



TESIS DE DOCTORADO

**“PROCEDIMIENTOS DE ESCALADO DE LA
PRODUCCIÓN DE ESPORAS DEL HONGO
PARASITICIDA DUDDINGTONIA FLAGRANS”**

Diana Freiría Barreiro

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN MEDICINA E SANIDADE VETERINARIA

LUGO

2020





DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

Procedimientos de escalado de la producción de esporas del hongo parasitico *Duddingtonia flagrans*

Dña. Diana Freiría Barreiro

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) Confirмо que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

En Lugo, a 23 de xullo de 2020.

Fdo. Diana Freiría Barreiro



AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

Procedimientos de escalado de la producción de esporas del hongo parasiticoide *Duddingtonia flagrans*

Los Doctores D^a. María Sol Arias Vázquez y D. José Pedreira García

INFORMAN:

Que la presente Tesis se corresponde con el trabajo realizado por Doña Diana Freiría Barreiro bajo nuestra dirección, y autorizamos su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como directores de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

En Lugo, a 23 de xullo de 2020.

María Sol Arias Vázquez

José Pedreira García

Financiación

El presente estudio ha sido realizado con cargo a los Proyectos de Investigación:

- “Incorporación de hongos parasitoides autóctonos a piensos comerciales para prevenir la infección de animales de renta” (AGL2012-34355; Ministerio de Economía y Competitividad; FEDER).
- “Formulación de esporas de hongos parasitoides en gelatinas comestibles para prevenir las helmintozoonosis transmitidas por el suelo” (CTM2015-65954-R; Ministerio de Economía y Competitividad; FEDER).
- “Investigación orientada al diagnóstico, control y prevención de infecciones parasitarias, en especial zoonosis” (RYC-2016-21407; Ministerio de Economía, Industria y Competitividad).
- “Desarrollo dun biocida sustentable de acción parasitoides no solo” - Modalidade C. Proyectos de excelencia - Consolidación e estruturación 2018 (ED431F 2018/03; Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria, Xunta de Galicia).

Origen de las imágenes y gráficos de la presente Memoria

Las figuras, imágenes y esquemas que se presentan en esta Memoria son originales de la autora y del Grupo de Investigación COPAR (GI-2120).



Agradecimientos

Ha sido un largo camino hasta llegar aquí, y expresar mis agradecimientos me parece casi tan obligado como referenciar fuentes bibliográficas. Un trabajo de investigación es siempre fruto de ideas, proyectos y esfuerzos previos que corresponden a otras personas. Es también nuestro caso, y es por eso que quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

A mis directores, que han sido en realidad bastante más que eso: a mi querido Dr. José Pedreira García, porque estoy convencida de que este trabajo nunca hubiese llegado a existir sin su mano guía; y a la Profesora Dra. María Sol Arias Vázquez, a la que debo agradecer toda su confianza, esfuerzo e implicación desde el inicio de este trabajo.

A los Catedráticos del Departamento de Patología Animal, Profa. Dra. M^a Patrocinio Morrondo Pelayo y Prof. Dr. Pablo Díez Baños, por darme ya hace muchos años, la oportunidad única de formar parte de un grupo de investigación maravilloso. Estoy en deuda con vosotros.

A los Dres. Rosario Panadero Fontán, Ceferino López Sáñez, Pablo Díaz Fernández y Rita Sánchez-Andrade Fernández por haberme ayudado desde mis comienzos y por todos los buenos momentos que pasamos juntos, que desde luego no han sido pocos. Habéis sido unos profesores magníficos y sois unos grandes compañeros.

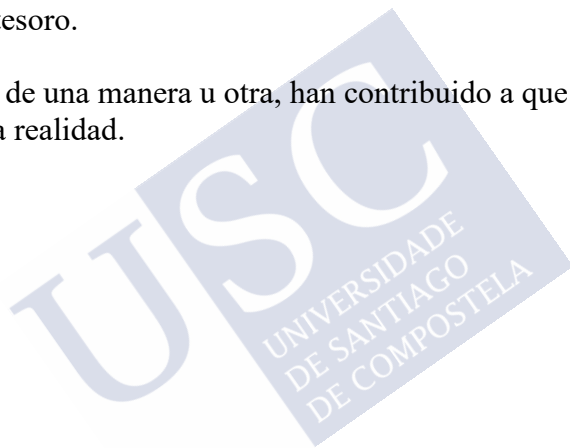
Dr. Adolfo Paz Silva: no hay aquí líneas suficientes que puedan contener todo mi agradecimiento. Gracias Adolfo, por tu dedicación, paciencia y tu implicación; por el respeto a mis sugerencias e ideas y por toda la supervisión que hay detrás de esta Tesis Doctoral. Sin su apoyo este trabajo nunca se habría escrito y, por eso, este trabajo es también el suyo. Medir mis agradecimientos hacia Adolfo para no ser acusada de adúladora no es sencillo...

Al Dr. José Luis Suárez García de Paredes, del que guardo un recuerdo extraordinario.

A mi queridísimo hijo Damián que me ha convertido en mejor persona, a mi marido Miguel que siempre está para lo bueno y lo malo; a mis padres por ser los pilares de mi vida y por toda la paciencia que han tenido conmigo. A mis hermanos Juan, Georgina y Rafael: con ellos compartí una infancia alborotada y feliz que guardo en el recuerdo.

Gracias a mis amigos, que desde hace tanto tiempo me han prestado su amistad; me hacen feliz y son un gran apoyo moral y humano. Para mí son tan necesarios en los momentos difíciles de mi vida como en los buenos. Gracias Julia, Sandra, Carmencita, Marta Casal, Mónica Tel, y demás. Sois un tesoro.

A todos los que, de una manera u otra, han contribuido a que esta Tesis Doctoral sea una realidad.



Índice

1.- ANTECEDENTES	3
1.1. UTILIDAD DE HONGOS	3
1.2. HONGOS CON ACTIVIDAD PARASITICIDA	5
1.2.1. Ovicidas	7
1.2.2.- Larvicidas	8
1.2.3.- Entomopatógenos	10
1.2.4. Transición de comportamiento saprófito a parasitica	11
1.3. ESTRUCTURA Y MORFOLOGÍA DE HONGOS	12
1.4. METABOLISMO DE HONGOS	17
1.4.1. Nutrición.....	19
1.5. MULTIPLICACIÓN DE ESTADIOS FÚNGICOS	22
1.5.1. Factores relacionados con la esporulación de hongos	28
1.6. PROPAGACIÓN DE HONGOS EN MEDIOS DE CULTIVO.....	29
1.6.1. Medios sólidos	30
1.6.2. Medios líquidos	34
1.6.3. Medios bifásicos	36
1.7. LEGISLACIÓN RELACIONADA CON EL EMPLEO DE HONGOS PARA EL CONTROL PARASITARIO.....	38
1.7.1. Biocidas	38
1.7.2. Aditivos alimentarios.....	38
1.7.3. Distribución de hongos en explotaciones agropecuarias	39
2.- OBJETIVOS.....	43
3.- DISEÑO DEL ESTUDIO.....	47
4.- ENSAYO I: Producción de esporas en medios sólidos con agar.....	51
4.1. MATERIAL Y MÉTODOS.....	51
4.1.1. Preparación de placas <i>madre</i>	51

4.1.2. Preparación de placas Petri con agar comestible y diferentes alimentos.....	52
4.1.3. Siembra de placas con <i>D. flagrans</i>	54
4.1.4. Desarrollo del micelio	55
4.1.5. Recuento de esporas.....	55
4.1.6. Análisis estadístico	56
4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
4.2.1. Desarrollo del micelio de <i>D. flagrans</i>	56
4.2.2. Producción de esporas de <i>D. flagrans</i>	61
4.2.3. Comparación de los resultados	65
5.- ENSAYO II: Producción de esporas en medio líquido empobrecido	69
5.1. MATERIAL Y MÉTODOS	69
5.1.1. Diseño experimental	69
5.1.2. Acondicionamiento de recipientes de plástico	70
5.1.3. Preparación del medio de cultivo líquido	71
5.1.4. Siembra de medio de cultivo líquido con <i>D. flagrans</i>	72
5.1.5. Evaluación del desarrollo de <i>D. flagrans</i> en medio líquido ..	73
5.1.6. Análisis estadístico	74
5.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	75
5.2.1. Fase 1: desarrollo de <i>D. flagrans</i> en medio líquido	75
5.2.2. Fase 2: escalado a 500 mL	79
5.2.3. Fase 3: escalado a 1L	80
5.2.4. Comparación de los resultados obtenidos en medio de cultivo líquido	82
6.- ENSAYO III: Producción de esporas en medios mixtos.....	91
6.1. MATERIAL Y MÉTODOS	92
6.1.1. Medio líquido + pan rallado.....	92

6.1.2. Medio líquido + pan tostado	95
6.1.3. Análisis estadístico	97
6.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	97
6.2.1. Producción de clamidosporas	97
6.2.2. Comparación de los resultados	100
7.- ENSAYO IV: Producción de esporas en medio líquido enriquecido	105
7.1. MATERIAL Y MÉTODOS.....	105
7.1.1. Medio líquido + fécula	106
7.1.2. Medio líquido + fécula + pan rallado	107
7.1.3. Análisis estadístico	109
7.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	109
7.2.1. Producción de clamidosporas	109
7.2.2. Comparación de los resultados	112
8.- ANÁLISIS CONJUNTO DE LOS RESULTADOS ...117	
8.1. RENDIMIENTO	117
8.1.1. Productividad	118
8.1.2. Tiempo requerido	120
8.1.3. Composición nutricional	121
8.1.4. Coste	124
8.1.5. Alteraciones de los medios	127
8.2. APLICACIÓN PRÁCTICA	128
9. CONCLUSIONES	135
10. RESUMEN / RESUMO / SUMMARY	139
10.1. RESUMEN	139
10.2. RESUMO	142
10.3. SUMMARY	142
11. BIBLIOGRAFÍA	153

Abreviaturas

AGS: ácidos grasos saturados

AMT: agar-marino-trigo

AMTC: AMT caldo

Azs: azúcares

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo

Dcha.: Derecha

ESP: Productos antigénicos de excreción/secreción

EP: Entomopatógeno

FE: fécula

FECR: Fecal Egg Count Reduction

HC: hidratos de carbono

HPG: Huevos por gramo de heces

Izda.: Izquierda

Kcal: Kilocalorías

L: litro

L1, L2, L3: Larva de primer estadio, segundo o tercero

Líps: lípidos

μL: microlitro

ML: medio líquido

mL: mililitro

O: Ovicida

OPG: Ooquistes por gramo de heces

PR: pan rallado

Prots: proteínas

PT: pan tostado



1.- ANTECEDENTES



1.- ANTECEDENTES

1.1. UTILIDAD DE HONGOS

Los hongos son organismos eucariotas inmóviles, de nutrición heterótrofa porque toman carbono y nitrógeno de compuestos orgánicos sintetizados por otros organismos. Están dotados de una pared celular con quitina, sin clorofila ni celulosa, y se encuentran en todo tipo de ambientes. Pueden presentar reproducción sexual o asexual, que tiene como resultado la creación de formas de resistencia, las esporas.

En la Naturaleza se han descrito más de 100000 especies, aunque se sospecha que podría superarse el millón y medio (O'Hanlon, 2018). Ciertas especies son agentes etiológicos de enfermedades en animales, plantas y personas. Uno de los casos más conocidos es el envenenamiento del ganado por el cornezuelo del centeno (*Claviceps purpurea*), o pormicotoxinas (aflatoxinas, ocratoxina A) producidas por especies de *Aspergillus* en granos almacenados.

Algunos hongos provocan alteraciones en alimentos. Un ejemplo lo constituye *Phytophthora infestans*, responsable de la hambruna de la patata en Irlanda (1845-1849); la importancia de las alteraciones causadas por especies como *Fusarium oxysporum lycopersici* ha impulsado la producción de tomates RAF (*Resistente a Fusarium*), que son más provechosos en cultivos en invernadero. Sin embargo, algunas especies resultan beneficiosas, bien porque son comestibles y se consumen de forma habitual, o bien porque producen antibióticos (penicilina, cefalosporina, ciclosporina) y estatinas. A finales del siglo XIX, Alexander Fleming aisló la **penicilina** a partir de *Penicillium chrysogenum*, aunque las propiedades beneficiosas de ciertos mohos ya eran conocidas por los griegos hacía más de 2000 años, y por mozos de

cuadra árabes que utilizaban mohos para curar llagas de caballos (Keyes *et al.*, 2003).

Desde hace algunos años, se ha impulsado la utilización de ciertas especies en la biodegradación de residuos industriales o agrícolas. Por ejemplo, se ha aconsejado el empleo de la especie *Pleurotus ostreatus*, aislada a partir de ostras, en la eliminación de vertidos de petróleo (Jerusik, 2010; Kulshreshtha *et al.*, 2014).

Un número importante de estos organismos son saprófitos, y se nutren a partir de materia orgánica que descomponen mediante la liberación de diferentes sustancias, motivo por el que suscitan el interés en procesos industriales (Walker y White, 2018). En la Tabla 1 se resumen las principales aplicaciones biotecnológicas de ciertas especies de hongos. Algunas resultan sobradamente conocidas, y ya desde antiguo se menciona el empleo de especies de *Penicillium* en la elaboración de cierto tipo de quesos, para conferirles un aroma, sabor y textura característicos.

