestar animal y provocando grandes pérdidas económicas (Vandekerckhove et al., 2019).

## **1.2. Control y prevención convencional de parásitos.**

Para el control de los ascáridos existen distintas pautas de tratamiento con diferentes fármacos (Tabla 1). El fenbendazol, a dosis de 2,5mg / kg p.v., se utiliza como tratamiento de elección en las granjas intensivas de porcino. Se administra en el agua potable durante dos días en el periodo de acabado, y contribuyen a un aumento de la GMD y una reducción del porcentaje de hígados decomisados, además de aumentar la calidad de la canal al sacrificio (Lassen et al., 2017). Otras familias de fármacos empleadas son: Aminas (sales de piperacina), imidazotiazoles (levamisol) y lactonas macrocíclicas (ivermectina) (Cordero del Campillo & Rojo Vazquez, 2001; Urquhart

et al., 2001). Un problema que aumenta cada vez más es la disminución de su efecto y la resistencia a los antiparasitarios, por lo que, como ya se comentó, es necesaria la búsqueda de otras alternativas (Lassen et al., 2017).

| FÁRMACO              | DOSIS                              | EFEECTO         |
|----------------------|------------------------------------|-----------------|
| Tartrato de Pirantel | 22 mg /kg pienso un día            | Adulto          |
| Ivermectina          | 100 µg/kg/7 días                   | Larvas y adulto |
| levamisol            | 0.75 g/10 kg p.v. en pienso un día | Larvas y adulto |
| Flubendazol          | 30 mg/kg de pienso/5-10 días       | Larvas y adulto |
| Febantel             | 5-10 mg/kg de p.v. IM              | Larvas y adulto |
| Fenbendazol          | 5 mg/kg de pienso durante 7 días   | Larvas y adulto |
| Doramectina          | 300 µg /kg de p.v. IM              | Larvas y adulto |
| Oxibendazol          | 1.5mg /kg de pienso 7 días         | Larvas y adulto |

*Tabla 1.- Principales tratamientos antiparasitarios utilizados en ganado porcino.*

Ya se mencionó anteriormente que los huevos de *A. summ* tienen una elevada resistencia en el medio, lo que complica el control de la ascariosis, puesto que la mayoría de los fármacos no son ovicidas, y es preciso contar con prácticas de manejo adecuadas para la eliminación de huevos. Además, se ha comprobado que el etanol y metanol que contienen la mayoría de los desinfectantes comunes no son efectivos contra los huevos de *A. summ*, a diferencia de los que llevan povidona, que sí retrasan la maduración de los huevos o incluso llegan a inactivarlos (Oh et al., 2016). Por todo ello, entre las medidas a tomar se encuentran (Katakam et al., 2016):

- Limpiar y desinfectar parideras.
- Desparasitar animales antes de salir al pasto e intentar no introducir animales muy jóvenes en pastos muy contaminados.
- Contar con programas de rotación de pastos.
- Extremar las precauciones con el estiércol, aumentando el tiempo de compostaje. También se debe tener en cuenta el clima, ya que en otoño y verano los pastos se encontrarán con mayor número de huevos infectantes.

### **1.3. Control biológico.**

Se define como *el procedimiento ecológico mediante el cual, utilizando antagonistas naturales, se mantienen o disminuyen las poblaciones de plagas o parásitos hasta niveles no perjudiciales.* Se debe entender que este método tiene una función reguladora, buscando el control de las

poblaciones hasta un nivel subclínico, con el fin no de eliminar al organismo diana sino reducir sus efectos nocivos (Larsen, 1999).

A día de hoy y, debido al reciente crecimiento de la preocupación social sobre el posible daño que los fármacos antiparasitarios podrían provocar en los seres vivos y el medio ambiente, se buscan o se intentan descubrir medidas alternativas más ecológicas y más eficaces. Otro problema que va en aumento es la reciente aparición de las resistencias a los diferentes fármacos antiparasitarios debido a la mala utilización de los mismos y de protocolos incorrectos, ya que se trata de una manera generalizada, sin realizar un estudio pormenorizado de cada explotación, valorando qué fármaco utilizar o a qué grupo de animales tratar (Kornele et al., 2014; Lassen et al., 2017).

Como se ha ido mencionando, la resistencia y longevidad de los huevos crean desafíos para su control, especialmente en los sistemas de producción al aire libre. A esto se suma la creciente demanda de carne y lácteos de producción ecológica (Szewc et al., 2021). La limpieza y desinfección son la base del éxito de estas medidas. También existen otro tipo de medidas que se pueden aplicar de manera específica: el uso de genotipos más resistentes para la cría, la alimentación de los cerdos con carbohidratos fermentables para reducir la carga de nematodos e inactivar los huevos antes de que el material fecal llegue a los pastos. Dicha inactivación de los huevos podría hacerse con tratamientos térmicos ya que sobreviven mal a temperaturas superiores a 55°C, o el empleo de hongos que atacan dichos huevos (Roepstorff et al., 2011; Cortiñas et al., 2015; Lassen et al., 2017).

### **1.3.1. Hongos parasitocidas en el control parasitario.**

El uso de diferentes hongos para el tratamiento de las formas parasitarias, sobre todo helmintos, es una alternativa esperanzadora y que cada vez está más estudiada (Canhão-Dias et al., 2020) (Tabla 2). La forma de aplicación varía en función del hongo y la especie animal diana, pudiendo hacerse mediante pulverización del hongo en un medio líquido o por vía oral mezclado con pellets nutricionales (Hernández et al., 2017) o a través de gelatinas (Cortiñas et al., 2015; Salmo et al., 2024).

| ESPECIE ANIMAL         | HONGO                          | ESTADIO DIANA | REFERENCIA                    |
|------------------------|--------------------------------|---------------|-------------------------------|
| Ovina y bovina         | <i>Duddingtonia flagrans</i>   | Larvicida     | (Szewc et al., 2021).         |
| Canina                 | <i>Mucor circinelloides</i>    | Ovicida       | (Viña et al., 2020).          |
| Ovina                  | <i>Duddingtonia flagrans</i>   | Larvicida     | (Voinot et al., 2020)         |
| Equina, Bovina, Canina | <i>Pochonia chlamydosporia</i> | Ovicida       | (Araújo et al., 2021)         |
| Porcino                | <i>Pochonia chlamydosporia</i> | Ovicida       | (Araújo et al., 2008)         |
| Ungulados              | <i>Pochonia chlamydosporia</i> | Ovicida       | (Hernández et al., 2017)      |
| Ungulados              | <i>Mucor circinelloides</i>    | Ovicida       | (Hernández et al., 2017)      |
| Ungulados              | <i>Penicillium spp</i>         | Ovistático    | (Hernández et al., 2017)      |
| Ovino                  | <i>Duddingtonia flagrans</i>   | Larvicida     | (Ojeda-Robertos et al., 2008) |
| Equino                 | <i>Mucor circinelloides</i>    | Ovicida       | (Hernández et al., 2016)      |
| Bovino                 | <i>Mucor circinelloides</i>    | Ovicida       | (Arroyo et al., 2016)         |
| Equino                 | <i>Duddingtonia flagrans</i>   | Larvicida     | (Ferraz et al., 2020)         |

**Tabla 2.- Hongos parasiticidas testados frente a parásitos de diferentes especies animales.**

Entre las especies de hongos parasiticidas más conocidas se encuentran:

- *Duddingtonia flagrans* el cual se ha demostrado que tiene una eficacia elevada contra las larvas de las especies más importantes de los nematodos gastrointestinales. Su eficacia se ha visto alterada si se combina con otras especies de hongo, siendo más elevada cuando se combina con *Monacrosporium spp.* y *Pochonia chlamydosporia* (Szewc et al., 2021).
- *Mucor circinelloides* es un hongo saprofito filamentoso con acción contra diferentes huevos a los que se adhiere a su superficie y penetra en su interior alimentándose de su contenido. Se ha demostrado que se puede conseguir gran actividad ovicida y larvicida al cultivar *M. circinelloides* junto con *D. flagrans* (Arias et al., 2013; Voinot et al., 2021).
- *Pochonia chlamydosporia* ataca a los huevos de helmintos a través de estructuras especializadas que permiten su adhesión a la superficie del huevo y la penetración por acción mecánica y enzimática, además los metabolitos secundarios producidos por este hongo también se pueden utilizar como antihelmínticos (Araújo et al., 2021).
- *Metarhizium anisopliae* tiene actividad entomopatógena frente a diferentes insectos, uno de ellos la especie de escarabajo *Dendroctonus sp.*, que parasita los árboles en México. Este hongo interviene en el ciclo de vida del insecto consiguiendo así que deje de alimentarse (Maca-Medrano et al., 2023). También se ha utilizado frente a *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, que parasita al ganado en México ocasionándoles pérdidas económicas y disminución del bienestar (Alonso-Díaz et al., 2007).

### 1.3.2. Mecanismos de acción de hongos parasitoides en el control parasitario.

Los hongos ejercen su acción frente a larvas o huevos o mediante acciones físicas, y la producción de metabolitos secundarios, algunos de los cuales destacan por su actividad enzimática y por su capacidad de producir enzimas extracelulares (Araújo et al., 2021).

#### a) Actividad ovicida

Se denominan hongos *ovicidas* cuando son capaces de destruir los huevos o hacerlos no viables de forma irreversible, pero también pueden tener acción *ovistática*, deteniendo la evolución de los huevos (Hernández Malagón, 2019).

El efecto ovicida de algunos hongos incluye varias fases. Primero, el hongo **detecta** los huevos del parásito y estimula el desarrollo del micelio para entrar en contacto con la cubierta del huevo, que a su vez supone un estímulo para la producción de esporas y nuevas hifas. Seguidamente en el extremo de algunas hifas se produce un órgano, *appresorio*, con el que los hongos **se adhieren** a la superficie del huevo. Después se produce la **penetración** a través de una estructura denominada *haustorio*, de modo que la hifa alcanza el interior y continúa creciendo, destruyendo el contenido, incluyendo el embrión. La última fase, la cuarta, conocida como **fase de multiplicación** ocurre cuando los hongos ya han acabado todos los nutrientes en el interior del huevo, y vuelven al exterior para intentar colonizar otros huevos (Lýsek y Sterba, 1991; Blazkowska et al., 2014; Hernández Malagón, 2019).

La valoración del efecto posible sigue la siguiente graduación, basada en los estudios de Lýsek y Krajci (1987):

- Grado 1: el hongo no penetra en el huevo, pero se detiene el desarrollo embrionario o provoca deformaciones en las larvas. Se denomina también efecto *ovistático*, que puede ser reversible o irreversible (Hernández Malagón, 2019)..
- Grado 2: el hongo no penetra en el interior, pero el embrión y la cubierta presentan alteraciones morfológicas como resultado de la actividad enzimática.
- Grado 3: el hongo penetra en el interior del huevo con sus hifas y provoca alteraciones morfológicas en el embrión y en la cubierta debido a la colonización interna.

#### b) Actividad larvicida

Se cree que los hongos atraen a las larvas de los nematodos mediante la liberación de sustancias químicas y cuando están en contacto las inmovilizan con órganos especiales del micelio debido a

trampas, anillos constrictores y la participación de enzimas (Ahman et al., 2002). El efecto larvicida incluye varias fases comenzando con la **fase de reconocimiento** en la que los hongos detectan la cutícula de las larvas, seguidamente como las larvas tienen movilidad la **fase de adhesión** no es activa, sino que las larvas de los parásitos se van a encontrar con trampas y quedan inmovilizadas (Freiría Barreiro, 2020). A continuación, ocurre la **fase de penetración** de la cutícula en la que además participan enzimas o metabolitos secundarios secretados por el hongo (Yang et al., 2007). Por último, ocurre la **fase de asimilación** de los nutrientes originándose nuevas hifas. (Wang & Wang, 2017; Oliveira Barbosa Bitencourt et al., 2021).

### 1.3.3. *Clonostachys rosea*

*Clonostachys rosea*, antes llamada *Gliocladium roseum*, fue descrito por Bainier (1907) quien al descubrir que los datos de morfología, ecología y secuencias de ADN eran muy diferentes de otras especies de *Gliocladium* procedió a su reclasificación. Las cepas de *C. rosea* están ampliamente distribuidas por todo el mundo en todo tipo de plantas, generalmente en las raíces, aunque también se descubrió su presencia en insectos y nematodos.

El papel de *C. rosea* en el control biológico se observa en plantas, nematodos e insectos. Los mecanismos de acción que utiliza se centran en la liberación de enzimas que degradan la pared celular, conocidos en inglés como *Cell Wall Degrading Enzymes (CWDEs)*, la formación de metabolitos secundarios que actúan como antibióticos o como toxinas, y a la inducción de la resistencia vegetal.

Entre los principales CWDEs de *C. rosea* destaca la quitinasa, por su función en la rotura del enlace 1,4- $\beta$ -glucosídico de la quitina que forma parte de la pared celular, las proteasas que rompen los enlaces peptídicos para degradar la cutícula de los nematodos y las gluconasas que hidrolizan los  $\beta$ -glucosanos de la pared celular. Para realizar su función de aumentar la resistencia de la planta, activa enzimas o genes que actúan en su defensa (Sun et al., 2020).

En diferentes estudios se observó cómo la aplicación del hongo *C. rosea* sobre huevos de *A. suum* conllevaba una disminución de huevos infectantes al cabo de varias semanas después de rociar la finca con el hongo. Teniendo en cuenta estos datos, el control biológico con este hongo podría ser una alternativa adecuada frente a los antiparasitarios convencionales y los problemas de su uso (Viña et al., 2020).

#### **1.3.4. *Trichoderma spp.***

El género *Trichoderma* fue descrito por primera vez en 1794 pero hasta 2006 no se elaboró un criterio estable para su identificación. Puede encontrarse donde quiera que haya material vegetal, así como en las raíces de las plantas donde pueden conseguir resistencia sistémica contra diferentes patógenos.

Es un hongo con una gran capacidad de colonizar el medio, de producción de metabolitos secundarios, y gran actividad enzimática. Además, son capaces de adaptarse con facilidad a cualquier medio pudiendo sobrevivir a varios rangos de temperatura y humedad.

Para luchar contra los patógenos, *Trichoderma spp* cuenta con diferentes mecanismos de defensa como pueden ser: las enzimas líticas, las enzimas proteolíticas, la formación de metabolitos volátiles y metabolitos secundarios. (Schuster & Schmoll, 2010).

Este hongo se ha utilizado en el control biológico en diferentes parasitaciones por helmintos transmitidos por el suelo (*Soil-Transmitted Helminths* o STH), tanto en animales de producción como en animales salvajes, consiguiendo disminuir su prevalencia por lo que puede ser una alternativa interesante a los antiparasitarios convencionales (Hernández, 2018; Viña et al., 2020).

### **1.4. Ventajas e inconvenientes del empleo de hongos como antiparasitarios.**

Como se recoge en la Tabla 3, estos dos hongos, *C. rosea* y *T. atrobrunneum*, se han ido utilizando a lo largo del tiempo en diferentes estudios y demostrándose una gran eficacia frente a diferentes parásitos.

Como ya se comentó, el control y prevención convencional de la parasitosis producida por *A. suum* se realiza mediante fármacos antiparasitarios. Debido al aumento de la aparición de las resistencias, así como la preocupación por la contaminación del medio ambiente surge la necesidad de buscar otros métodos alternativos. También debemos tener en cuenta que, esta parasitosis, se transmite a través de la ingestión de los huevos infectivos que se desarrollan en el medio ambiente. Por lo que sería necesario utilizar métodos que disminuyan o eliminen los huevos expulsados al medio y no tanto erradicar la infección en los animales (Kornele et al., 2014; Lassen et al., 2017). Por lo tanto, el empleo de hongos para el control biológico tiene todas esas ventajas ya que es un método más ecológico, que se ha demostrado que afecta a las formas parasitarias aplicándolo en el medio.

Además, cuenta con la ventaja de que la ingestión de esporas por los animales no les genera daño alguno en la microbiota como se ha visto en estudios con pavos y gallinas ponedoras (Lozano et al., 2024) . En otro estudio, donde se les proporciona a yeguas pellets con esporas del hongo

*M. circinelloides* también se garantiza la inocuidad de los hongos ya que, durante el ensayo se monitorizó la actividad digestiva, reproductiva y la función respiratoria no mostrándose alteración alguna. (Hernández et al., 2016)

| ESPECIE ANIMAL  | HONGO                  | ESTADIO DIANA        | REFERENCIA                 |
|-----------------|------------------------|----------------------|----------------------------|
| Porcino y Lémur | <i>C.rosea</i>         | Ovicida - Ovistático | (Viña et al., 2020)        |
| Porcino y Lémur | <i>T. atrobrunneum</i> | Ovicida              | (Viña et al., 2020)        |
| Ovino y equino  | <i>C. rosea</i>        | Ovicida - Ovistático | (Hernández et al., 2017)   |
| Ovino y equino  | <i>T. atrobrunneum</i> | ovicida              | (Hernández et al., 2017)   |
| Canina          | <i>T. atrobrunneum</i> | Ovicida              | (Hernández et al., 2017)   |
| Ovino           | <i>C. rosea</i>        | Larvicida            | (Ahmed et al., 2013)       |
| Ovino           | <i>C. rosea</i>        | Larvicida            | (Canhão-Dias et al., 2020) |

**Tabla 3.- Diferentes estudios de los hongos *C. rosea* y *T. atrobrunneum* testados frente a parásitos de diferentes especies animales.**

La especie *C. rosea* se encuentra en todas las plantas generalmente en las raíces, pero, también en insectos y nematodos, lo que a la hora de su utilización favorece su obtención. Además de su uso para el control biológico, también se ha visto que funciona en la biodegradación de residuos plásticos, en la biotransformación de compuestos bioactivos y como fuente de bioenergía (Sun et al., 2020).

*T. atrobrunneum*, aunque se ha utilizado en diferentes estudios con animales como se ve en la Tabla 3, principalmente se utiliza para el control de parasitosis en las plantas ya que a parte de su efecto de control biológico también es promotor del crecimiento y puede llegar a proporcionar resistencia a las plantas frente a parásitos. Generalmente, este hongo lo encontramos en las plantas (Fanelli et al., 2018).

Aunque en los últimos años se ha prosperado en la utilización de los hongos como control biológico, todavía queda mucho por conocer en relación con sus mecanismos de acción, la forma de producción de material fúngico y en cantidades adecuadas, la forma de distribución de los hongos para que actúen en el suelo y la frecuencia de aplicación (Cortés-Sánchez & Mosqueda-Olivares, 2013).

## 2. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta los antecedentes descritos, en este trabajo se plantearon los siguientes **objetivos**:

- Determinar la actividad antagonista de los hongos *Clonostachys rosea* y *Trichoderma atrobrunneum* sobre huevos del nematodo gastrointestinal *Ascaris summ.*
- Establecer el grado de utilidad de los hongos *Clonostachys rosea* y *Trichoderma atrobrunneum* en la prevención de ascariosis en lechones.
- Diseñar un programa para el control sostenible de ascáridos en suidos en pastoreo.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Hongos ovidas *Clonostachys rosea* y *Trichoderma atrobrunneum*.

En este trabajo se utilizaron esporas de dos hongos filamentosos saprófitos, *Clonostachys rosea f. catenulata* (CECT21110) y *Trichoderma atrobrunneum* (CECT20999), aislados por el Grupo de Investigación COPAR (GI-2120; USC) a partir de muestras de heces de animales y de tierra de explotaciones agropecuarias. Una vez identificados, se depositaron en la Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, España).