Tabla 1.- Algunas especies de hongos resulta de interés en procesos biotecnológicos.		
Procedimiento	Especie de hongo	Cita
Maduración de quesos	<i>Penicillium camemberti</i> , <i>P. roqueforti</i>	Chávez <i>et al.</i> (2010)
Síntesis de antibióticos	<i>P. chrysogenum</i> , <i>P. fuscum</i> , <i>P. camembertii/clavigerum</i>	Berezow (2017)
Producción de enzimas	<i>Ganoderma enigmaticum</i> , <i>Trametes ljubarskyi</i>	Gudikandula <i>et al.</i> (2017)
Biodegradación de residuos industriales o agrícolas	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Jerusik (2010), Kulshreshtha <i>et al.</i> (2014)
Blanqueo de papel	<i>Penicillium citrinum</i> , <i>Trichoderma reesei</i>	Sigoillot <i>et al.</i> (2005)
Obtención de cosméticos	<i>Agaricus subrufescens</i> , <i>Choironomyces maeandriiformis</i>	Hyde <i>et al.</i> (2010)
Alimento para veganos (Quorn®)	<i>Fusarium venenatum</i>	Berka <i>et al.</i> (2004)

Otra aplicación prometedora de hongos es en el blanqueamiento de pasta de papel, que permitirá evitar el empleo de productos químicos altamente contaminantes (Sigoillot *et al.*, 2005). También se ha encontrado aplicabilidad en la obtención de cosméticos (Hyde *et al.*, 2010). Por último, resulta notable la producción de sustitutos alimentarios para veganos, que se comercializan bajo el nombre de Quorn® (Tabla 1), y que se obtienen mediante la participación de *Fusarium venenatum* (Berka *et al.*, 2004). Finalmente, es importante tener en cuenta que la ingesta de hongos comestibles proporciona elementos como selenio, potasio, riboflavina, niacina, vitamina D o proteínas (Sadler, 2003; Goyal *et al.*, 2016).

1.2. HONGOS CON ACTIVIDAD PARASITICIDA

Entre los hongos filamentosos del suelo, se han identificado especies saprofitas capaces de alimentarse a partir de algunos estadios parasitarios (huevos, larvas, adultos) (Tabla 2), enfocando su actividad antagonista sobre diferentes fases.

Tabla 2.- En el suelo existen hongos filamentosos antagonistas de diferentes estadios parasitarios. (EP: entomatopatógeno; A: adulto).

Familia	Especie	Parásito diana	Actividad
Zygomycetes	<i>Pandora neoaphidis</i>	<i>Acyrtosiphon pisum</i> <i>Musca domestica</i>	EP
	<i>Entomophthora</i> spp.	Aphididae <i>Formica polyctena</i>	EP
	<i>Conidiobolus</i> spp.	<i>Calliphora</i> spp. <i>Musca domestica</i>	EP
	<i>Mucor circinelloides</i>	<i>Fasciola hepatica</i> <i>Calicophoron daubneyi</i> <i>Ascaris suum</i> <i>Toxocara canis</i> <i>Toxascaris leonina</i> <i>Toxocara vitulorum</i> <i>Trichuris</i> spp. <i>Ixodes scapularis</i> <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Ovicida

Ascomycetes	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Xylotrechus arvicola</i> <i>Acanthoscelides obtectus</i> <i>Rhipicephalus sanguineus</i> <i>Rhipicephalus microplus</i> <i>Amblyomma cajenense</i>	EP (A)
	<i>Metarhizium brunneum</i>	<i>Rhipicephalus</i> spp. <i>Amblyomma</i> spp. <i>Ixodes scapularis</i> <i>Hyalomma</i> spp. <i>Varroa destructor</i>	EP (A)
	<i>Lecanicillium lecanii</i>	<i>Matsucoccus matsumurae</i> <i>Rhipicephalus microplus</i>	Ovicida
	<i>Pochonia chlamydosporia</i>	<i>Fasciola hepatica</i> <i>Calicophoron daubneyi</i> <i>Ascaris suum</i> <i>Toxocara canis</i> <i>Toxascaris leonina</i> <i>Toxocara vitulorum</i> <i>Trichuris</i> spp. <i>Ixodes scapularis</i> <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Ovicida
	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	<i>B. procyonis</i> , <i>T. canis</i> , <i>T. hydatigena</i>	Ovicida
	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>B. procyonis</i> , <i>T. canis</i>	Ovicida
	<i>Duddingtonia flagrans</i>	<i>Trichostrongylus</i> , <i>Ciatostominos</i> , <i>Strongylus</i> spp.	Larvicida
	<i>Monacrosporium</i> spp.		
<i>Arthrobotrys</i> spp.			

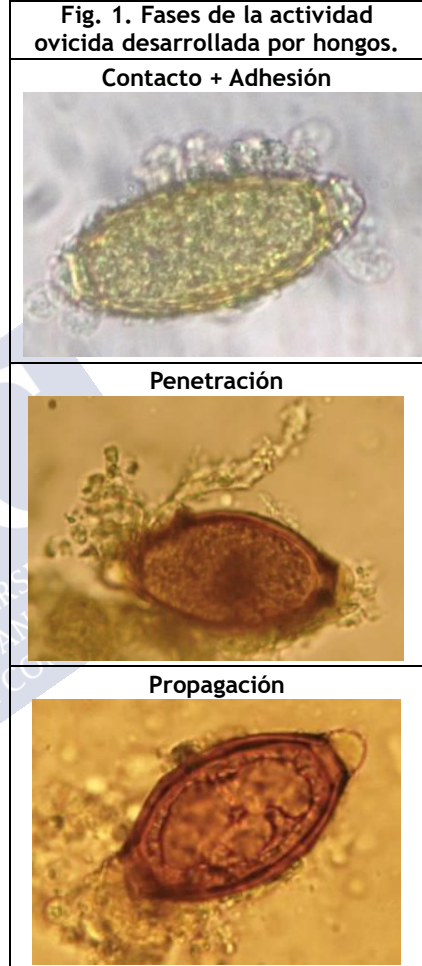
Prácticamente, todos los hongos antagonistas de parásitos conocidos se incluyen dentro de los Filos Ascomycetes y Zygomycetes (Hernández, 2019), y engloban a los géneros *Purpureocillium*, *Pochonia*, *Arthrobotrys*, *Duddingtonia*, *Monacrosporium*, *Verticillium*, *Mucor* y *Trichoderma*, frecuentemente empleados en el control de parásitos vegetales y de animales (Sidiqqi y Mahmood, 1996; Braga *et al.*, 2007; Arias *et al.*, 2011; Fitz-Aranda *et al.*, 2015). En el presente estudio se ha considerado oportuno señalar su actividad sobre los diferentes estadios, resultando en *ovicidas*, *larvicidas* y *entomopatógenos*.

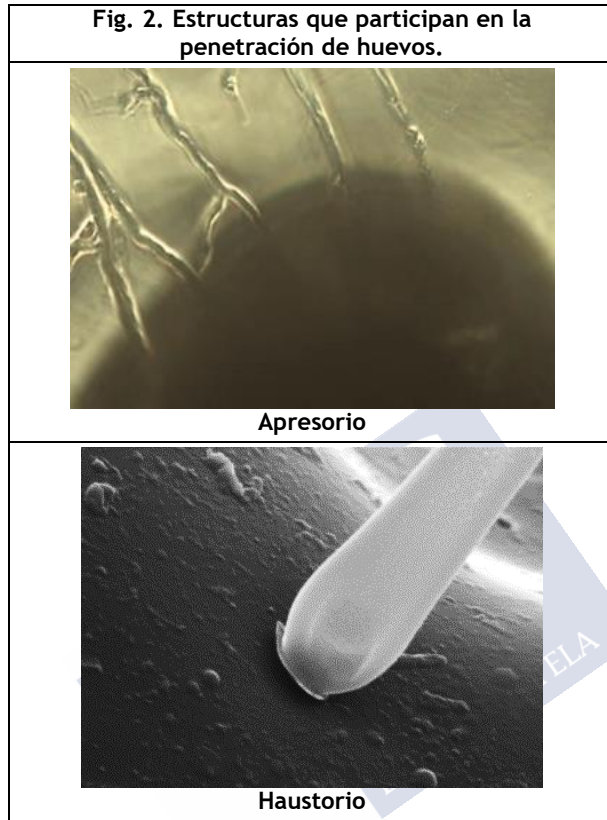
1.2.1. Ovicidas

Entre los mecanismos de propagación que desarrollan los parásitos, es necesario tener en cuenta que en ocasiones se realiza mediante la liberación de ooquistes o quistes de protozoos en las heces, así como de huevos de helmintos y garrapatas. En ocasiones, la fase infectante es un huevo que contiene un estadio larvario en su interior (L2 en ascáridos, L1 en tricúridos), y en otras (garrapatas) se libera una larva, que posteriormente se transformará en ninfa y finalmente en adulto (Hernández *et al.*, 2019).

Como se representa en la figura 1, el mecanismo que desarrollan los hongos ovicidas incluye una fase de **contacto**, debido a que detectan la presencia de huevos de parásitos próximos. En consecuencia, desarrollan hifas que se **adhieren** a la cubierta; cuando lo hacen en ángulo recto, son capaces de **penetrar** al interior, proceso favorecido por la liberación de enzimas con actividad proteolítica (Neira-Vielma *et al.*, 2018).

En la fase de penetración intervienen dos estructuras que evitan la aparición de soluciones de continuidad en la cubierta, el *apresorio* o extremo de la hifa que se adhiere, y el *haustorio*, responsable de la absorción del contenido interno (Fig. 2). Cuando el hongo ingiere todo el contenido interno a través del *haustorio*, ocurre la etapa de **propagación**, y ocurre la colonización de todo el interior, se producen esporas, que finalmente abandonan el huevo en busca de más alimento (Arroyo, 2017).





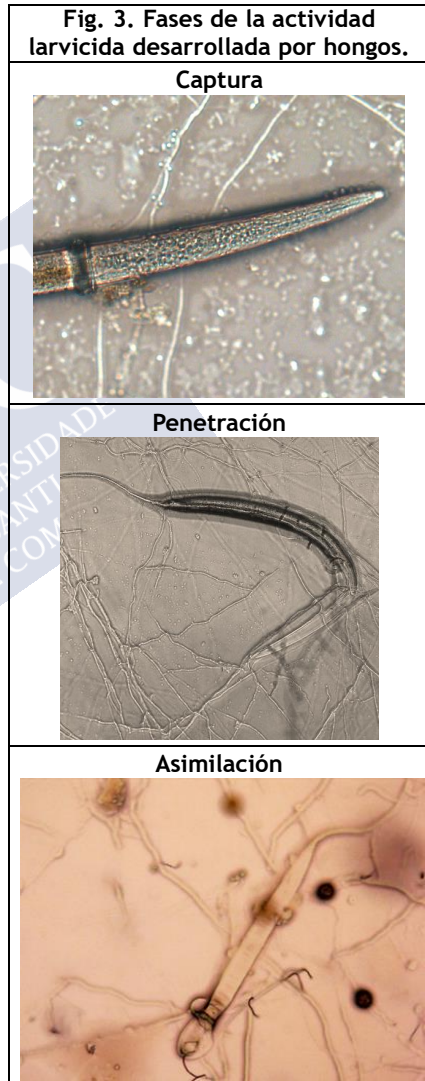
1.2.2.- Larvicidas

Algunas especies de parásitos se propagan mediante la eliminación de huevos, y una vez en el suelo (heces, hierba) y bajo condiciones climáticas adecuadas, se origina en el interior una larva, que eclosiona y una vez fuera del huevo experimenta diferentes mudas hasta alcanzar el estadio infectante. Un ejemplo muy conocido lo constituyen los nematodos estrogilidos. Debido a que se trata de *fases móviles*, el empleo de hongos ovicidas resulta controvertido, especialmente en áreas con climas tropicales/subtropicales con elevado grado de humedad y temperatura, que estimulan el desarrollo y aparición de fases infectantes en periodos de tiempo más breves que el intervalo requerido

para la actividad fúngica. Por este motivo, se han utilizado con gran éxito especies atrapanematodos de los géneros *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* y *Monacrosporium*, que se caracterizan porque elaboran *trampas* en las higas, que retienen los estadios larvarios cuando se mueven por el suelo (o heces).

Hernández (2019) definió tres etapas en la actividad larvicida de hongos filamentosos (Fig. 3). En la primera tiene lugar la **captura** de las larvas cuando se desplazan, y se requiere que el micelio del hongo haya alcanzado un determinado grado de desarrollo. Posteriormente, mediante la génesis de hifas asimilativas, que **penetran** al interior de las larvas, y en la fase siguiente **asimilan** los nutrientes.

Aunque estudios preliminares señalaron que las trampas se formaban en respuesta a la presencia de larvas vivas y en movimiento (Grønvold *et al.*, 1996; Boguś *et al.*, 2005), estudios realizados en los últimos años han descartado esta hipótesis, demostrando que los anillos aparecen incluso cuando se ponen en contacto hongos con larvas muertas, o con productos antigénicos de trematodos (Suárez, 2017; Arias *et al.*, 2013a). Es importante destacar que las larvas *de vida libre* o no parásitas no son retenidas en estos anillos (Palomero, 2015; Saumell *et al.*, 2016).