Con objeto de disponer de suficientes cantidades de esporas de ambos hongos, se procedió a su cultivo en medio líquido. Para ello, inicialmente, hay que asegurarse de contar con placas madre para el mantenimiento del crecimiento continuo de los hongos, tanto de *C. rosea* como *T. atrobrunneum*. Para ello se necesita el siguiente material:

- Matraz Erlenmeyer 2L.
- Espátula.
- Estufa.
- Placas Petri.
- Agua destilada.
- Trigo.
- Insertos fúngicos de las placas madre.
- Guantes.
- Cabina de Flujo laminar.
- Autoclave.
- Caldo de pollo.
- Agar marino.

En un matraz Erlenmeyer de 2 L se añade 450 mL de Agua destilada, 50 mL de Caldo de pollo, 10 g de Trigo y 5 g de Agar marino. Esto se esteriliza con una espátula en autoclave a 121°C durante 21 min.

Una vez finalizado el proceso de esterilización, el medio de cultivo se llevó a una cabina de flujo laminar, se encendió un mechero Bunsen, y se vertieron aproximadamente 25 mL en placas Petri que se habían mantenido previamente bajo luz ultravioleta (UV) durante media hora para minimizar el grado de contaminación. Dichas placas Petri, deben estar colocadas cerca de la llama y se deben rellenar hasta la mitad con el medio de cultivo. A continuación, se cierra el gas y se deja la luz UV encendida esperando a que solidifique el medio.

Una vez solidificado el medio se procede a sembrar con injertos fúngicos procedentes de una placa madre de *C. rosea* y *Trichoderma*. Para ello, se sigue trabajando en la cabina de flujo laminar con el mechero encendido. Se coloca un injerto de la placa madre en el centro de la placa con ayuda de la espátula que esterilizamos a la vez que el medio.

Para finalizar se sellan las placas con Parafilm y se etiquetan con la especie de hongo, medio de cultivo y fecha de siembra. Estas placas se mantienen en estufas a una temperatura estable entre los 22°C y los 24°C.

### 3.1.1. Cultivo de hongos en medio líquido.

Se preparan 5 litros en un matraz erlenmeyer y para eso se utiliza agua destilada y 12,5 g de harina de trigo. Después de remover hasta conseguir una mezcla homogénea, se tapa el matraz con parafilm y se introduce en el autoclave. Después de esterilizar durante 16 min a 121°C, se mantiene a temperatura ambiente durante una hora para poder manipularlo con seguridad. A continuación, se reparte en recipientes de cristal y se añaden insertos de 5x5cm de los dos hongos con los que vamos a trabajar provenientes de una placa Petri previamente cultivada. Para finalizar se cierran bien y se identifican con el tipo de hongo y el medio de cultivo líquido y se mantienen entre 20 y 22°C para favorecer el crecimiento del hongo.

Una vez transcurridos 10 días se toma una alícuota del medio de 25 µl y se colocan en la cámara de Neubauer para contar el número de esporas a 10 aumentos para después multiplicarlo por 40 determinando así la concentración de esporas por mL. En este caso *C. rosea* presentaba una concentración de  $4,8 \times 10^7$  esp/mL y *T. atrobrunneum*  $5 \times 10^6$  esp/mL.

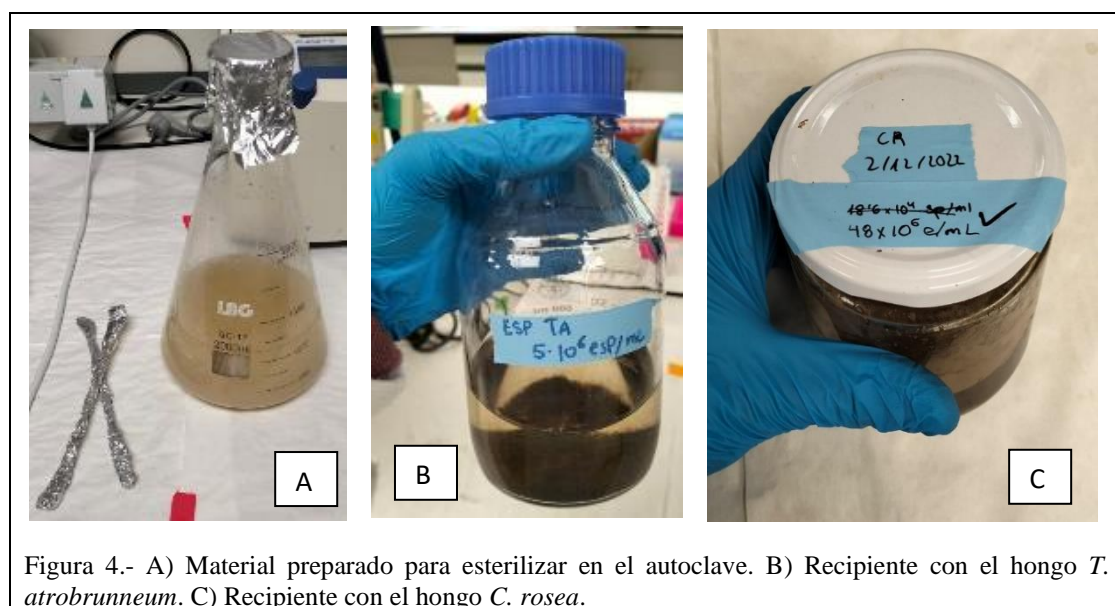


Figura 4.- A) Material preparado para esterilizar en el autoclave. B) Recipiente con el hongo *T. atrobrunneum*. C) Recipiente con el hongo *C. rosea*.

### 3.2. Obtención, clasificación y concentración de huevos de *A. suum*.

Las muestras se recogieron de dos cubiles en la granja de la Fundación PRODEME (Monforte de Lemos, Lugo), institución sin ánimo de lucro dedicada al cuidado de adultos con diversidad funcional. Los cubiles albergaban dos grupos de 12 lechones de 5 meses de edad (Fig. 5), y en cada uno se tomaron 4 muestras directamente del suelo, para un total de 8 muestras de

aproximadamente 100 g. Una vez en el laboratorio, se analizó cada una mediante la técnica de flotación en solución salina o McMaster, que es cualitativa y cuantitativa, para visualizar huevos u ooquistes. Las muestras se procesaron en las 24 horas siguientes para evitar el deterioro de posibles formaciones parasitarias.



*Figura 5 - Se recogieron heces de dos grupos de lechones mantenidos en la granja de la Fundación PRODEME en Monforte de Lemos (Lugo).*

### **3.2.1. Técnica de flotación en solución salina (McMaster).**

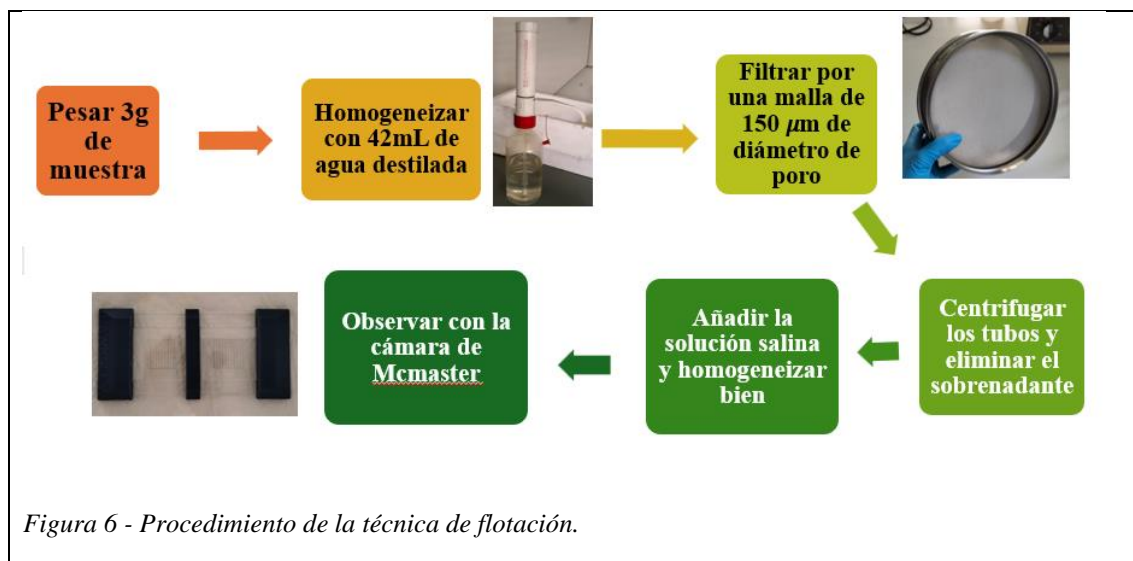
Esta técnica sirve para detectar ooquistes, huevos de cestodos y de nematodos gastrointestinales, porque flotan en soluciones de densidad elevada como la solución salina y la sacarosa.

Se siguió el siguiente protocolo (Figura 6):

- 1º- Se pesan 3g de muestra y se homogeniza en 42 mL de agua.
- 2º- Se filtra la emulsión con una malla de 150  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.
- 3º- Se rellenan 8 tubos con de 15 mL con el filtrado resultante.
- 4º- Se centrifugan los tubos a 2000rpm durante 5 min. Se elimina el sobrenadante y en este caso se le añade solución salina ( $\rho= 1,25 \text{ g/cm}^3$ ).
- 5º- Una vez añadido la solución salina se homogeniza bien y se rellena la cámara de McMaster y se observa al microscopio con el objetivo de 10x.
- 6º- Una vez realizado el recuento de huevos se multiplica el número de huevos contabilizados en las dos celdillas de la cámara McMaster por el factor de corrección 50.

Se observó que en las muestras había una gran cantidad de huevos de *A. suum* (>2000 huevos por gramo de heces, hpg), pero aun así, se decidió proceder a la concentración de la muestra para conseguir que hubiese mayor número de huevos por mL.

La concentración se realizó partiendo de una gran cantidad de heces (90 g), que se procesaron como se indicó previamente mediante la técnica de flotación donde se le añade solución salina a los tubos. Una vez llegado a este punto, se centrifugan los 8 tubos a 3000 rpm 5 min, después se retira con ayuda de una pipeta pasteur aproximadamente 2 ml desde la superficie trasasándolo a un tubo nuevo limpio con cuidado de no mezclar nuevamente, ya que los huevos se encuentran en la superficie.



El siguiente paso consistió en añadir agua destilada a cada tubo hasta que se formó un menisco convexo, homogeneizar, y centrifugar a 3000 rpm durante 5 min para eliminar los restos de solución salina. Descartar el sobrenadante hasta 1 mL y repetir el proceso de añadir agua y centrifugar dos veces más.

Como cuatro muestras pertenecían a un box y las otras cuatro muestras pertenecían al otro box, el siguiente paso fue juntar los pellets de 4 tubos pertenecientes al mismo box y luego centrifugar a 3000 rpm un poco más de 5 min. Se realizó lo mismo con los otros cuatro tubos pertenecientes al otro box.

A continuación, se comprobó la concentración y viabilidad de los huevos concentrados, mediante el análisis de alícuotas de 25  $\mu\text{L}$  de cada tubo, que se colocaron en un portaobjetos y cubriéndolo con un cubreobjetos se observaron al microscopio con el objetivo de 10x. Se determinó que en el primer tubo había una concentración de 14800 huevos de *A. suum* por mL con un porcentaje de huevos viables no desarrollados del 56% y en el segundo tubo existía una concentración de 4240 huevos de *A. suum* por mL con un porcentaje de huevos viables no desarrollados del 43%.

En primer lugar, se valoró la presencia de *A. suum* en las muestras y se observó que en las 4 muestras obtenidas en el BOX 1 había mayor presencia de huevos que en las muestras obtenidas del BOX 2 como se ve reflejado en la tabla 4.

Después de realizar la concentración se valoró el grado de viabilidad y desarrollo en el que se encontraban los huevos de *Ascaris suum*. La viabilidad fue muy elevada y el porcentaje de huevos no desarrollados fue mayor que el de desarrollados (tabla 4), por lo que se decidió que era una muestra adecuada para realizar el experimento y valorar el efecto de *C. rosea* y *T. atrobrunneum*.

|              | RESULTADOS FLOTACIÓN |                                     | RESULTADOS DESPUÉS DE LA CONCENTRACIÓN |     |
|--------------|----------------------|-------------------------------------|--|-----|
| <b>BOX 1</b> | 12275 hpg $\pm$ 5400 | <b>TUBO 1 (14800 huevos por mL)</b> | VND                                    | 56% |
|              |                      |                                     | VD                                     | 41% |
|              |                      |                                     | NV                                     | 4%  |
| <b>BOX 2</b> | 3247 hpg $\pm$ 1678  | <b>TUBO 2 (4240 huevos por mL)</b>  | VND                                    | 43% |
|              |                      |                                     | VD                                     | 24% |
|              |                      |                                     | NV                                     | 34% |

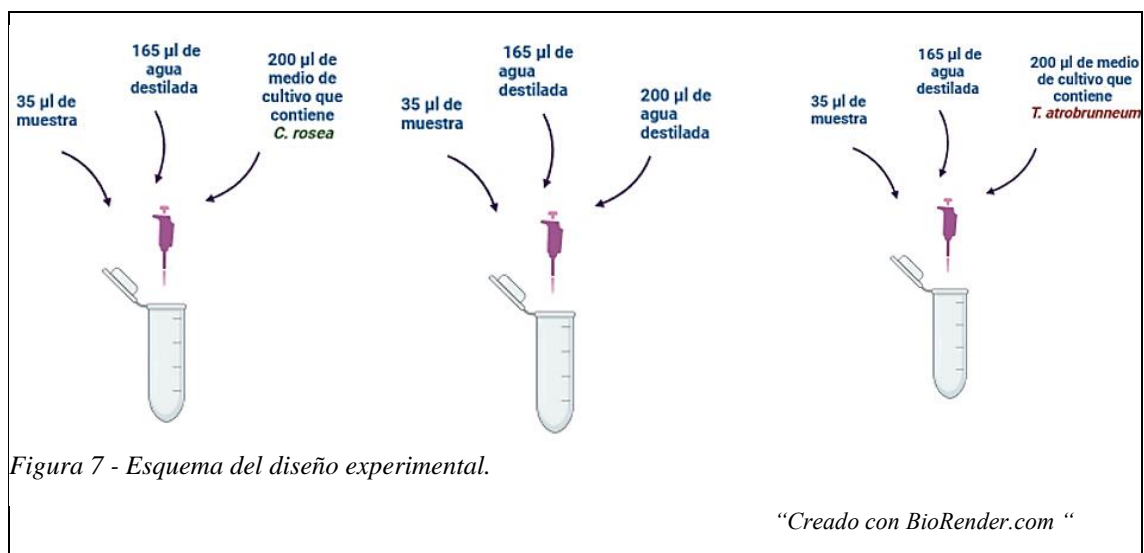
*Tabla 4- Resultados de flotación y después de la concentración.*

### 3.3. Diseño experimental.

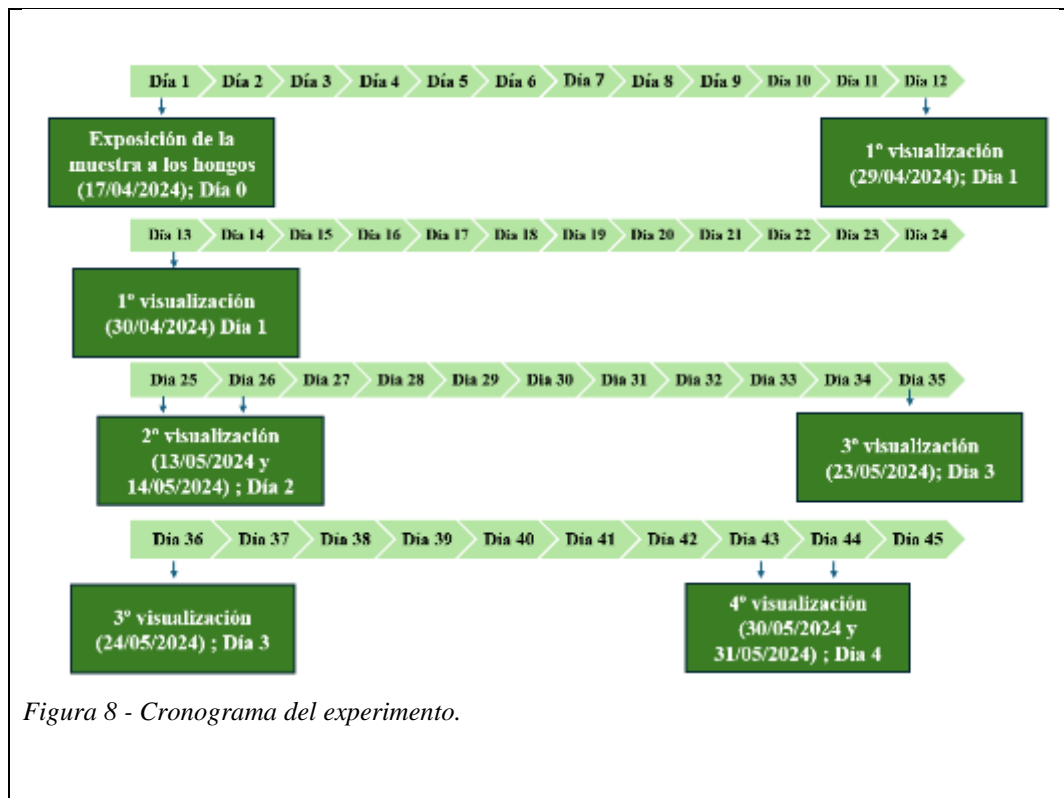
En este trabajo se intentó establecer la actividad antagonista de los hongos *C. rosea* y *T. atrobrunneum* sobre huevos del nematodo gastrointestinal *A. suum*. Este experimento duró 45 días y se realizaron 5 observaciones en las que se valoró bajo microscopio la evolución de los huevos y la acción de los hongos. En todo momento se mantuvieron grupos testigo, que contenían huevos sin ningún tratamiento, solamente agua destilada, para valorar si los cambios apreciados en los huevos eran producidos por los hongos o estaban producidos por factores externos como puede ser la luz, la temperatura, la mala manipulación... Para este ensayo, se necesitaron:

- Gradilla.
- 36 tubos eppendorf
- Huevos de *A. suum*.
- Agua destilada.
- Micropipetas y puntas estériles.
- Medios de cultivo con *C. rosea* y con *T. atrobrunneum*.

El día 17/04/2024, para comenzar el experimento (día 0), se mezclaron las soluciones de huevos del nematodo para concentrar todo el material en un tubo, consiguiendo un volumen total de 1,4 mL que contenían 19500 huevos de *A. suum* por mL. A continuación, se prepararon 12 tubos para el testigo, 12 tubos para *C. rosea* y 12 tubos para *Trichoderma* (figura 7). En los 36 tubos se añadieron 35  $\mu$ L de la solución con huevos de *A. suum* (en cada tubo se colocaron 682 huevos) y 165  $\mu$ L de agua destilada. Después, como se puede ver en la figura 7, en el grupo **testigo** se añadieron 200  $\mu$ L de agua destilada, y en el grupo *C. rosea* 200  $\mu$ L de medio con  $4,8 \times 10^7$  esporas del hongo/mL, agitando el recipiente levemente, al igual que en el grupo *Trichoderma*, añadiéndose 200  $\mu$ L de medio con  $5 \times 10^6$  esporas del hongo/mL, agitando levemente el recipiente. Para finalizar, se dejaron en reposo a temperatura ambiente y con luz natural los 45 días de duración del experimento.



Se realizaron cinco observaciones (figura 8) durante el experimento. La primera de ellas se realizó justo antes de añadir las esporas a los huevos de *A. suum*, el 17 de abril (día 0), la segunda a los 12 días, el 29 de abril; la tercera a los 25 días, el 13 de mayo; la cuarta a los 35 días, el 23 de mayo, y la quinta a los 43 días, el 30 de mayo. La razón de este calendario obedeció a la necesidad de coordinar esta parte del trabajo con la realización de las Estancias no clínicas en Africor-Lugo.