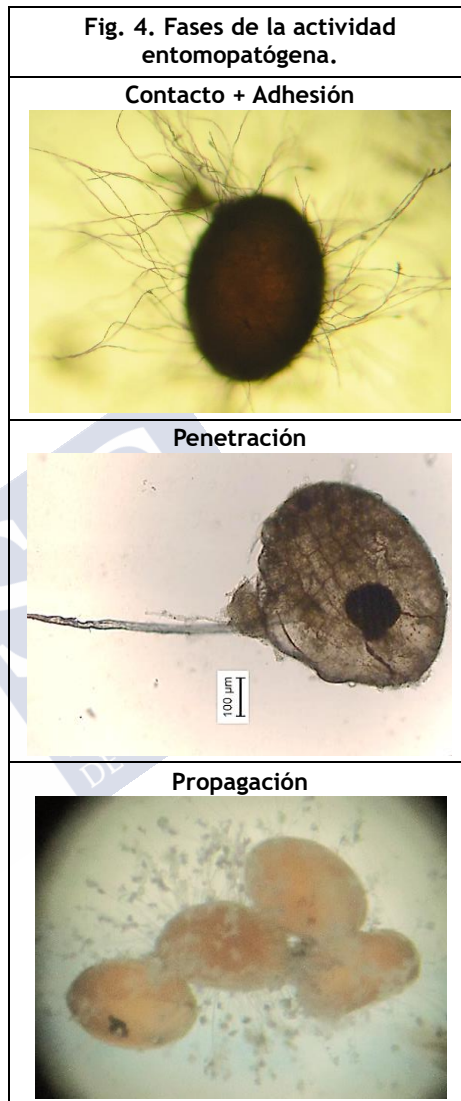


1.2.3.- Entomopatógenos

Hasta el momento, algunas especies de zigomicetos entomopatógenos se utilizan en el control de parásitos de plantas, y existen algunas referencias en el control de mosquitos (Scholte *et al.*, 2004; Pucheta *et al.*, 2006).

Cuando las esporas se **adhieren** a la superficie del insecto, normalmente en fase larvaria, se origina la formación de tubos germinativos, a través de los cuales se secretan proteasas, quitinasas, quitobiasas, upasas y lipooxigenasas, que degradan la cutícula y colaboran en la **penetración** mediante presión mecánica del *apresorio* (estructura especializada del tubo germinativo).

En el interior del hospedador, las hifas se diseminan a través del hemocele e invaden diferentes tejidos hasta provocarle la **muerte**. Cuando los nutrientes se agotan, se inicia el **crecimiento micelar** que invade todos los órganos. Finalmente, las hifas salen a través de la cutícula, e inician la **formación de esporas**.



1.2.4. Transición de comportamiento saprófito a parasitica

En el suelo, los hongos desarrollan una función crucial debido a que se trata de los principales agentes que intervienen en la descomposición de la materia orgánica a moléculas inorgánicas (Gadd, 2007). Casi todas las especies adoptan un estilo de vida saprófito o simbiote, pero un reducido porcentaje (inferior al 0,5%) son carnívoros y tienen la capacidad de atrapar y digerir nematodos, rizópodos y rotíferos mediante la elaboración de estructuras especializadas (McInnes, 2003).

El mecanismo por el que algunas especies puedan pasar de una forma saprófita a otra predadora ha suscitado gran interés científico, postulándose la carencia de carbono y nitrógeno como un estímulo, o bien la presencia de materia fecal (Dackman y Nordbring-Hertz, 1992; Anan'ko y Teplyakova, 2011). Estudios más recientes señalan la intervención de ciertas bacterias que participan en el *marcado* de ciertos nematodos. Wang *et al.* (2014) indicaron que algunos nematodos ingieren bacterias del suelo, que liberan **urea**, que actúa como *inductor* de la transformación del hongo filamentoso *Arthrobotrys oligospora* hasta su forma predadora de larvas de gastrointestinales que se encuentran en el suelo (estadios L2 y L3).

También se ha apuntado que el origen de esta posibilidad de intercambiar forma saprófita y predadora se encuentra en las épocas en las que se produjo la extinción en masa de seres vivos, con un elevado contenido en carbono y pobre en nitrógeno, de ahí que la posibilidad de tomar el nitrógeno directamente de organismos vivos supuso una ventaja competitiva sobre los hongos saprófitos estrictos (Yang *et al.*, 2007; 2012). Es importante tener en cuenta que se asocia la fase predadora de estas especies de hongos con el desarrollo de diferentes elementos o estructuras, como por ejemplo *anillos constrictores* o *trampas adhesivas* en el caso de atrapanematodos (Fig. 3). Por tal motivo, algunas investigaciones señalan que las trampas se producen en presencia de nematodos vivos (con movimiento) o por péptidos o extractos de nematodos (Nordbring-Hertz, 1977; Liu *et al.*, 2012). Otros estudios indicaron que la elaboración de trampas y la producción de clamidosporas de *D. flagrans* se estimula en presencia de helmintos

mueritos (trematodos, ascáridos y oxiúridos), y de sus productos antigénicos de excreción/secreción (Arias *et al.*, 2013b).

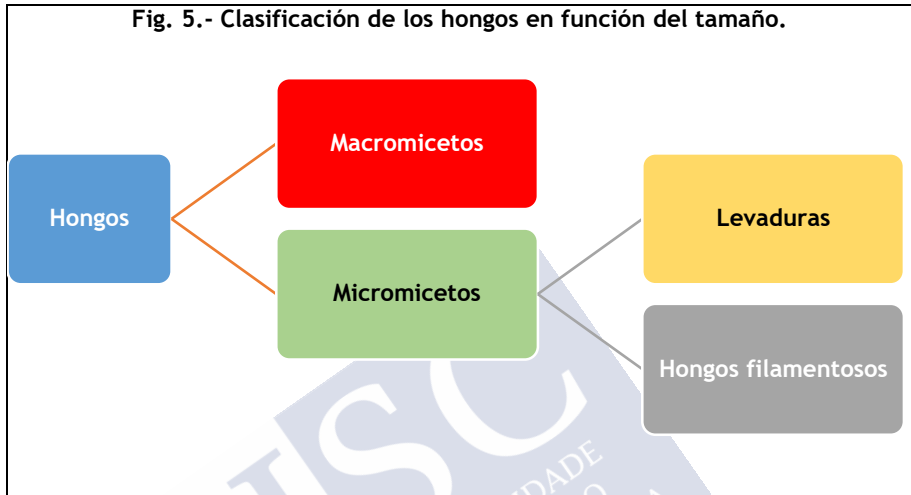
El concepto de *nemina* ha venido subrayándose desde hace décadas como un conjunto de sustancias que se encuentran en la cubierta de nematodos parásitos, que constituye una señal para la producción de trampas en hongos filamentosos (Pramer y Stoll, 1959). Al principio se estableció que podría tratarse de algún aminoácido o de un pequeño polipéptido de nematodos parásitos (Pramer y Kuyama, 1963), pero Arias *et al.* (2013b) comprobaron que la presencia de trematodos adultos, o de extractos metabólicos (antígenos de excreción/secreción) de *Fasciola hepatica* y *Calicophoron daubneyi*, estimulaban el desarrollo de *D. flagrans*; también se demostró que larvas de especies que en condiciones naturales nunca entrarían en contacto con estos hongos, como *Anisakis* spp., servían de estímulo para el desarrollo de micelio y producción de trampas. Hsueh *et al.* (2017) concluyeron que existen diferentes aminoácidos, así como extractos de nematodos, que pueden estimular la creación de trampas por hongos nematófagos. A este respecto, se ha investigado el papel de *ascarósidos*, una familia de moléculas de señalización sintetizadas por nematodos, en la inducción de elaboración de trampas (Choe *et al.*, 2012; Hsueh *et al.*, 2013).

1.3. ESTRUCTURA Y MORFOLOGÍA DE HONGOS

La pared celular está formada por capas o estratos constituidos por polímeros polisacáridos como quitina, celulosa, glucanos y mananos. También se describen proteínas asociadas a polisacáridos y lípidos. Se trata de un exoesqueleto rígido que protege a la célula y condiciona su nutrición, que como ya se ha indicado, se produce por absorción de nutrientes digeridos directamente del medio o después de la participación de enzimas liberadas, dado que la estructura de la pared impide la endocitosis. Esto supone una notable diferencia con las especies vegetales, que también presentan paredes celulares de celulosa, y además son capaces de sintetizar carbohidratos mediante fotosíntesis.

Atendiendo a su tamaño se distinguen dos tipos de hongos (Fig. 5), macroscópicos o *macromicetos* y microscópicos o *micromicetos*, que a

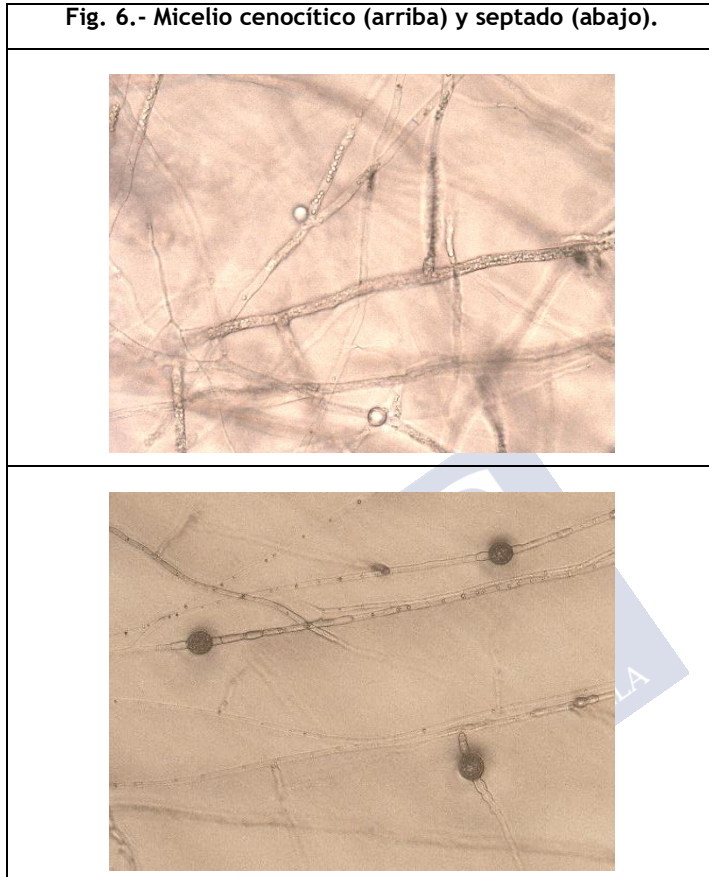
su vez se pueden encontrar como estructuras unicelulares (levaduras) o pluricelulares (mohos u hongos filamentosos), e incluso existen especies dimórficas que presentan las dos formaciones.



Algunos hongos crecen de forma lineal y dan lugar a largos filamentos, las *hifas*, que se desarrollan en general mediante elongación del extremo distal, originando en ocasiones *micelios* visibles macroscópicamente, como por ejemplo en mohos o setas comestibles. Desde el punto de vista de la propagación, es importante tener en cuenta que prácticamente cada fragmento de una hifa se puede convertir en un potencial punto de crecimiento, que dará lugar a nuevos individuos.

Ciertas especies de hongos no llegan a desarrollar un micelio verdadero, como en el caso de las levaduras, hongos unicelulares. En función de la presencia de hifas septadas o tabicadas, se definen *micelios septados* y *micelios cenocíticos* (Carrillo, 2003) (Fig. 6).

Según la localización, se describe el *micelio vegetativo* o parte que se introduce en los sustratos de los que se alimenta, y el *micelio aéreo o reproductor*, que se ubica en la superficie y contiene las estructuras reproductoras.



El *micelio vegetativo* es responsable del crecimiento del hongo, para lo cual desarrolla una serie de modificaciones orientadas a satisfacer las funciones nutricionales, de sostén y de defensa en el ambiente (Tabla 3, Fig. 7). Se trata de estructuras de gran importancia también para la identificación de diferentes especies.

El *micelio aéreo* o de *reproducción* es responsable de la multiplicación del hongo, mediante la producción de *esporas* por reproducción sexual o asexual. En la reproducción *sexual* tiene lugar la unión de dos núcleos, a través de órganos sexuales, mientras que en la *asexual* no se fusionan los núcleos.

Tabla 3. En el micelio vegetativo se originan modificaciones.	
Apresorio	Ensanchamiento o engrosamiento distal de las hifas para facilitar su adherencia a superficies que van a ser penetradas.
Haustorio	Estructura dentro del apresorio que penetra en tejidos o células para tomar su contenido.
Espiga	Adelgazamiento distal de las hifas, que se introduce en la cutícula para alimentarse.
Rizoides	Prolongaciones en forma de pequeñas raíces que facilitan la sujeción al sustrato.
Clamidosporas	Células de resistencia que presentan una pared celular doble y albergan nutrientes de reserva. Viabilidad prolongada.
Plecténquimas	Pseudotejidos.
Prosénquima	Plecténquimas con células alargadas.
Pseudoparénquima	Formado por células que se agrupan en capas externas y dan lugar a la corteza.
Rizomorfo	Cordón plectenquimático que da lugar a estructuras similares a raíces, con funciones nutritivas y de sujeción a sustratos.
Esclerocio	Cuerpos macizos de elevada resistencia.

Los hongos *holocárpicos*, como por ejemplo *Synchytrium endobioticum* que afecta a la patata, se caracterizan por un micelio que en las primeras partes de su ciclo vital realiza funciones vegetativas, y posteriormente se transforma en micelio reproductivo.

Las especies *eucárpicas* son mayoría, y en ellas el micelio reproductivo existe al mismo tiempo que el vegetativo.

Fig. 7.- Los hongos filamentosos desarrollan hifas, que se extienden y en algunas especies dan lugar a formas de resistencia como esporas y clamidosporas.