### 3.4. Evaluación del efecto de los hongos sobre los huevos de *A. suum*.

En cada una de las observaciones se valoraba el porcentaje de huevos **no viables** y **viables** de dos tubos testigo, dos tubos con *C. rosea* y otros dos con *T. atrobrunneum*.

El procedimiento consiste en que cada tubo eppendorf se centrifuga 20 segundos y seguidamente se recoge una alícuota de 25  $\mu$ l del sedimento y se coloca en un portaobjetos cubierto con un cubreobjetos de vidrio y se valora en el microscopio óptico Leica DM2500 a 10 y 20 aumentos lo que conlleva 15- 20 min por alícuota. En algunas ocasiones, es necesario emplear más volumen hasta contar mínimo 100 huevos, de manera que era necesario tomar más de una alícuota por tubo.

Los huevos de *A. suum* fueron clasificados en función de su grado de desarrollo y de viabilidad, dividiéndose en **no viables** y **viables**, que a su vez se dividieron en dos subgrupos, **viables no desarrollados** y **viables desarrollados** basándose en la presencia de desarrollo (división celular, formación de larva) en su interior.



Esta clasificación se basó en la morfología de los huevos observados a 10x y 20x. Valorando el estado interior del huevo se determinaba el grado de desarrollo, pero el grado de viabilidad se juzgaba según los cambios morfológicos de la pared o su contenido (Johnson et al., 1998), de modo que, un huevo se consideró **no viable** cuando las estructuras apenas estaban marcadas, la membrana se presentaba rota o con pérdida de continuidad, el citoplasma estuviese vacuolizado y que hubiese una total ausencia de respuesta de la larva a la estimulación de la luz del microscopio (Cazapal-Monteiro et al., 2015; Teixeira Alves, 2016) (Figura 10).




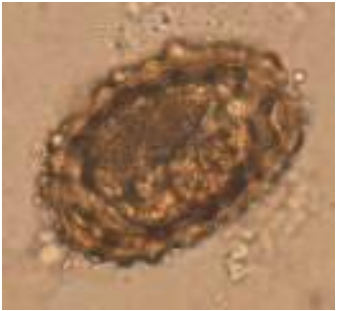
Para facilitar y completar la evaluación del efecto de la exposición a hongos filamentosos, se tuvo en consideración determinar los porcentajes de variación de los diferentes estadios identificados (huevos no viables, **NV**; huevos viables no desarrollados, **VND**; huevos viables desarrollados, **VD**) en los grupos tratados, en relación con el Testigo, aplicándose las fórmulas siguientes:

$$\% \text{ Variación NV} = \frac{\% \text{NV}_{\text{Hongo}} - \% \text{NV}_{\text{Testigo}}}{\% \text{NV}_{\text{Hongo}}} \times 100$$

$$\% \text{ Variación VND} = \frac{\% \text{VND}_{\text{Hongo}} - \% \text{VND}_{\text{Testigo}}}{\% \text{VND}_{\text{Hongo}}} \times 100$$

$$\% \text{ Variación VD} = \frac{\% \text{VD}_{\text{Testigo}} - \% \text{VD}_{\text{Hongo}}}{\% \text{VD}_{\text{Testigo}}} \times 100$$

De este modo, se interpreta que cuanto más elevados sean estos porcentajes de variación, mayor actividad antagonista frente a los huevos de *A. suum*.

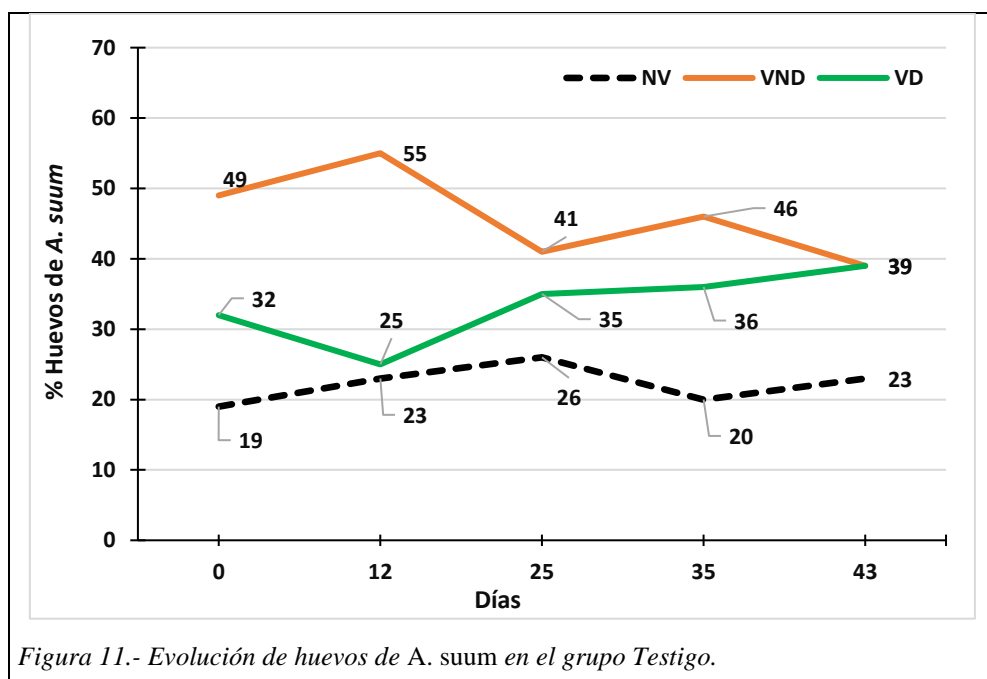
|   |   |
|---|---|
|    | <p><b>Huevo no viable (NV)</b> de <i>A. suum</i>, en el que puede observarse la ruptura de la cubierta externa con pérdida del embrión (20x).</p> |
|   | <p><b>Huevo viable no desarrollado (VND)</b>, con cubierta intacta e interior sin desarrollo celular ni formación de larva (20x).</p>             |
|  | <p><b>Huevo viable desarrollado (VD)</b>, en el que se percibe la cubierta intacta, con división celular del embrión (20x).</p>                   |
|  | <p><b>Huevo viable desarrollado (VD)</b>, en el que se percibe la cubierta intacta, con larva 1 en interior (20x).</p>                            |
| <p>Figura 10.- Huevos de <i>A. suum</i> en diferentes estadios de desarrollo.</p>   |   |

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Evolución de los huevos de *A. suum*.

#### 4.1.1. Grupo Testigo.

Como se puede observar en la Figura 11, en el transcurso de las semanas disminuyó el porcentaje de huevos viables no desarrollados (VND) y aumentó el de viables en desarrollo (VD), lo que denota que en los 45 días analizados el ciclo transcurrió de forma completamente normal. Cabe destacar que los huevos no viables (NV) alcanzaron unos valores más o menos estables durante todo el experimento, que se situaron en torno a 19-23%. Asimismo, también resulta un tanto sorprendente el hecho de que al final del estudio, el porcentaje de VD fuese del 39%, que indica que en las condiciones en las que se realizó este ensayo, menos de la mitad de los huevos de *A. suum* llegan a alcanzar la fase de desarrollo. Es importante destacar que no se observaron huevos infectantes (con larva L2 en el interior), y tan sólo en algunos casos se pudo vislumbrar la presencia de L1 (Figura 10).

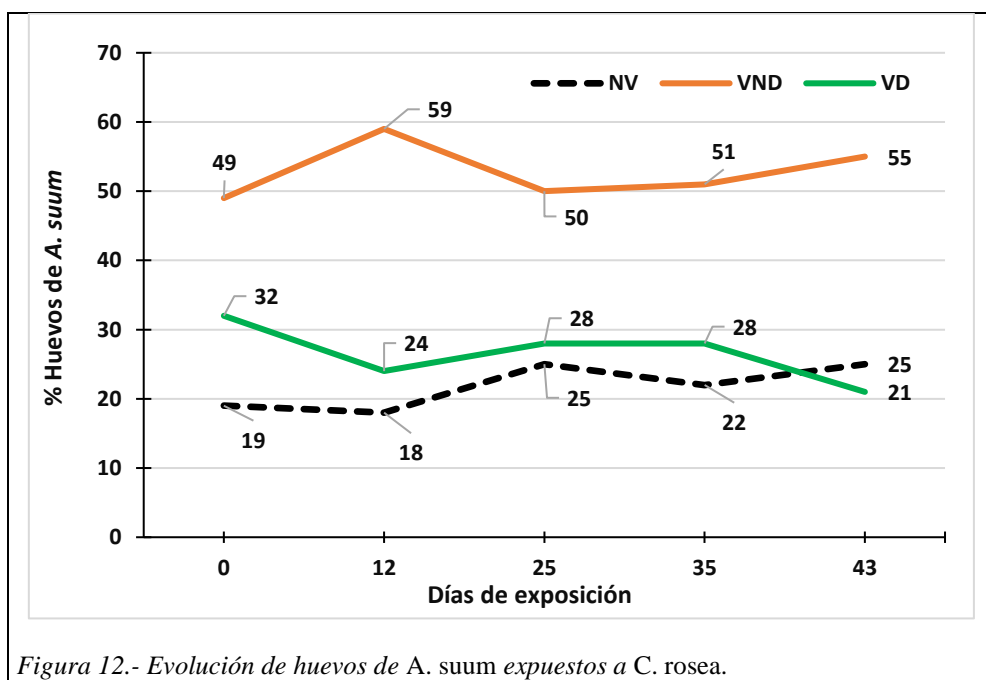


En una investigación previa se comprobó que, en condiciones *naturales* (sin exposición a ningún microorganismo), en las heces de lechones infectados, el 35% de los huevos de *A. suum* estaban embrionados después de un periodo de 60 días en el laboratorio, es decir, mostraban desarrollo celular, (Fernández Servián, 2017), muy similar al obtenido el presente trabajo, e inferior al

descrito en otro estudio sobre huevos del ascárido *Toxascaris leonina* (Teixeira Alves, 2016). Por el contrario, en heces mantenidas en cajas de plástico durante 60 días en un prado, Fernández Servián (2017) obtuvo un grado de desarrollo próximo al 70%.