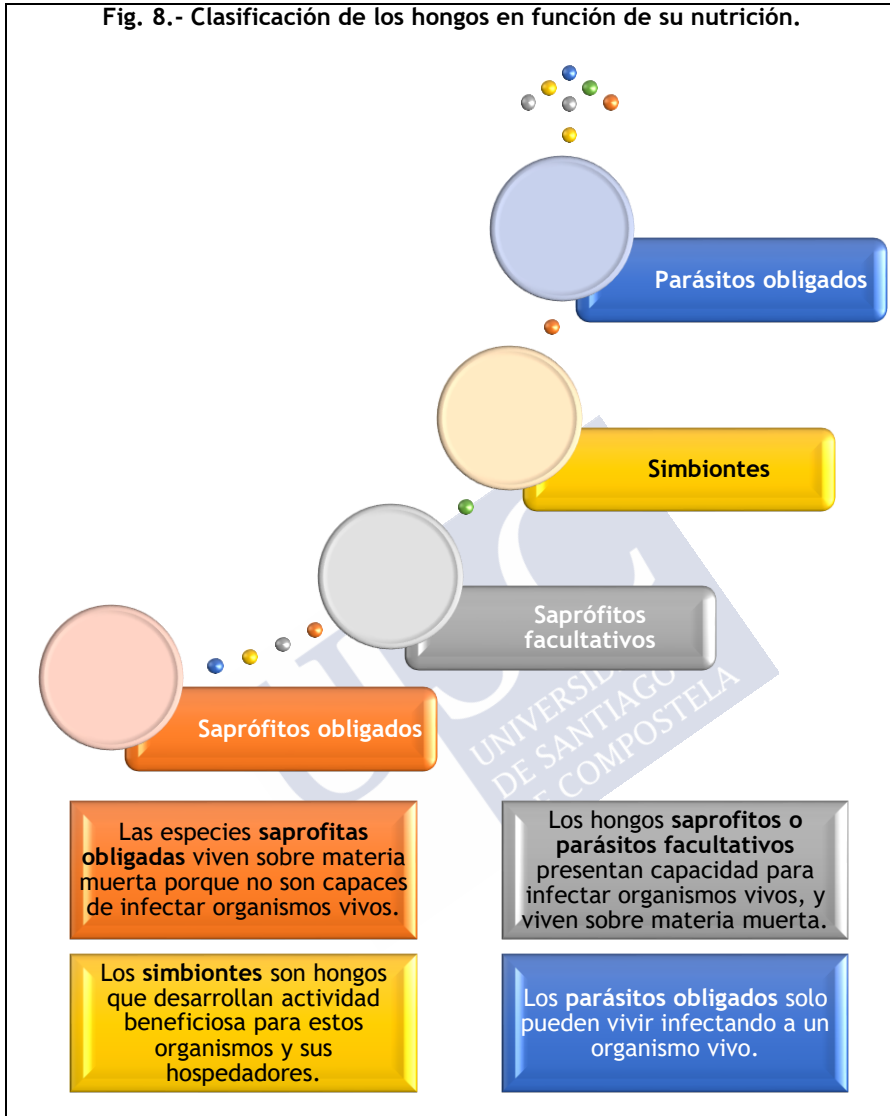
1.4. METABOLISMO DE HONGOS

Gran parte de las especies de hongos identificadas y descritas actúan como descomponedores primarios de materia orgánica; en otros, destaca la capacidad de sintetizar una amplia gama de aminoácidos, pigmentos o productos con actividad antibiótica, e incluso antiparasitarios; por último, hay que tener en cuenta el potencial tóxico de otras especies (Wisecaver *et al.*, 2014). Gracias a la liberación de *exoenzimas*, los hongos tienen capacidad para degradar un gran número de componentes, que incluyen la celulosa y la lignina, los dos biopolímeros más abundantes en el suelo (Walker y White, 2018). En la figura 8 se describen las diferentes estrategias utilizadas por los hongos para satisfacer sus necesidades nutricionales.

Los hongos se pueden encontrar en casi todos los tipos de hábitats, en los que se reproducen y crecen rápidamente para evitar que otros competidores accedan a su fuente de nutrientes (Goyal *et al.*, 2016). Algunos viven en simbiosis con el hospedador (micorrizas, líquenes), y otros de materia orgánica en descomposición (saprófitos). En todos estos procesos liberan metabolitos frente a diferentes estímulos y con distinta actividad. Se denominan *metabolitos primarios* a aquellos que resultan esenciales para el crecimiento y la reproducción, en tanto que se consideran *metabolitos secundarios* algunos importantes que no son esenciales para su supervivencia (Keller *et al.*, 2005).

La clasificación de los metabolitos fúngicos en primarios y secundarios obedece a criterios arbitrarios cuando se aplica a las rutas metabólicas en lugar de a sus productos, no solo porque la esencialidad de una ruta dada es específica de la especie, sino también porque las rutas que generan metabolitos primarios y secundarios no son mutuamente excluyentes (Greene *et al.*, 2014). Posiblemente resulte más comprensible clasificar las vías en aquellas compartidas por la mayoría de los organismos, que pueden considerarse como pertenecientes al metabolismo general, y aquellas vías especializadas que han evolucionado en respuesta a las ecologías específicas de ciertas especies.

Fig. 8.- Clasificación de los hongos en función de su nutrición.



En la actualidad, se establece que una gran parte de los efectos beneficiosos de los hongos reside en la gran cantidad de metabolitos que sintetizan, como enzimas (celulasa, lipasa, enzimas ligninolíticas), alcaloides (alcaloides del cornezuelo de centeno de *Claviceps*), pigmentos (antraquinona, betalainas), aromas y sabores, así como en el

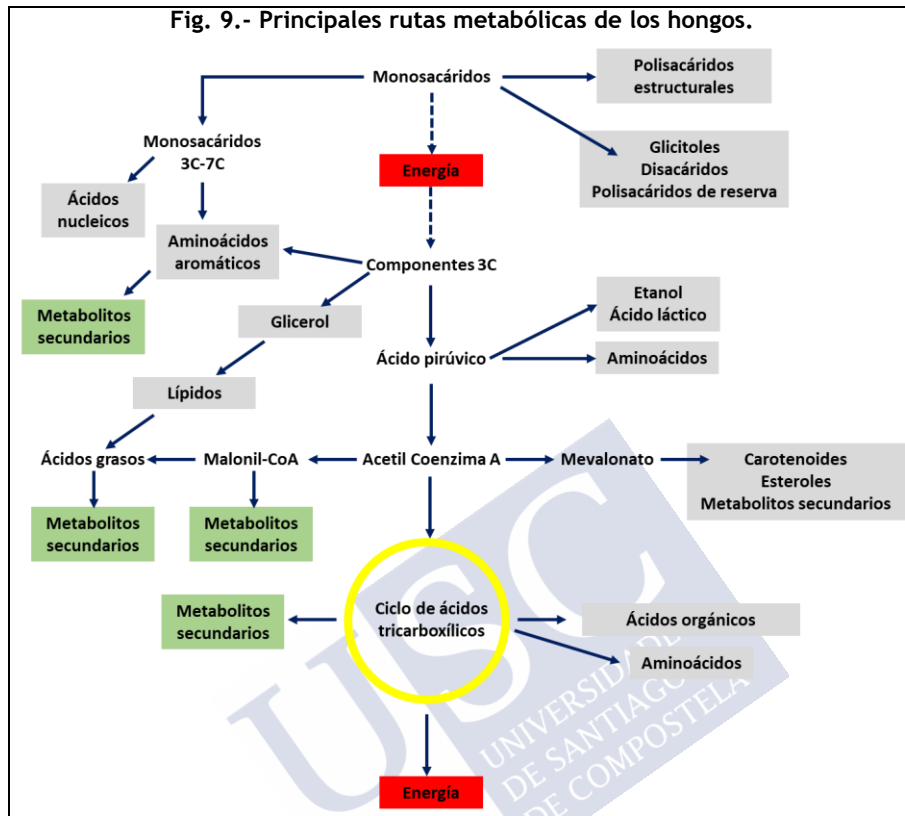
control biológico de nematodos, y en la prevención o tratamiento del Parkinson, Alzheimer, hipertensión, cánceres y alto riesgo de accidente cerebrovascular (Deacon, 2006). Desde un punto de vista estructural, los metabolitos comprenden sustancias como hidrocarburos alifáticos y aromáticos, ácidos orgánicos, ésteres, cetonas, aldehídos, alcoholes y mono-, sesqui- y diterpenos (Walker y White, 2018).

1.4.1. Nutrición

Debido a que su pared celular es rígida no pueden englobar los alimentos (pinocitosis, fagocitosis). Los extremos en crecimiento de las hifas expulsan enzimas sobre la materia orgánica en que crecen. Las cadenas de carbohidratos se degradan en compuestos más sencillos como glucosa o aminoácidos, lo suficientemente pequeños como para absorberlos por las paredes de las hifas, hasta el citoplasma del hongo.

Para comprender el crecimiento y desarrollo de hongos en diferentes sustratos y condiciones, es indispensable conocer las rutas metabólicas básicas (Fig. 9). Los requerimientos nutricionales de los hongos son muy simples, precisando una fuente de nutrientes orgánicos para suministrar energía y carbono para la síntesis celular.

Los hongos tienen requerimientos nutricionales sencillos, y la mayoría de las especies conocidas se desarrollan en aerobiosis si disponen de glucosa, sales de amonio, iones inorgánicos y algunos factores de crecimiento (Walker y White, 2018). Necesitan fuentes de macronutrientes como carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre, fósforo, potasio y magnesio; entre los micronutrientes se encuentran elementos traza como calcio, cobre, hierro, manganeso y zinc. Algunas especies son *oligotróficas*, y sobreviven mediante la captación de componentes orgánicos volátiles de la atmósfera.



Se trata de especies *quimio-organotróficas* y *no-diazotróficas*, lo que significa que precisan fijar formas de compuestos orgánicos para sus necesidades de energía y carbono, y que no son capaces de fijar nitrógeno (Tabla 4). Para lograr energía y carbono, se sirven de glúcidos de diferente tamaño, desde hexosas como la glucosa hasta polisacáridos como la celulosa o el almidón, y en ocasiones algunas especies pueden emplear hidrocarburos aromáticos como la lignina.

En relación con los requerimientos de oxígeno, la mayoría de los hongos conocidos son aeróbicos, más bien microaerofílicos, y precisan de tensiones de oxígeno inferiores a las normales en la atmósfera.

El aporte de nitrógeno lo obtienen a partir de sales de amonio o como aminoácidos. El sulfato de amonio se emplea con frecuencia

como fuente de nitrógeno porque proporciona además una fuente de azufre aprovechable. Existen algunas especies que pueden crecer sobre nitratos, e incluso aprovechar nitritos, debido a la presencia de nitrato y nitrito reductasas. Es importante tener en cuenta que muchas especies son capaces de obtener nitrógeno mediante la liberación de enzimas proteolíticas que hidrolizan proteínas y liberan aminoácidos a partir de sustratos como la urea.

Elemento	Fuentes más frecuentes	Función celular
C	Glúcidos	Estructural / Energía
O	Aire	Respiración / Síntesis de ergosterol y ácidos grasos insaturados
N	Sales de amonio, urea, aminoácidos	Estructural / Funcional como proteínas y enzimas
P	Fosfatos	Energía / Ácidos nucleicos / Estructura
K	Sales de potasio	Balance iónico / Enzimas
Mg	Sales de magnesio	Enzimas / Estructural
S	Sulfatos, metionina	Aminoácidos y vitaminas
Cu	Sales de cobre	Transducción
Mn	Sales de manganeso	Enzimas
Fe	Sales férricas	Citrocromos

Las fuentes más importantes de azufre incluyen sulfatos, sulfitos, tiosulfatos, metionina y glutatión, así como sulfatos inorgánicos y la metionina aminoácida sulfúrica.

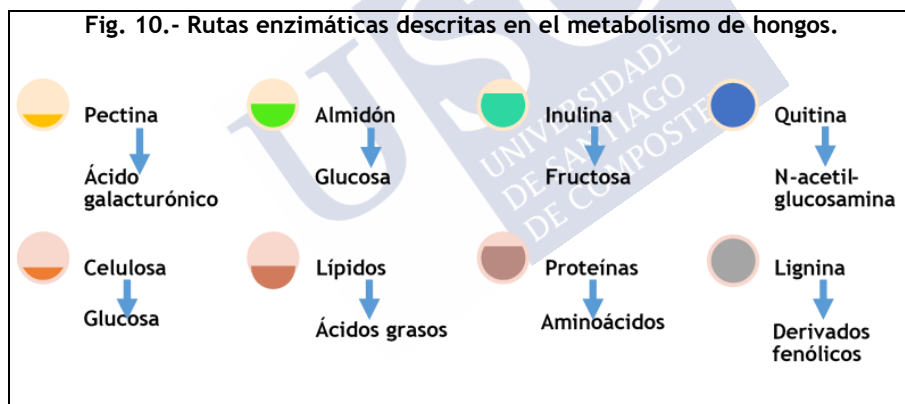
El fósforo resulta esencial para realizar la biosíntesis de ácidos nucleicos, fosfolípidos, ATP, glicofosfatos y polifosfatos. Junto con el nitrógeno, pueden ser factores limitantes del crecimiento en el ambiente, de modo que los hongos filamentosos han desarrollado

diversas estrategias bioquímicas y morfológicas para capturarlo en el ambiente.

En relación con los minerales, son necesarios macronutrientes como potasio y magnesio para el crecimiento, en tanto que otros como el manganeso, calcio, hierro o cobalto se requieren a concentraciones micromolares.

En ocasiones, algunas especies precisan de compuestos orgánicos como vitaminas, purinas, pirimidinas, nucleósidos, nucleótidos, aminoácidos, ácidos grasos y esteroides, que actúan como factores de crecimiento.

En la figura 10 se exponen algunas de los ejemplos más característicos de rutas enzimáticas desarrolladas por hongos para la degradación de compuestos poliméricos.

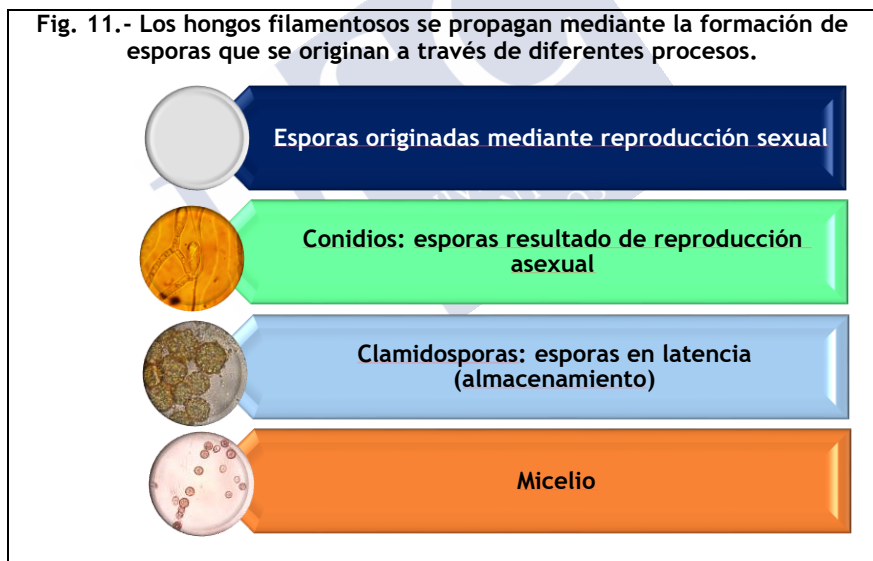


1.5. MULTIPLICACIÓN DE ESTADIOS FÚNGICOS

Los hongos pueden realizar reproducción asexual o sexual, clasificándose de este modo las especies en *anamorfos* y *teleomorfos*, respectivamente. La reproducción asexual es la más frecuente, sobre todo en condiciones *in vitro*. Se ha demostrado que las hifas de hongos pueden extenderse casi de forma ilimitada mediante crecimiento apical, cuando disponen de nutrientes y condiciones ambientales adecuadas.

En laboratorio se utilizan con frecuencia medios de cultivo en agar enriquecido con compuestos ricos en carbono y pH ácido, como extractos de malta, dextrosa-patata o caldo.

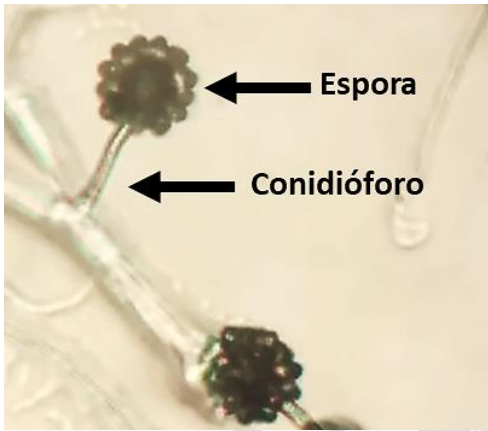
En condiciones industriales, es preciso optimizar la fermentación de hongos en relación con la aplicación específica a la que están destinados, y el procedimiento de producción. Por ello, resulta indispensable tener en cuenta las diferentes vías que existen para la propagación de hongos filamentosos (Fig. 11). Numerosas especies pueden hacerlo mediante la formación de esporas a través de reproducción sexual, que tiene lugar de forma infrecuente en condiciones *in vitro*; mediante reproducción asexual que da lugar a conidios y clamidosporas, y también por micelio.



Aunque se describen mecanismos de reproducción sexual, en realidad no existen evidencias o son difíciles de encontrar cuando se procede a la propagación de hongos filamentosos en condiciones de laboratorio. No se dispone de datos relacionados con *D. flagrans*, pero algunas investigaciones señalan que en algunas especies la reproducción sexual

ocurre una vez al año (Nieuwenhuis y James, 2016). Ciertos hongos patógenos se reproducen de forma asexual durante la fase de crecimiento si disponen de gran cantidad de nutrientes, pero cuando disminuyen, en condiciones ambientales desfavorables para el desarrollo, emplean la reproducción sexual (Dyer y Paoletti, 2005).

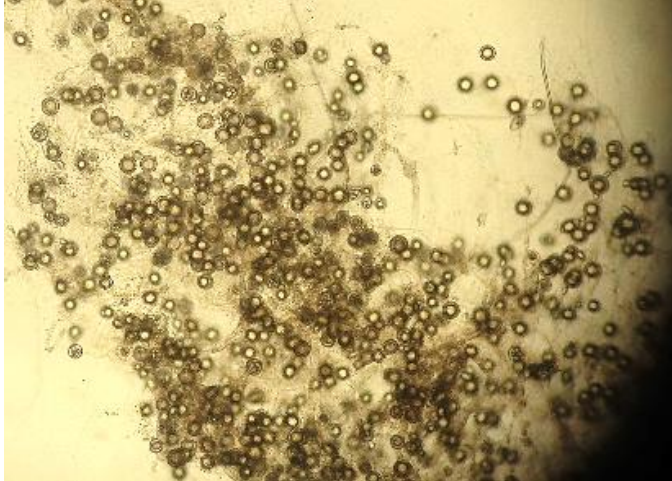
Fig. 12.- Los hongos filamentosos se propagan mediante la formación de esporas que se originan a través de diferentes procesos.



Lo habitual es que se formen esporas mediante reproducción asexual, y por divisiones mitóticas se originan diferentes estadios. Los **conidios** tienen resistencia elevada a la desecación, y normalmente surgen a partir de células o hifas conidiógenas, que se diferencian del micelio en conidióforos (Fig. 12).

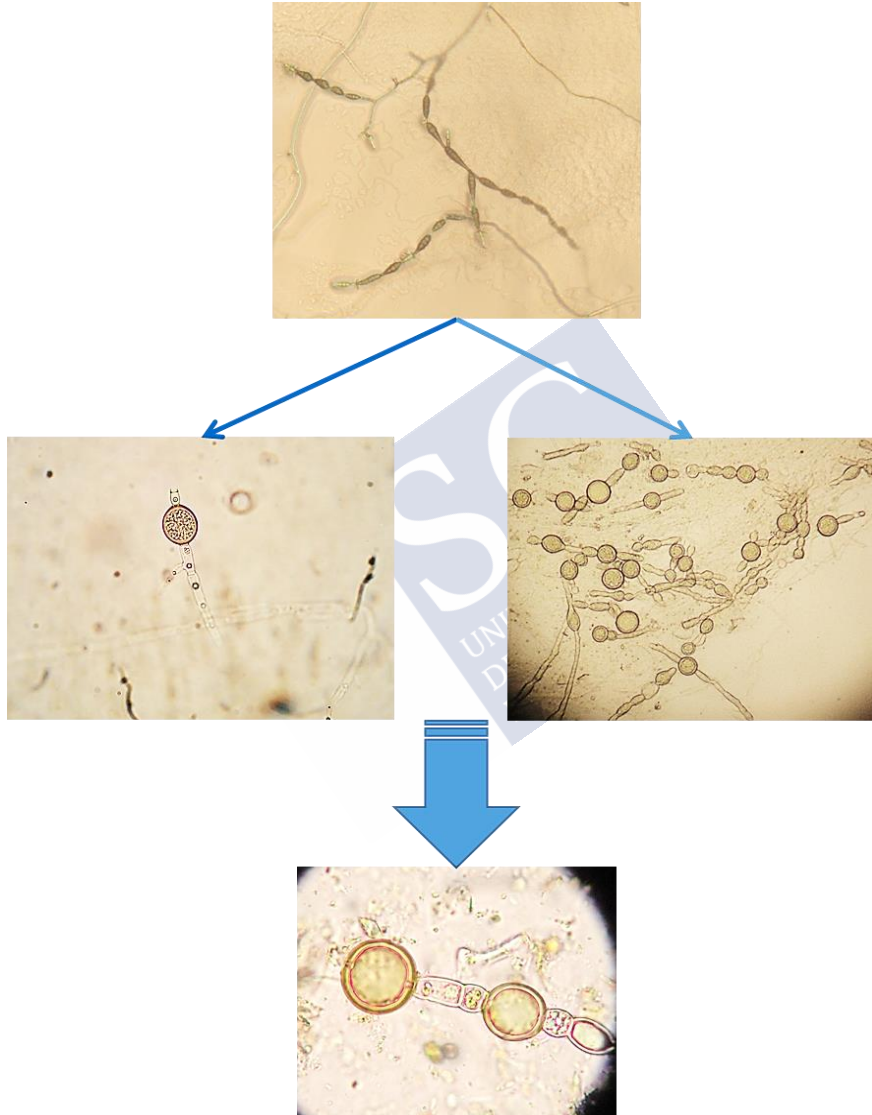
Se ha descrito que ante condiciones de estrés, tiene lugar la formación de conidios mediante reproducción asexual simplificada o *microcíclica*, en la que los conidios originan directamente otros conidios sin formar micelio (Jung *et al.*, 2014). Esta podría ser la explicación a la presencia de un número elevado de esporas acompañado de un reducido desarrollo de hifas vegetativas, que tiene lugar al emplear en medios de cultivo líquido (Fig. 13).

Fig. 13.- Mediante reproducción asexual simplificada (microcíclica) se originan conidios sin la formación previa de micelio.



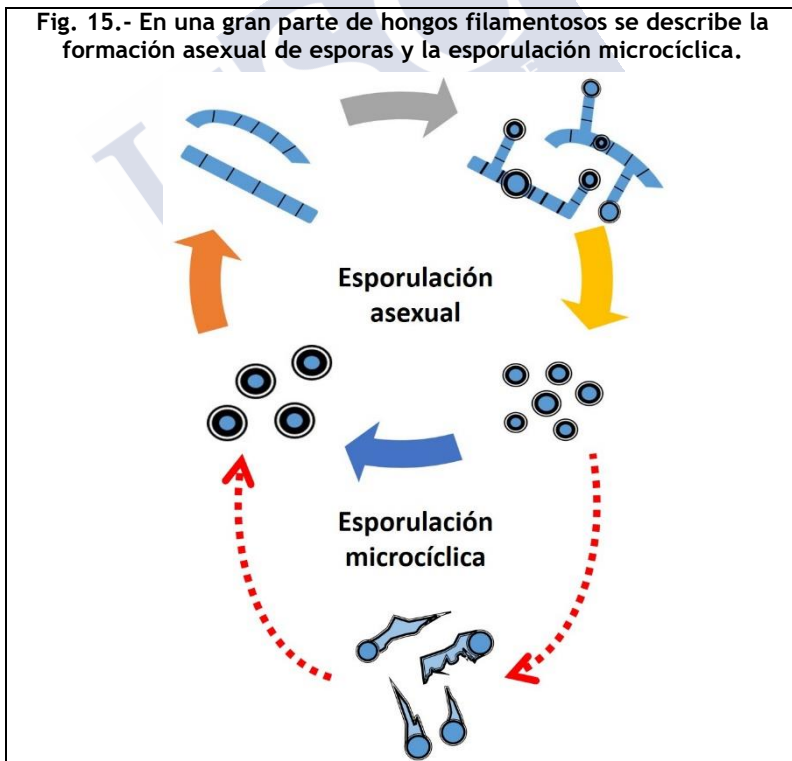
Las **clamidosporas** son esporas de resistencia o latencia, con una doble pared que facilita su clasificación morfológica. Pueden ser *intercalares* o *terminales*, en función de que se originen en la parte media de las hifas o en el extremo distal (Fig. 14). Se trata de esporas de pared gruesa y morfología ovoide o elíptica, de tamaño aproximado de 25-50 μm de largo por 10-15 μm de ancho, si bien estas características varían en función de la composición de los medios en los que crecen. Una vez formadas, se separan del micelio, y en condiciones favorables, dan lugar a nuevo micelio. Se ha establecido que ante condiciones ambientales desfavorables, tiene lugar la transferencia de sustancias alimenticias de reserva desde células de hifas somáticas a otra célula, conduciendo al engrosamiento de su pared celular.

Fig. 14.- Las clamidosporas son esporas que se originan de forma asexual, intercalándose en el micelio, o en la porción apical de las hifas.



Debido a que algunas especies son capaces de sobrevivir al tránsito por el tracto gastrointestinal, salir en las heces al exterior y desarrollar micelio en presencia de materia orgánica en descomposición o de larvas de nematodos, se han venido empleando en pruebas de control biológico (Gronvold *et al.*, 1993; Larsen *et al.*, 1995; Fernández *et al.*, 1999; Mendoza *et al.*, 2006; Madeira de Carvalho *et al.*, 2012; Healey *et al.*, 2018).

En la figura 15 se representan los mecanismos más habituales de esporulación en hongos Ascomycetes, Basidiomycetes o Zygomycetes, que son la formación asexual de esporas (conidios y clamidosporas) y la esporulación microcíclica. Como se puede apreciar, la diferencia fundamental consiste en la ausencia de la formación de micelio en esta última.