#### 4.1.2. Grupo expuesto a *C. rosea*.

La exposición de huevos de *A. suum* al hongo *C. rosea* resultó en unos porcentajes con tendencia a la estabilización en todos los estadios analizados (NV, VD y VND) (Figura 12). Así, los NV y VD se mantuvieron entre el 20% y 30%, y los VND entre el 49-59%. De estos datos se deduce con relativa facilidad que la exposición al hongo provocó la detención del desarrollo de los huevos del nematodo gastrointestinal, de modo que más de la mitad no llegaron a iniciar su evolución después de 45 días. Este fenómeno de *ovistasis* resulta de gran trascendencia, dado que la ingesta de estos huevos no entrañaría riesgo alguno, disminuyendo, por tanto, las posibilidades de infección en los suidos durante este periodo.

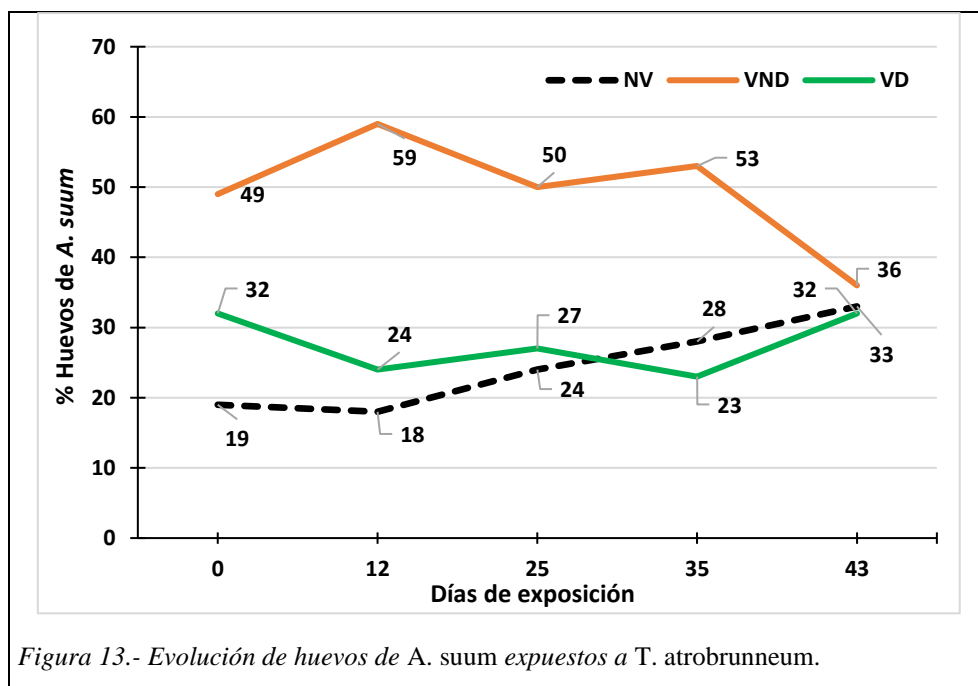


El análisis de los porcentajes de huevos no viables (NV) señala un leve efecto ovicida a lo largo del estudio. Al igual que en el grupo Testigo, no se observaron huevos infectantes en ningún momento del ensayo.

#### 4.1.3. Grupo expuesto a *T. atrobrunneum*.

En la Figura 13 se representan las variaciones de los diferentes estadios de huevos de *A. suum* expuestos a *T. atrobrunneum*. Mientras que los porcentajes de NV y VD se mantuvieron entre el 20-30% durante 35 días, a partir de este momento se incrementaron de forma ligera. En relación

con los valores de VND, el modelo fue inverso, con porcentajes del 50-60% hasta el día 35 post-exposición, y a continuación disminuyeron hasta el 35%. De estos resultados se infiere un efecto ovistático reversible durante los primeros 35 días, que revierte desde este momento, y que sustenta con el incremento de los huevos VD.



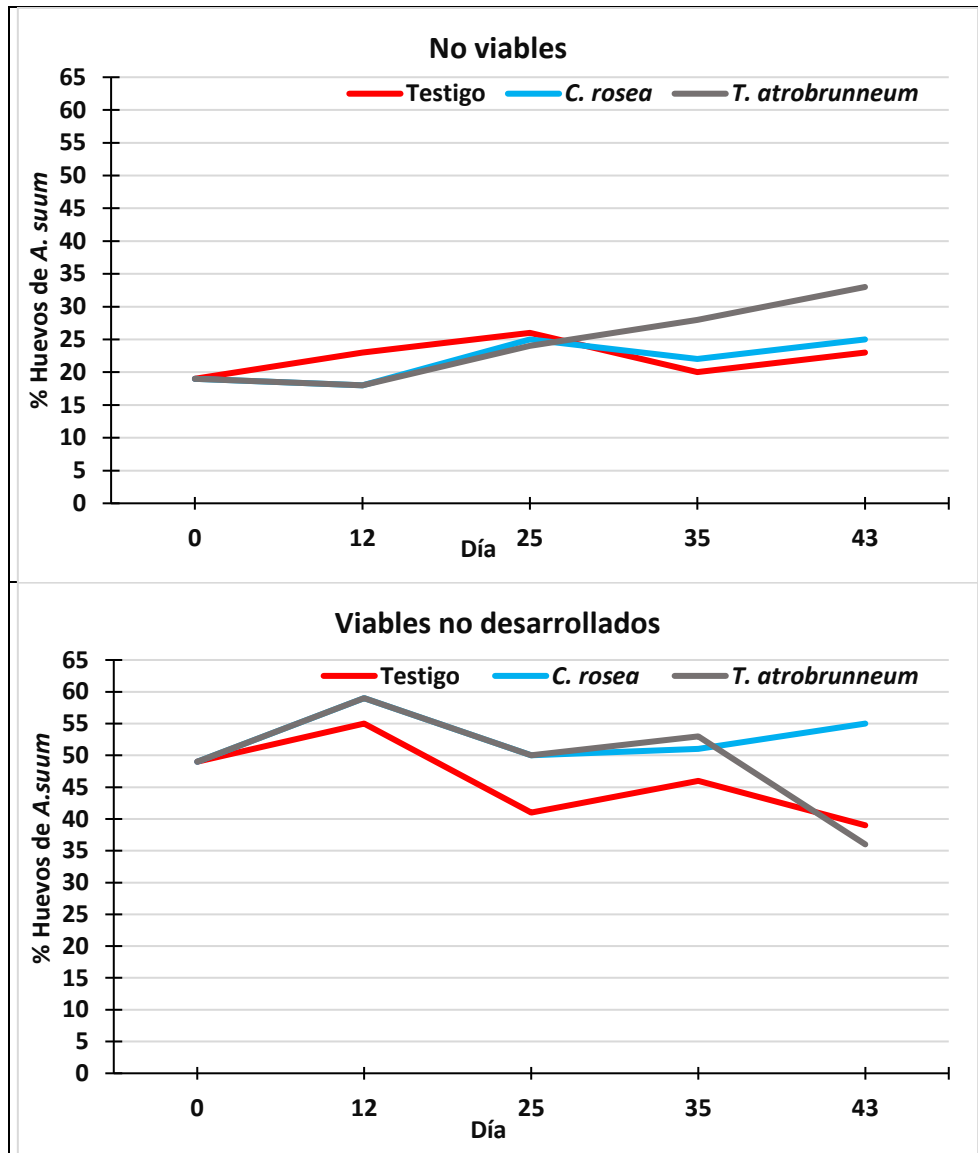
Los datos obtenidos en presencia de *T. atrobrunneum* indican un cierto efecto ovicida a lo largo del periodo en estudio, que alcanza el máximo al final del estudio. En este grupo tampoco se obtuvieron huevos infectantes (con L2).

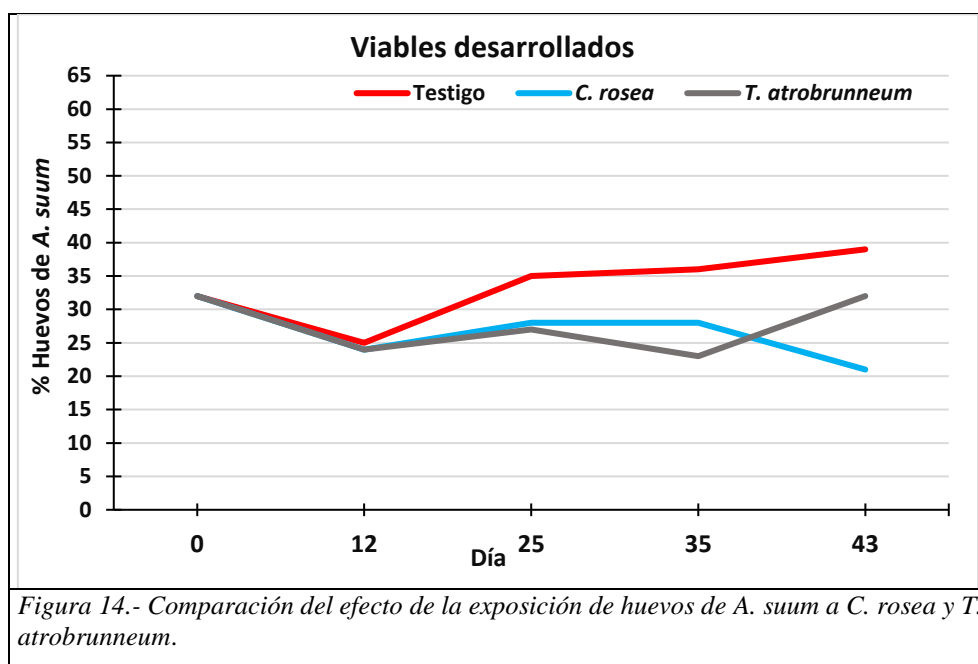
#### 4.1.4. Comparación entre los diferentes grupos.