1.5.1. Factores relacionados con la esporulación de hongos

Como ya se ha indicado previamente, las esporas de hongos son células especializadas que actúan como elementos de reposo o de dispersión (Kirk *et al.*, 2008). Estas estructuras aportan una notable información para la identificación y clasificación de especies fúngicas, pero existen algunos aislados que no esporulan en los medios empleados con frecuencia, como agar-dextrosa patata (*Potato Dextrose Agar*, PDA). Entre las posibles causas, se considera que la esporulación es un proceso complejo en el que participan factores ambientales y endógenos.

Ciertas investigaciones señalaron que la luz puede constituir un estímulo importante para la formación de conidios, y por ello se ha expuesto el micelio de algunas especies de Ascomycetes, Basidiomycetes y Zygomycetes a luz próxima a UV y a luz azul, obteniéndose resultados muy satisfactorios (Xu *et al.*, 2009). No se ha determinado todavía el mecanismo por el que puede suceder este fenómeno, pero se ha demostrado que las longitudes de onda de 350-550 nm son más eficaces (Dahlberg y Etten, 1982).

Un número importante de factores nutricionales influyen de forma significativa en la formación de esporas, como las fuentes de carbono, nitrógeno o microelementos, estableciéndose que algunos hongos presentan una elevada especificidad por algunos nutrientes (Su *et al.*, 2012). En un experimento desarrollado con diferentes hongos empleados en control biológico, Gao *et al.* (2007) comprobaron que *Lecanicillium lecanii*, *Trichoderma viridae* y *Metarhizium anisopliae* producían las tasas más elevadas de esporas en un medio con un ratio C:N de 160:1.

La formación de esporas tiene lugar cuando la tasa de crecimiento se reduce, y se dificulta bajo condiciones que favorecen el crecimiento micelial rápido. La inanición o la limitación de nutrientes suponen un estímulo para la esporulación, razón que ha llevado a la aplicación de medios con escasos nutrientes (empobrecidos) (Wulandari *et al.*, 2009), como agar-agua o PDA a la mitad o a un cuarto.

Algunos suplementos químicos parecen ejercer un estímulo de la esporulación, como la biotina, que pueden incentivar la expresión selectiva de determinados genes, o el CaCO_3 (Masangkay *et al.*, 2000).

La temperatura es un factor que también interviene en la esporulación microcíclica (Hanlin, 1994).

1.6. PROPAGACIÓN DE HONGOS EN MEDIOS DE CULTIVO

El crecimiento de los hongos comienza con una o varias esporas que permanecen en latencia hasta que se consiguen los nutrientes necesarios para su activación (Krull *et al.*, 2013). La germinación se inicia con un proceso de hinchazón provocado por la gran cantidad de agua que absorben, que provoca que las esporas se extiendan de forma isotrópica, después de la cual surge un tubo germinal (Osherov y May, 2001). El crecimiento de las hifas está polarizado, con una tasa de extensión lineal hacia el ápice de hifas. A lo largo de las hifas, los precursores de paredes celulares y proteínas que participan en la síntesis de pared celular son transportados en vesículas desde el retículo endoplásmico al extremo de la hifa. La elongación de hifas lleva a la formación de septos y compartimentos en las hifas, y debido a la acumulación y exceso de vesículas de transporte, tiene lugar la ramificación en compartimentos subapicales. Cuando una hifa alcanza una cierta longitud, se origina una ramificación lateralmente a la original (Barry y Williams, 2011).

El ciclo típico de hongos filamentosos incluye la esporulación después de un periodo de crecimiento vegetativo. Como se ha indicado anteriormente, los hongos filamentosos producen diferentes tipos de esporas asexuales, macroconidios, microconidios y clamidosporas. La producción asexual de esporas es crítica porque contribuyen a la supervivencia de los hongos bajo condiciones ambientales desfavorables, como una medida de dispersión de un punto a otros potencialmente viables. Las esporas permanecen latentes hasta que concurren condiciones ambientales favorables, y entonces comienzan a hincharse con agua que contiene nutrientes apropiados, y se produce el crecimiento vegetativo de las hifas que dará lugar a tubos germinales. Sin embargo, algunas especies de hongos exhiben un ciclo asexual

extremadamente simplificado cuando se somete a condiciones de estrés, en los que los conidios germinan y dan lugar directamente a más conidios, sin formar micelio, en un fenómeno denominado *esporulación microcíclica* (Jung *et al.*, 2014).

1.6.1. Medios sólidos

La mayoría de los procedimientos decultivo se han orientado a la producción de estructuras fúngicas en medio de cultivo sólido, compuesto a base de agar bacteriológico, como el empleado en cultivos microbiológicos, en placas Petri que se mantienen en estufa a 20-25°C durante 15-20 días (Arias *et al.*, 2013a) (Fig. 16).

El agar o agar-agar es un polisacárido sin ramificaciones obtenido de la pared celular de varias especies de algas rojas de los géneros *Gelidium*, *Eucheuma* y *Gracilaria*, entre otros, resultando, según la especie, de un color característico. El agar bacteriológico se obtiene fundamentalmente del alga roja *Gelidium sesquipedale*, es una mezcla de polisacáridos compuesta por moléculas neutras (agarosas) y otras cargadas eléctricamente (agaropectinas), a las que se adicionan distintos nutrientes según el tipo de bacteria a cultivar.

Fig. 16.- Cultivo de hongos en placas Petri con agar-trigo.



Desde el punto de vista físico se caracteriza por disolverse en agua hirviendo, formando al enfriarse, sin necesidad de añadir ningún

producto químico, un gel que no vuelve a fundir hasta superados los 85°C. Cuando se utiliza para cultivos bacteriológicos se somete a determinados tratamientos físico-químicos que garantizan la ausencia de sustancias hemolíticas e inhibidores que puedan impedir el desarrollo óptimo de microorganismos, además de asegurar la reproductibilidad de los lotes. Presenta la gran ventaja de que casi ningún microorganismo es capaz de degradarlo, por lo que las placas fabricadas con él no se alteran.

El agar comestible, también denominado agar marino, es un polisacárido natural, obtenido a partir de algas rojas de la familia Rhodophyceae. Se comercializa en forma de polvo o como filamentos deshidratados a los que se añade agua para conseguir una textura gelatinosa.

El agar (bacteriológico y comestible) es indigerible y entre sus propiedades destacan:

- Es un hidrocoloide completamente soluble en agua a 100°C.
- Se puede disolver a bajas temperaturas.
- Hinchaba en contacto con agua fría, aumentando hasta 30 veces su volumen.
- No aporta sabor, aroma o color.
- Es un poderoso agente gelificante.
- Es un gel termoreversible.
- Gelifica entre 35°C y 43°C, y funde a 85°C y 95°C.
- No aporta calorías.
- Es ligeramente saciante y laxante.
- Único hidrocoloide que soporta esterilización en estado viscoelástico.

Como se deduce de su nombre, el medio *agar-agua* se prepara con agar (bacteriológico) únicamente, y en realidad no se emplea para la obtención de esporas o micelio, sino más bien en la selección de cepas monoconidiales, purificación de hongos, etc.

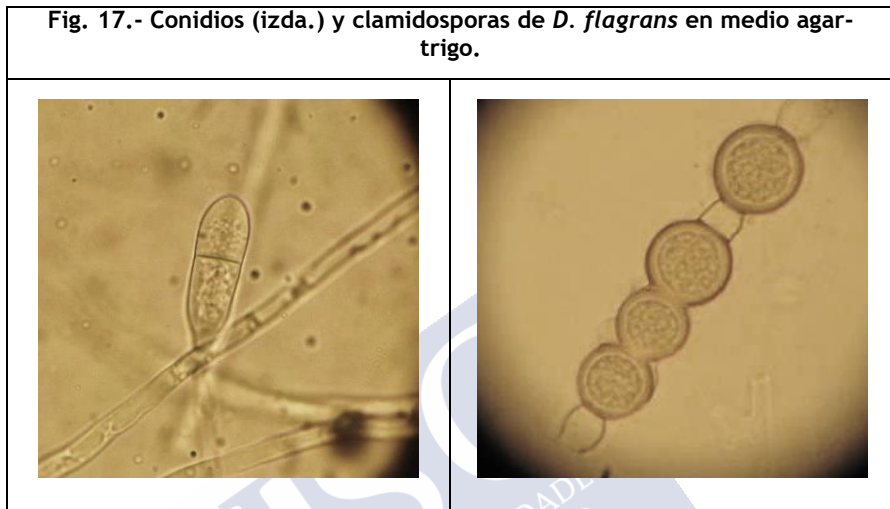
Con objeto de producir elevadas cantidades de hongos (micelio, esporas), se añaden al agar-agua diferentes nutrientes, pero sobre todo cereales, que estimulan el crecimiento de diferentes estructuras (Chandrawathani *et al.*, 2002). El más empleado es a base de *agar-trigo*, y también se ha utilizado *agar-maíz* y otras combinaciones (Tabla 5).

Composición del medio	Referencia
Agar-agua	Maciel <i>et al.</i> (2010)
Agar-trigo	Llerandi-Juárez y Mendoza de Gives (1998) Arias <i>et al.</i> (2011)
Agar-avena	Almendros (2016)
Agar-harina de maíz	Maciel <i>et al.</i> (2010)
Agar-arroz	Sagüés <i>et al.</i> (2012)
Arroz	Rodrigues <i>et al.</i> (2018)

Aunque este procedimiento puede llegar a ser muy eficaz, entraña una serie de inconvenientes que pueden suponer un contratiempo cuando se persigue la producción a gran escala. La presencia de agar bacteriológico impide que estos medios puedan administrarse directamente a los animales; tampoco se favorece la distribución de hongos mediante pulverización de soluciones líquidas. Por estos motivos, una vez transcurrido un periodo de tiempo que permite el crecimiento de los hongos, se procede al *raspado* de la superficie del medio de cultivo (Sagüés *et al.*, 2012).

Maciel *et al.* (2006) estudiaron la producción de esporas de *D. flagrans* en medios a base de agar y agua, harina de maíz, extracto de levadura, almidón soluble y dextrosa-patata, y obtuvieron el mayor número en este último medio. También se ha considerado la adición de diferentes sustancias con el propósito de incrementar la producción de clamidosporas (Fig. 17). Arias *et al.* (2013b) analizaron el efecto de la adición de antígenos de excreción/secreción y somáticos de trematodos (*Fasciola hepatica*, *Calicophoron daubneyi*) y de nematodos gastrointestinales (*Parascaris equorum*, *Oesophagostomum* spp.) sobre el desarrollo de *D. flagrans*, obteniendo notables incrementos (entre 1,5 y 4 veces superiores) en presencia de los productos antigénicos del trematodo gástrico. Al añadir los parásitos adultos muertos, los mejores resultados se consiguieron con ambos trematodos. De este modo concluyeron que la presencia de larvas vivas de nematodos no era necesaria para que el hongo atrapanematodos *D. flagrans* se

desarrollase y formase trampas en su micelio, como se señaló en estudios previos (Nordbring-Hertz, 1977; Boguś *et al.*, 2005).



Mediante la adición de meso-inositol al 0,5% a medio agar-glucosa-Sabouraud, se consiguió un promedio de 51.715.000 clamidosporas por placa después de cuatro semanas a 27°C (Sagüés *et al.*, 2012).

De forma tradicional, se ha explicado que la producción de clamidosporas tiene lugar ante condiciones ambientales adversas, sobre todo de deshidratación o sequedad (Barron, 1979). Recientemente, Blair y Biddle (2020) sembraron placas de agar-harina de maíz con *D. flagrans* y las mantuvieron a 30°C durante 26 días. A continuación, un lote se sometió a deshidratación rápida (38°C, 37% humedad relativa (HR) durante 48 horas, y otro de forma lenta (24°C, 55% HR, 10 días), manteniendo un lote testigo a 30°C sellado con parafilm para evitar la pérdida de humedad. De este modo se obtuvieron unos rendimientos más elevados de clamidosporas en los lotes expuestos a deshidratación (42.780/mL y 39.260/mL, respectivamente, frente a 21.480 en los testigos). Además, estos autores también señalaron que los recuentos de clamidosporas deberían hacerse siempre después de la desecación de

las placas, porque en caso contrario, se incurría en errores importantes que conducían a la sobredosificación de los animales. Estos resultados podrían inducir a considerar que los medios con agar y cereales no parecen adecuados para la producción de clamidosporas, y los medios líquidos quedarían completamente descartados. Sin embargo, entre las señales que existen en el ambiente para inducir la producción de clamidosporas, se incluyen nutrientes, osmolaridad, luz, pH, temperatura, aire, sustancias químicas y estimulantes vegetales (Hebbar *et al.*, 1998; Lin y Heitman, 2005).

Aunque no tiene el objetivo de obtener clamidosporas a gran escala, en ocasiones se ha defendido la adición de larvas de *Panagrellus redivivus* con el fin de estimular la producción de estas estructuras (Flores *et al.*, 1999; Araújo *et al.*, 2010; Braga *et al.*, 2014). Esto supone una cierta incoherencia en el empleo de hongos como agentes de control biológico, dado que la especie mencionada es un nematodo de vida libre, y se ha explicado de forma profusa el carácter *selectivo* de la acción nematocida de *D. flagrans* (Paz-Silva *et al.*, 2011).

1.6.2. Medios líquidos

La utilización de medios líquidos en biofermentadores o biorreactores para el cultivo y propagación de especies fúngicas se encuentra muy extendida, sobre todo para la obtención de sustancias de interés, como se explicó anteriormente (*cf.* 9) (Veiter *et al.*, 2018). Desde un punto de vista práctico, aplicable a la distribución de especies útiles para el control biológico de parásitos, cobra sentido el empleo de estos medios puesto que presenta ciertas ventajas (Hernández, 2019): el coste es inferior al de medios sólidos, no se producen colonizaciones por ácaros, y la distribución resulta facilitada, puesto que es posible recurrir a procedimientos como pulverización, y la mezcla con diversos nutrientes para elaborar alimentos es muy sencilla. Un ejemplo lo constituye la elaboración de pellets nutricionales con esporas de hongos antagonistas de parásitos (Hernández *et al.*, 2016).

Gardner *et al.* (2000) prepararon tres medios líquidos a base de extracto de malta, levadura, peptona y glucosa (MPYG), glucosa y sales

minerales de Vogel (Vogel-Boner, VB), obteniendo los mejores resultados con el medio MPYG, que atribuyeron a la presencia de una fuente de nitrógeno. También prepararon un medio líquido a base de dextrosa Sabouraud (SD, peptona + glucosa), al que añadieron de 1 a 8 g de agar/L, comprobando que se obtenían $8,6 \cdot 10^5$ clamidosporas de *D. flagrans*/mL con una concentración de 5 g agar/L, después de incubar a 25°C durante 14 días.

Para evaluar la producción de micelio de *D. flagrans* y *Monacrosporium thaumasium*, Da Silva *et al.* (2013) emplearon medios a base de dextrosa de soja, de patata, picado de maíz y harina de maíz con agar, pero no encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Arias *et al.* (2013a) señalaron la utilidad de un medio líquido compuesto por harina de trigo, NaCl, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ y la proteína recombinante del tegumento del trematodo *F. hepatica* (FhrAPS), para conseguir producir importantes cantidades de clamidosporas de *D. flagrans* (en torno a 70.000/mL) (Figs. 18-19). Asimismo, demostraron que en este medio se propagaban

Fig. 18.- Cultivo de hongos en medio líquido.



simultáneamente *D. flagrans* y *M. circinelloides*, de modo que teniendo en cuenta que se trata de especies larvicida y ovicida, respectivamente, supone una importantísima contribución para poner en marcha estrategias para el control de parásitos que se transmiten por diferentes estadios.

Con objeto de producir micelio de *D. flagrans*, da Silva *et al.* (2015) prepararon cultivos líquidos a base de agua y subproductos agroindustriales (sémola de arroz, sémola de maíz, bagazo de aguardiente, paja de arroz y cáscara de café); los mejores resultados se obtuvieron con sémola de arroz.

Fig. 19.- Esporas de *D. flagrans* en medio líquido.



Es importante tener en cuenta que en medios líquidos, los hongos pueden mostrarse desde un punto de vista de morfología macroscópica, como una masa dispersa más o menos viscosa, a pellets esféricos formados por agregados de hifas (Krull *et al.*, 2013; Veikeret *et al.*, 2018). En base a la interrelación que se establece entre la morfología de los pellets y los procedimientos de control y de productividad, se ha llegado a establecer que el control de los procesos en el biorreactor requiere pellets pequeños y densos; sin embargo, esta morfología podría dificultar la llegada de nutrientes al interior del pellet, de modo que se considera que la productividad óptima está asociada a un tamaño más grande y menos denso (Dynesén y Nielsen, 2003). No existen datos acerca de la formación de aglomerados en el caso de *D. flagrans*.

1.6.3. Medios bifásicos

En algunas investigaciones se ha indicado que la mayoría de los hongos filamentosos no forman esporas en cultivos líquidos (Trinci, 1972), y aquellos que las originan, se han dividido en dos grupos; algunos como *Verticillium agrarinum* forman esporas incluso durante la fase de crecimiento exponencial bajo condiciones de exceso de

nutrientes, en tanto que otros como *Penicillium chrysogenum* solo lo hacen en ausencia de nutrientes (Righelato *et al.*, 1968; McKoy y Trinci, 1987). En este último grupo, se puede promover la esporulación mediante sistemas de cultivo de dos fases, en los que en el primero se produce biomasa vegetativa, y en el segundo se emplean condiciones de escasez de nutrientes para inducir la formación de clamidosporas. Este procedimiento ofrece una elevada flexibilidad a un coste razonable, y contribuye a reducir el riesgo de contaminación que se produce en fermentaciones en medios sólidos (Jenkins *et al.*, 1998).

Gardner *et al.* (2000) cultivaron la cepa Troll A de *D. flagrans* en medio MYPG durante 2 días, y a continuación transfirieron la biomasa obtenida a medio Vogel-Boner suplementado con peptona, caseína, acetato sódico, almidón o glicerol. Los resultados mostraron que la adición de 5 g de peptona por litro de medio proporcionaba un rendimiento medio de $4 \cdot 10^5$ clamidosporas/mL, por $5,7 \cdot 10^5$ clamidosporas/mL si se añadían 10 g glicerol/L o $6,3 \cdot 10^5$ clamidosporas/mL al adicionar 10 g almidón/L medio. De este modo, concluyeron que no existía un beneficio obvio de la aplicación de un sistema bifásico caracterizado porque la biomasa producida bajo condiciones nutricionales idóneas se transfería a un medio empobrecido para fomentar la esporulación. Se concluyó que las clamidosporas de *D. flagrans* se pueden producir en medios de cultivo líquido.

Después de introducir un inóculo de agar con *D. flagrans* en 150 mL de medio líquido Saboraud y 0,05% agar, e incubar a 25°C durante 7 días, Santurio *et al.* (2009) añadieron este medio sobre 400 g de arroz y lo mantuvieron a temperatura ambiente durante 30 días. A continuación se lavaron los granos, se filtraron y centrifugaron. El pellet resultante se liofilizó, comprobándose que se obtenía un rendimiento de 1×10^5 clamidosporas/gramo de materia seca. El análisis de la capacidad predadora de estas clamidosporas mostró que el 69% de L3 de estrombilidos resultaban atrapadas, concluyéndose que las clamidosporas de *D. flagrans* permanecen intactas y viables después del proceso de liofilización.

1.7. LEGISLACIÓN RELACIONADA CON EL EMPLEO DE HONGOS PARA EL CONTROL PARASITARIO

El destino final de los hongos puede condicionar los métodos aplicados para su propagación, puesto que cada modo de distribución requiere de una formulación con unas características concretas. Recientemente, se ha indicado que las formulaciones más interesantes desde un punto de vista comercial para el hongo *M. circinelloides* resultan en *biocidas* o *aditivos alimentarios* (Hernández, 2019).

1.7.1. Biocidas

Son aquellas *sustancias activas, preparados (que contienen una o más sustancias activas) o microorganismos cuyo objetivo es destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control de otro tipo sobre cualquier organismo nocivo por medios químicos o biológicos*. Hasta la fecha se conocen 23 productos se clasifican en cuatro grandes grupos, **desinfectantes y biocidas generales, conservantes, plaguicidas y otros biocidas** (Hernández, 2019).

1.7.2. Aditivos alimentarios

En el *Reglamento (CE) n° 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2003 sobre los aditivos en la alimentación animal* se establece que un «aditivo para alimentación animal» comprende a todas aquellas sustancias, microorganismos y preparados distintos de las materias primas para piensos y de las premezclas, que se añaden de forma intencionada a los piensos o al agua, con el fin de realizar, en particular, una o varias de las funciones siguientes (apartado 3, artículo 5 del *Reglamento (CE) n° 1831/2003*):

- 1) influir positivamente en las características del concentrado alimentario;
- 2) influir positivamente en las características de los productos animales;

- 3) influir favorablemente en el color de los pájaros y peces ornamentales;
- 4) satisfacer las necesidades alimenticias de los animales;
- 5) influir positivamente en las repercusiones medioambientales de la producción animal;
- 6) influir positivamente en la producción, actividad o bienestar de los animales, especialmente actuando en la flora gastrointestinal o la digestibilidad de los piensos, o
- 7) tener un efecto coccidiostático o histomonostático

1.7.3. Distribución de hongos en explotaciones agropecuarias

En relación con los hongos filamentosos, las experiencias llevadas a cabo hasta la fecha han consistido, de forma mayoritaria, en la administración de clamidosporas de *Duddingtonia flagrans* por vía oral, como aditivo alimentario; también se han realizado algunas en las que las clamidosporas se administraban en forma de soluciones acuosas. En ambos casos, se parte de la propagación del hongo en medios sólidos a base de agar-cereales, y las clamidosporas se disuelven en agua para proceder a la mezcla con alimento (Arias *et al.*, 2013a; Arroyo *et al.*, 2017; Carvalho *et al.*, 2009a; Carvalho *et al.*, 2009b; Cortiñas *et al.*, 2015) o administradas directamente vía oral (Hernández *et al.*, 2018a). Puesto que especies como *M. circinelloides* o *D. flagrans* son capaces de sobrevivir al paso por el tracto gastrointestinal de diferentes especies animales, esta estrategia garantiza la presencia del hongo directamente en las heces, y así el contacto directo con las formas parasitarias eliminadas por animales infectados. Recientemente, se ha demostrado que las clamidosporas resisten algunos procesos como la pelletización (Arroyo *et al.*, 2016; Hernández *et al.*, 2016; Voinot *et al.*, 2020), lo que constituye un hallazgo muy interesante porque se facilita la administración de hongos parasiticidas sin incrementar las labores en las explotaciones agropecuarias (Arroyo *et al.*, 2016; Hernández *et al.*, 2018b; Voinot *et al.*, 2020).





2.- OBJETIVOS



2.- OBJETIVOS

Los antecedentes expuestos previamente llevaron a considerar la necesidad de desarrollar un estudio con el objetivo general de escalar la producción de esporas de *Duddingtonia flagrans*, estableciéndose los siguientes **objetivos concretos**:

- 1.- Analizar la utilidad de medios de cultivo sólidos comestibles para la obtención de cantidades elevadas de esporas del hongo nematófago *D. flagrans*.
- 2.- Estudiar el desarrollo de *D. flagrans* en condiciones de anaerobiosis en medio líquido.
- 3.- Establecer el rendimiento de un medio de cultivo líquido para la producción de esporas de *D. flagrans*.
- 4.- Desarrollar y evaluar un procedimiento de obtención de esporas en dos fases.
- 5.- Determinar qué medios de cultivo, sólidos o líquidos, resultan más adecuados para el escalado de la producción de esporas de *D. flagrans*.





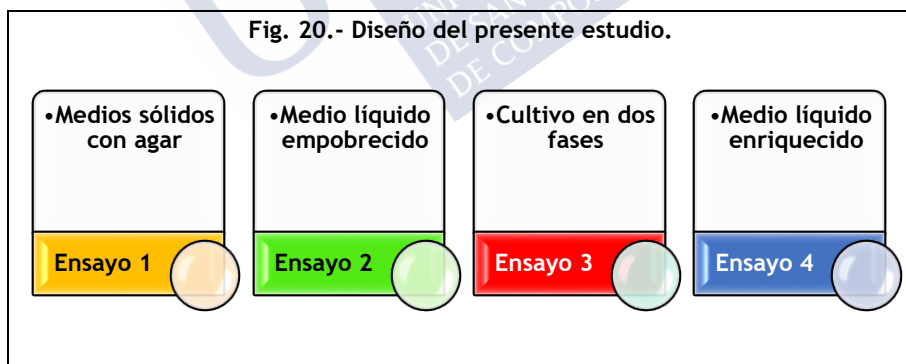
3.- DISEÑO DEL ESTUDIO



3.- DISEÑO DEL ESTUDIO

El diseño de estrategias de control parasitario que incluyen medidas preventivas como la utilización de hongos antagonistas, requiere de procesos que faciliten la producción de elevadas cantidades de estructuras fúngicas, generalmente clamidosporas en el caso de *D. flagrans* (Santurio *et al.*, 2009; Sagüés *et al.*, 2011, 2013; Blair y Biddle, 2020).

Para conseguir los objetivos fijados, se diseñó un estudio que se dividió en cuatro ensayos (Fig. 20). En el **primero** se prepararon medios de cultivo sólido a base de gelatina comestible, añadiéndose diferentes aditivos (trigo, zanahoria y caldo comercial) para obtener cantidades importantes de esporas de *D. flagrans*, y además mejorar la aceptación entre las diferentes especies animales a las que iban destinadas.



La utilización de medios de cultivo sólidos puede dificultar el recuento de las esporas, así como su recolección, que básicamente se realiza mediante el raspado de la superficie de placas Petri en que crecieron y su posterior dilución en soluciones acuosas (Sagüés *et al.*, 2013). En el **segundo ensayo** se analizó la idoneidad de un medio de cultivo líquido para producir cantidades elevadas de esporas del hongo nematófago, y

su utilidad para disponer de vías de distribución alternativas, como la pulverización directa sobre el suelo, o preparación de premezclas alimentarias con pellets nutricionales (Arias *et al.*, 2013a; Hernández *et al.*, 2018b).

En el **tercer ensayo** se planteó la posibilidad de combinar los dos ensayos anteriores, procediéndose a la aplicación de procesos en dos fases, líquida y sólida, para preparar medios comestibles.

Finalmente, en el **cuarto ensayo** se analizó la utilidad de enriquecer un medio de cultivo líquido.