Para establecer las diferencias entre los grupos observados, se representaron los porcentajes de huevos no viables, viables sin desarrollo y viables desarrollados (Figura 14). De esta forma, se confirmó que la actividad de *C. rosea* se ajusta más a la *ovistasis*, influyendo en el desarrollo de los huevos hasta evitar que evolucionen durante un período de 45 días, y que como ya se mencionó anteriormente, impide que alcancen el estadio infectante, desapareciendo por tanto el riesgo de infección en los suidos.

La actividad de *T. atrobrunneum* se puede definir como *ovicida* en función de los resultados obtenidos, dado que en presencia de este hongo, se incrementó el porcentaje de huevos no viables a lo largo del ensayo. También se debe señalar que este hongo ejerce una cierta actividad

ovistática, pero al contrario que con *C. rosea*, no es irreversible, y después de 35 días los huevos de *A. suum* reinician su desarrollo.





## 4.2. Porcentajes de variación de los huevos de *A. suum*.

Para completar el análisis de la actividad de los dos hongos sobre los huevos de *A. suum*, se consideró de enorme utilidad cuantificar el grado de antagonismo que son capaces de ejercer sobre las formas parasitarias. Para ello, se recurrió a la estimación del porcentaje de reducción de cada uno de los estadios identificados (NV, VND y VD) en los grupos expuestos a *C. rosea* y a *T. atrobrunneum*, en relación con los valores del grupo Testigo (Tabla 5).

|    | % variación NV  |                        | % variación VND |                        | % variación VD  |                        |
|----|-----------------|------------------------|-----------------|------------------------|-----------------|------------------------|
|    | <i>C. rosea</i> | <i>T. atrobrunneum</i> | <i>C. rosea</i> | <i>T. atrobrunneum</i> | <i>C. rosea</i> | <i>T. atrobrunneum</i> |
| 12 | 0               | 0                      | 7               | 7                      | 4               | 4                      |
| 25 | 0               | 0                      | 18              | 18                     | 20              | 23                     |
| 35 | 9               | 29                     | 10              | 13                     | 22              | 36                     |
| 45 | 8               | 30                     | 29              | 0                      | 46              | 18                     |

Tabla 5 - Porcentaje de variación sobre el valor de los huevos NV, VD y VND, en los grupos tratados con *T. atrobrunneum* o *C. Rosea* con respecto al valor de los mismos en el grupo testigo.

La exposición de huevos de *A. suum* al hongo *C. rosea* no influyó de forma importante en las variaciones de las formas no viables, suponiendo un pequeño incremento (8-9%) al final del ensayo. Sin embargo, con *T. atrobrunneum*, se consiguió disminuir la viabilidad en 1/3 a partir del día 35, confirmando así los datos presentados con anterioridad (Figura 14).

El efecto de *C. rosea* sobre los huevos viables no desarrollados (VND) aumentó a lo largo del ensayo, y a los 45 días su porcentaje creció casi 1/3 más que en el grupo Testigo, subrayando de este modo su actividad ovistática irreversible. Por el contrario, el moderado efecto ovistático desarrollado por *T. atrobrunneum* en los primeros 35 días se redujo notablemente a partir de ese momento. Estos datos se corroboraron al analizar los huevos en desarrollo (VD), que en presencia de *C. rosea* prácticamente disminuyeron a la mitad (respecto a los testigos) a los 45 días, mientras que con *T. atrobrunneum* lo hicieron en más de 1/3 hasta los 35 días.

### 4.3 Interpretación de los resultados

En definitiva, los resultados obtenidos del grupo testigo, como alcanzar un grado de desarrollo del 40% y un porcentaje menor del 25% de huevos no viables, nos indican que el experimento cumplía unas condiciones adecuadas para el desarrollo de los huevos, aunque no llegasen a alcanzar el 60% de huevos desarrollados como en otros estudios (Viña et al., 2020)

En los resultados se ha visto que, la adición del hongo *Clonostachys rosea* a la muestra, mantiene el porcentaje de huevos VD entre el 20-30% durante los 45 días que dura el experimento (figura 12). Esto nos indica que el hongo está ejerciendo una actividad ovistática como se ve en otros estudios realizados para el control de *Parascaris equorum* (Hernández et al., 2017) aunque lo recomendable sería alargar el experimento para conocer la temporalidad de este efecto. Para conseguir la acción ovicida frente a los huevos de *Ascaris suum*, que sería lo ideal, podría combinarse con *Mucor circinelloides* (Viña et al., 2020).

En el caso de *Trichoderma atrobrunneum*, el aumento constante, durante todo el experimento, del número de huevos NV nos indica un cierto efecto ovicida no tan evidente como en otros estudios frente a *Ascaris suum* donde se consigue una acción ovicida con porcentajes de reducción de viabilidad del 60% (Viña et al., 2020) pero, teniendo en cuenta lo comentado anteriormente también se ha visto actividad ovistática hasta el día 35 de experimento,( 23-24/05). A partir de ahí, el porcentaje de huevos VD, aumenta hasta valores similares a los del grupo testigo (33%), lo que se correlaciona también con la disminución del porcentaje de variación pasando de 36% a un 18%. Por lo que a partir del día 35 sería necesario la aplicación de otros métodos como la combinación con otros hongos, tratamientos farmacológicos o rotación de animales entre boxes (Viña et al., 2020; Araújo et al., 2021).

En los últimos años se ha progresado en la utilización, así como en el aislamiento y caracterización de los hongos utilizados como control biológico (Canhão-Dias et al., 2020) pero aun así todavía quedan muchas características por conocer, así como sus mecanismos de acción o la forma de producción de material fúngico de manera rápida y en cantidades adecuadas (Cortés-Sánchez & Mosqueda-Olivares, 2013).

Aunque diferentes autores consideraban que solo los hongos con efecto ovicida grado 3 tenían utilidad, también se ha visto que este efecto ovistático puede servir de ayuda y puede ser un método adecuado para la prevención de esta ascariosis y otras parasitosis (Blaszkowska et al., 2014), ya que el retraso en el desarrollo podría favorecer su destrucción con agentes abióticos (radiación solar, sequedad) o agentes bióticos (hongos, virus y bacterias).

## 5. CONCLUSIONES

Del análisis de los resultados obtenidos se llega a las siguientes **conclusiones**:

- El hongo filamentoso *Clonostachys rosea* ejerce una acción ovistática irreversible sobre los huevos de *Ascaris suum* durante más de un mes y medio de exposición.
- La acción de *Trichoderma atrobrunneum* sobre los huevos de *A. suum* es principalmente ovicida, aunque también desarrolla un efecto ovistático importante durante un mes aproximadamente.
- El empleo de los hongos *C. rosea* y *T. atrobrunneum* proporciona una herramienta sostenible muy útil para reducir la viabilidad e infectividad de *A. suum*. Serían necesarios ensayos más prolongados para determinar la dosis idónea, o la frecuencia de aplicación en el suelo.
- La eficacia de la aplicación de esporas de ambos hongos podría incrementar el efecto de tratamientos convencionales, y limitar de este modo la supervivencia de los huevos de *A. suum* en el medio.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Ahman, J., Johansson, T., Olsson, M., Punt, P. J., Van Den Hondel, C. A. M. J. J., & Tunlid, A. (2002). Improving the Pathogenicity of a Nematode-Trapping Fungus by Genetic Engineering of a Subtilisin with Nematotoxic Activity. *Applied And Environmental Microbiology*, 68(7), 3408-3415. <https://doi.org/10.1128/aem.68.7.3408-3415.2002>
- Ahmed, M., Laing, M., & Nsahlai, I. (2013b). Studies on the ability of two isolates of *Bacillus thuringiensis*, an isolate of *Clonostachys rosea* f. *rosea* and a diatomaceous earth product to control gastrointestinal nematodes of sheep. *Biocontrol Science And Technology*, 23(9), 1067-1082. <https://doi.org/10.1080/09583157.2013.819835>
- Alonso-Díaz, M., García, L., Galindo-Velasco, E., Lezama-Gutierrez, R., Angel-Sahagún, C., Rodríguez-Vivas, R., & Fragoso-Sánchez, H. (2007). Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) for the control of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on naturally infested cattle in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology*, 147(3-4), 336-340. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.03.030>
- Araújo, J. V., Braga, F. R., Silva, A. R., Araujo, J. M., & Tavela, A. O. (2008). In vitro evaluation of the effect of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense*, and *Pochonia chlamydosporia* on *Ascaris suum* eggs. *Parasitology Research*, 102(4), 787-790. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0852-9>
- Araújo, J. V., Braga, F. R., Mendoza-de-Gives, P., Paz-Silva, A., & Vilela, V. L. R. (2021). Recent Advances in the Control of Helminths of Domestic Animals by Helminthophagous Fungi. *Parasitologia*, 1(3), 168-176. <https://doi.org/10.3390/parasitologia1030018>
- 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., & De Gives, P. M. (2013). Mixed Production of Filamentous Fungal Spores for Preventing Soil-Transmitted Helminth Zoonoses: A Preliminary Analysis. *BioMed Research International*, 2013(1), 1-8. <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. (2016). The capability of the fungus *Mucor*

- circinelloides* to maintain parasitocidal 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>
- Bowman, D. D. (2004). Helminths. En *Georgis Parasitología para veterinarios* (8.ª ed., pp. 213-215). Elsevier España.
- Blazkowska, J., Kurnatowski, P., Wojcik, A., Goralska, K., & Szwabe, K. (2014). In vitro evaluation of the ovistatic and ovicidal effect of the cosmopolitan filamentous fungi isolated from soil on *Ascaris suum* eggs. *Veterinary Parasitology*, 199(3-4), 165-171. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.10.026>
- Blazkowska, J., Wojcik, A., Kurnatowski, P., & Szwabe, K. (2013). Biological interactions between soil saprotrophic fungi and *Ascaris suum* eggs. *Veterinary Parasitology*, 196(3-4), 401-408. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.02.029>
- 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>
- Cazapal Monteiro, C. F. (2015). *Posibilidades de control de helmintozoonosis en Galicia* [Tesis Doctoral. Facultad de veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela.]
- Cazapal Monteiro, C. F., Hernández, J. A., Arroyo, F. L., Miguélez, S., Romasanta, Á., Paz-Silva, A., Sánchez-Andrade, R., & Arias, M. S. (2015). Analysis of the effect of soil saprophytic fungi on the eggs of *Baylisascaris procyonis*. *Parasitology Research*, 114(7), 2443-2450. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4440-0>
- Cortés-Sánchez, A. de J., & Mosqueda-Olivares, T. (2013). Una mirada a los organismos fúngicos: Fábricas versátiles de diversos metabolitos secundarios de interés biotecnológico. *Química viva*, 12(2), 64-69. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86328550002>
- Cordero del Campillo, M., & Rojo Vazquez, F. A. (2001). Parasitosis del aparato digestivo. En M. Cordero del campillo & M. R. Hidalgo Argüello (Ed). *Parasitología veterinaria* (1.ª ed. Pp.469-473) Mc.Graw- Hill.

- Dold, C., & Holland, C. V. (2011). Ascaris and ascariasis. *Microbes And Infection*, 13(7), 632-637. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.09.012>
- 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>
- Fernández Servián, A. (2017). *Posibilidades de control de la ascariosis porcina* [Trabajo fin de grado. Facultad de veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela].
- Ferraz, C. M., Silva, L. P. C., De Freitas Soares, F. E., Souza, R. L. O., Tobias, F. L., De Araújo, J. V., Veloso, F. B. R., Laviola, F. P., Endringer, D. C., De Gives, P. M., & Braga, F. R. (2020). Effect of silver nanoparticles (AgNP's) from *Duddingtonia flagrans* on cyathostomins larvae (subfamily: cyathostominae). *Journal Of Invertebrate Pathology*, 174, 107395. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107395>
- Freiría Barreiro, D. (2020). *Procedimientos de escalado de la producción de esporas del hongo parasitocida Duddingtonia flagrans* [Tesis doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela].
- Hernández, J. A., Arroyo, F. L., Suárez, J., Cazapal-Monteiro, C. F., Romasanta, Á., López-Arellano, M. E., Pedreira, J., De Carvalho, L. M. M., Sánchez-Andrade, R., Arias, M. S., De Gives, P. M., & Paz-Silva, A. (2016). Feeding horses with industrially manufactured pellets with fungal spores to promote nematode integrated control. *Veterinary Parasitology*, 229, 37-44. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.09.014>
- Hernández Malagon, J. A. (2019). *Comercial formulations for the parasiticide fungus Mucor circinelloides* [Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela.]
- Hernández, J. A., Vázquez-Ruiz, R. A., Cazapal-Monteiro, C. F., Valderrábano, E., Arroyo, F. L., Francisco, I., Miguélez, S., Sánchez-Andrade, R., Paz-Silva, A., & Arias, M. S. (2017). Isolation of Ovicidal Fungi from Fecal Samples of Captive Animals Maintained in a Zoological Park. *Journal Of Fungi*, 3(2), 29. <https://doi.org/10.3390/jof3020029>

- Johnson, P., Dixon, R., & Ross, A. (1998). An in-vitro test for assessing the viability of *Ascaris suum* eggs exposed to various sewage treatment processes. *International Journal For Parasitology/International Journal For Parasitology*, 28(4), 627-633. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(97\)00210-5](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(97)00210-5)
- Katakam, K. K., Thamsborg, S. M., Dalsgaard, A., Kyvsgaard, N. C., & Mejer, H. (2016). Environmental contamination and transmission of *Ascaris suum* in Danish organic pig farms. *Parasites & Vectors*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1349-0>
- Kornele, M. L., McLean, M. J., O'Brien, A. E., & Phillippi-Taylor, A. M. (2014). Antiparasitic resistance and grazing livestock in the United States. *Journal Of The American Veterinary Medical Association*, 244(9), 1020-1022. <https://doi.org/10.2460/javma.244.9.1020>
- Lassen, B., Oliviero, C., Orro, T., Jukola, E., Laurila, T., Haimi-Hakala, M., & Heinonen, M. (2017). Effect of fenbendazole in water on pigs infected with *Ascaris suum* in finishing pigs under field conditions. *Veterinary Parasitology*, 237, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.03.005>
- Lozano, J., Cunha, E., Almeida, C., Nunes, M., Dias, R., Vicente, E., Sebastião, D., Henriques, S., De Carvalho, L. M., Paz-Silva, A., & Oliveira, M. (2024). Analyzing the safety of the parasiticide fungus *Mucor circinelloides*: first insights on its virulence profile and interactions with the avian gut microbial community. *Microbiology Spectrum*. <https://doi.org/10.1128/spectrum.04078-23>
- Lýsek, H., Fassatiová, O., Pineda, N. C., & Hernández, N. L. (1982). Ovicidal fungi in soils of Cuba. *Folia Parasitol Praha*, 29(3), 265-270.
- Lýsek, H., & Stěrba, J. (1991). Colonization of *Ascaris lumbricoides* eggs by the fungus *Verticillium chlamyosporium* Goddard. *Folia Parasitol (Praha)*, 38(3), 255-259.
- Maca-Medrano, Y. G., Rodríguez-Navarro, S., Vela-Correa, G., & Castellanos-Moguel, J. (2023). *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin para el control biológico de *Dendroctonus* sp. (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), en México. *Latin American Journal Of Development*, 5(2), 475-487. <https://doi.org/10.46814/lajdv5n2-001>

- Martínez-Pérez, J., Vandekerckhove, E., Vlamincx, J., Geldhof, P., & Martínez-Valladares, M. (2017). Serological detection of *Ascaris suum* at fattening pig farms is linked with performance and management indices. *Veterinary Parasitology*, 248, 33-38. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.10.009>
- Masure, D., Vlamincx, J., Wang, T., Chiers, K., Van Den Broeck, W., Vercruyssen, J., & Geldhof, P. (2013). A Role for Eosinophils in the Intestinal Immunity against Infective *Ascaris suum* Larvae. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(3), 2138. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002138>
- 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>
- Ojeda-Robertos, N. F., De Jesus Torres-Acosta, J. F., Aguilar-Caballero, A. J., Ayala-Burgos, A., Cob-Galera, L. A., Sandoval-Castro, C. A., Barrientos-Medina, R. C., & De Givès, P. M. (2008). Assessing the efficacy of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores per gram of faeces to control *Haemonchus contortus* larvae. *Veterinary Parasitology*, 158(4), 329-335. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.08.022>
- Oliveira Barbosa Bitencourt, R., Mallet, J. R. D. S., Mesquita, E., Gôlo, P. S., Fiorotti, J., Bittencourt, V. R. E. P., Pontes, E. G., & Da Costa Angelo, I. (2021). Larvicidal activity, route of interaction and ultrastructural changes in *Aedes aegypti* exposed to entomopathogenic fungi. *Acta Tropica*, 213, 105732. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105732>
- Roepstorff, A., Mejer, H., Nejsum, P., & Thamsborg, S. M. (2011). Helminth parasites in pigs: New challenges in pig production and current research highlights. *Veterinary Parasitology*, 180(1-2), 72-81. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.029>
- Salmo, R., Viña, C., Zubiria, I., Malagón, J. Á. H., Sanchís, J., Cazapal, C., Arias, M., Sánchez-Andrade, R., & Silva, A. P. (2024). Formulating Parasiticidal Fungi in Dried Edible Gelatins to Reduce the Risk of Infection by *Trichuris sp.* among Continuous Grazing Bison. *Pathogens*, 13(1), 82. <https://doi.org/10.3390/pathogens13010082>

- Schuster, A., & Schmol, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 87(3), 787-799. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2632-1>
- Soulsby, E. J. L. (1999). Nematodos. En *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos* (7.<sup>a</sup> ed., pp. 142-148). Interamericana.
- Sun, Z., Li, S., Ren, Q., Xu, J., Lu, X., & Sun, M. (2020). Biology and applications of *Clonostachys rosea*. *Journal Of Applied Microbiology*, 129(3), 486-495. <https://doi.org/10.1111/jam.14625>
- Szewc, M., De Waal, T., & Zintl, A. (2021). Biological methods for the control of gastrointestinal nematodes. *The Veterinary Journal*, 268, 105602. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2020.105602>
- Teixeira Alves, I. (2016). *Interacción in vivo entre hongos nematófagos y huevos de Toxascaris leonina y Ancylostoma spp* [Trabajo fin de grado. Facultad de veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela ]
- Urquhart, G. M., Armour, J., Duncan, J. L., Dunn, A. M., & Jennigs, F. W. (2001). *Parasitología veterinaria(pp74-79)*. Acribia, S.A.
- Vandekerckhove, E., Vlaminc, J., Del Pozo Sacristán, R., & Geldhof, P. (2019). Effect of strategic deworming on *Ascaris suum* exposure and technical performance parameters in fattening pigs. *Veterinary Parasitology*, 268, 67-72. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.03.006>
- Viña, C., Silva, M. I., Palomero, A. M., Voinot, M., Del Pilar Cagiao Vila, M., Hernández, J. Á., Silva, A. P., Sánchez-Andrade, R., Cazapal-Monteiro, C., & Arias, M. (2020). The Control of Zoonotic Soil-Transmitted Helminthoses Using Saprophytic Fungi. *Pathogens*, 9(12), 1071. <https://doi.org/10.3390/pathogens9121071>
- Voinot, M., Cazapal-Monteiro, C., Hernández, J. Á., Palomero, A. M., Arroyo, F. L., Sanchís, J., Pedreira, J., Sánchez-Andrade, R., Paz-Silva, A., & Arias, M. S. (2020). Integrating the control of helminths in dairy cattle: Deworming, rotational grazing and nutritional pellets

with parasiticide fungi. *Veterinary Parasitology*, 278,  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109038>

Wang, C., & Wang, S. (2017). Insect Pathogenic Fungi: Genomics, Molecular Interactions, and Genetic Improvements. *Annual Review Of Entomology*, 62(1), 73-90.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-ento-031616-035509>

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>