4.- ENSAYO I:
PRODUCCIÓN DE ESPORAS
EN MEDIOS SÓLIDOS
CON AGAR



4.- ENSAYO I: Producción de esporas en medios sólidos con agar

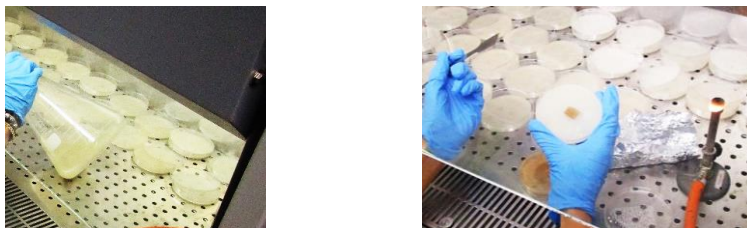
Para facilitar la distribución de las esporas de *D. flagrans* con el alimento, se preparó un medio de cultivo sólido a base de gelatina comestible (agar-marino o agar-algas), al que se adicionaron diferentes productos alimentarios.

4.1. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1.1. Preparación de placas *madre*

Para disponer de *insertos* de *D. flagrans*, se cultivó la cepa CECT 20825 del Grupo COPAR en 24 placas *madre* de agar bacteriológico (Suárez, 2017), compuesto por 20 g de agar bacteriológico por litro de agua destilada, que posteriormente se esterilizó en autoclave (Selecta) (121°C/15 min). Una vez que enfrió a 40-50°C, en una cámara de flujo laminar se vertieron 40 mL en placas Petri de 8 cm de diámetro. La siembra de las placas se llevó a cabo introduciendo *insertos* de 7x7 mm obtenidos a partir de una placa madre, que se retiraron al día siguiente.

Fig. 21.- Preparación de placas con agar para obtener esporas de *D. flagrans*.



4.1.2. Preparación de placas Petri con agar comestible y diferentes alimentos

Para explorar la posibilidad de proporcionar gelatinas con esporas directamente a animales, se comparó el crecimiento del hongo en *agar-marino*. También se añadieron trigo, zanahoria y un preparado comercial de caldo de pollo para determinar su efecto sobre la producción de esporas.

a) *Agar-marino* (1%)

Se depositaron 10 g de agar comestible en polvo (*Agar-Agar*[®], elaborado a partir de algas, Porto Muiños, A Coruña) en un matraz con 500 mL de agua destilada (Tabla 6), y la mezcla se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min. Una vez que la temperatura descendió a 40-50°C, se llevó a una cabina de flujo laminar en la que previamente se habían dispuesto placas de polivinilo. Después de añadir 40 mL del medio en cada placa, se dejó enfriar bajo luz UV durante 5-10 min, poniendo cuidado en que las tapas no estuviesen ajustadas y evitar así la condensación (Fig. 21). En total se prepararon 60 placas con *agar-marino* al 1% y otras 60 con agar bacteriológico.

Tabla 6.- Composición de los medios de cultivo empleados en el ensayo.

Alimento	Cantidad alimento	Agar-marino 1%	Trigo	Agua destilada
Trigo 2,5%	12,5 g	5 g	-	482,5 mL
Zanahoria 2%	10 g	5 g	12,5 g	472,5 mL
Zanahoria 4%	20 g	5 g	12,5 g	462,5 mL
Caldo 2%	10 mL	5 g	12,5 g	472,5 mL
Caldo 5%	25 mL	5 g	12,5 g	457,5 mL
Caldo 10%	50 mL	5 g	12,5 g	432,5 mL

b) Agar-marino-trigo (2,5%) (AMT)

El medio AMT se preparó adicionando 12,5 g de trigo autóctono por cada 500 mL de medio final (Tabla 6). Después de triturar la mezcla con una batidora, y una vez que el contenido se homogeneizó, se añadieron 5 g de agar comestible (concentración final del 1%).

A continuación se removió toda la mezcla durante unos segundos, y se mantuvo en autoclave a 121°C / 15 min. Cuando la temperatura descendió de forma suficiente, se llevó el matraz a una cabina de flujo laminar, se vertieron a 40 mL del medio y se dejó gelificar bajo luz UV durante 5-10 min, observando que las placas no estuviesen tapadas para evitar la condensación. El número de placas con AMT solo fue de 60.

c) Agar-marino-trigo-alimentos

Para obtener agar-marino-trigo-zanahoria (AMTZ), se siguió el protocolo anteriormente citado, con la particularidad de que previamente, se lavaron las zanahorias y se cortaron en rodajas de 1 cm de espesor aproximadamente, que a su vez se dividieron en varios fragmentos, que se incorporaron a la mezcla de trigo y agua antes de someter al autoclave. Se prepararon 60 placas con zanahoria al 2% (10 g en un volumen de 500 mL) y un número idéntico al 4% (20 g en 500 mL).

El medio agar-marino-trigo-caldo (AMTC) se elaboró con un preparado comercial de caldo de cocido (Hacendado®) (Tabla 6), compuesto por agua, pollo (1,5%), aromas (contienen leche y mostaza), sal, almidón modificado de maíz, hortalizas (patata, zanahoria, apio, cebolla y puerro) (0,3%), especias (ajo y pimentón), aceite de oliva, grasa de ave, maltodextrina, garbanzo, maltodextrina de patata, almidón de patata, aceite de girasol y extracto de carne.

En un erlemmeyer se añadieron 12,5 g de trigo autóctono, 5 g de agar comestible, 10 mL de caldo, y se rellenó hasta 500 mL con agua destilada para preparar AMTC al 2%, en tanto que el volumen de caldo para AMTC 5% fue de 25 mL, y 50 mL para AMTC 10% (Tabla 6). Se prepararon 60 placas con cada uno de los medios de cultivo.

En la Tabla 7 se resume la composición nutricional de los medios, en base a los datos recogidos en la Agencia Española de Salud y Nutrición en AESAN/BEDCA, Base de Datos Española de Composición de Alimentos v1.0 (2010).

Tabla 7.- Composición nutricional de los medios empleados para el desarrollo de *D. flagrans*.

Medio	Valor energético	Proteínas	Hidratos de carbono		Lípidos	
			Totales	Azúcares	Totales	Saturados
Agar-bacteriológico						
Agar-marino (100 g)	26 kcal	0,5 g	7 g	0,3 g	0 g	0 g
Trigo (por 100g)	314kcal	11,7g	71,3g	61g	2g	0,37g
Zanahoria (por 100 g)	34kcal	1,25g	9,6g	7g	0,3g	0,05g
Caldo (por 100 mL)	10 kcal	0,4g	1,3g	<0,5 g	0,3g	0,1g

4.1.3. Siembra de placas con *D. flagrans*

En la figura 22 se muestra el procedimiento seguido para la siembra de placas con distintos medios con *D. flagrans*. Como se mencionó previamente, se colocaron insertos procedentes de placas cultivadas con el hongo filamentososo, que se retiraron al día siguiente.

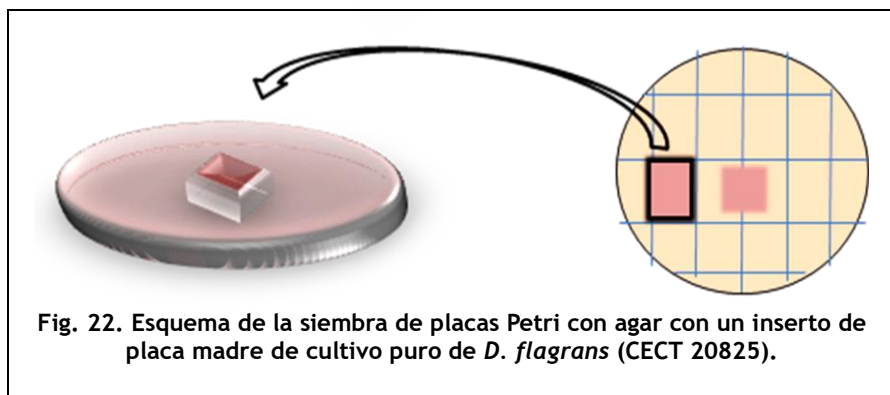


Fig. 22. Esquema de la siembra de placas Petri con agar con un inserto de placa madre de cultivo puro de *D. flagrans* (CECT 20825).

En todos los casos, las placas se sellaron con *parafilm* para evitar la contaminación del medio, y se mantuvieron a temperatura ambiente durante cuatro semanas aproximadamente, y al cabo de este periodo se observó el desarrollo de micelio (Fig. 23).



Fig. 23 Crecimiento de *D. flagrans* en placa con agar.

4.1.4. Desarrollo del micelio

Para determinar el grado de desarrollo del micelio de *D. flagrans*, cada día se fue delimitando (con ayuda de un rotulador) en el fondo las placas el crecimiento de las hifas, hasta que alcanzaron el borde (Fig. 24) (Suárez, 2017). Una vez finalizado el desarrollo, se midió el desarrollo diario (expresándolo en cm) en tres puntos, se determinó el valor medio y se calculó el *ratio de crecimiento*, dividiendo el promedio de desarrollo entre el número de días transcurridos:



Fig. 24. El crecimiento del micelio de *D. flagrans* se midió diariamente.

Ratio de crecimiento del micelio = $\frac{\text{promedio de crecimiento (en cm)}}{\text{día}_x / X \text{ días}}$

4.1.5. Recuento de esporas

Cada dos días se tomaron, con una espátula, 0,6-1,5 g de medio de tres puntos diferentes de la placa, que se introdujeron en viales y se mantuvieron en un *termoblok* a 90°C durante varias horas (hasta la

fusión de la gelatina). A continuación, se colocaron 25 μ L del contenido de cada tubo entre porta y cubre, y se contaron las esporas de *D. flagrans* en un microscopio óptico a 20X. Este procedimiento se repitió tres veces con cada vial preparado a partir de cada medio.

4.1.6. Análisis estadístico

Con objeto de conocer si los datos recabados se podían someter a un Análisis de Varianza, previamente se empleó la prueba de homogeneidad de varianzas o de Kolmogorov-Smirnov. En el caso de que siguiesen una distribución normal, se examinaron con Análisis de Varianza (ANOVA) a un nivel de significación de $P < 0,05$. Se empleó el test de Bonferroni para el análisis *post-hoc* de los datos, y establecer las posibles diferencias entre diferentes grupos de forma conjunta.

Todas las pruebas se realizaron con el paquete estadístico IBM® SPSS® Statistics, versión 22 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

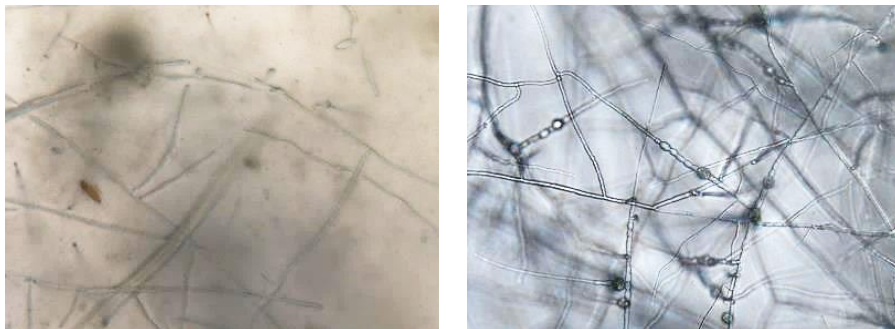
4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.2.1. Desarrollo del micelio de *D. flagrans*

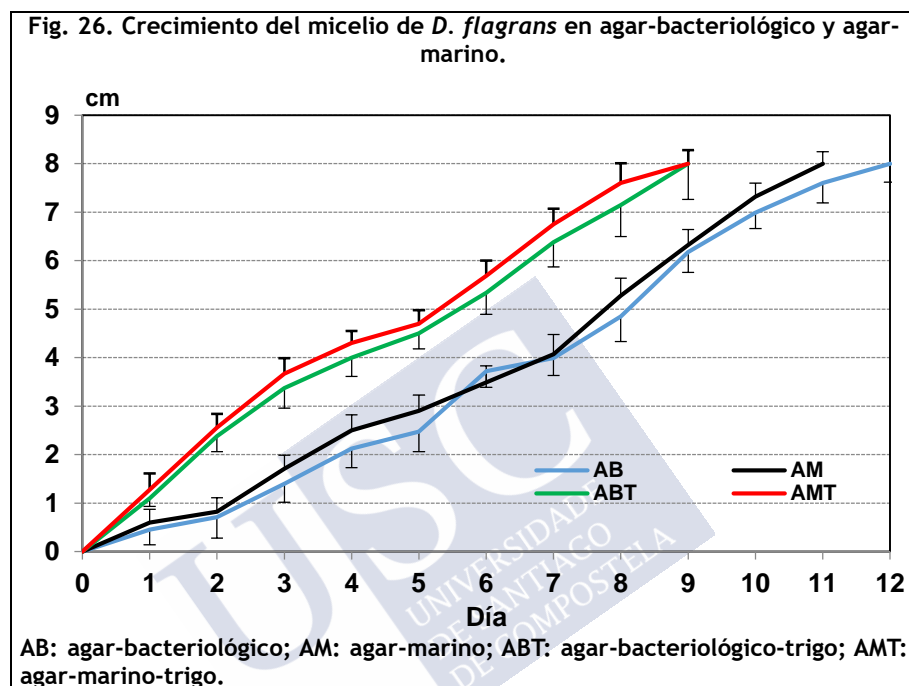
a) Agar bacteriológico, agar-marino y trigo

En la figura 25 se muestra la formación de micelio de *D. flagrans* en placas con medios agar-bacteriológico (AB) y agar-marino (AM).

Fig. 25. Crecimiento micelial en agar-bacteriológico (izda.) y marino (dcha.).



En todas las placas se apreció desarrollo un día después de colocar el inserto, alcanzándose valores ligeramente superiores con agar-marino (Fig. 26) ($F= 0,149$, $P= 0,703$).



Con la adición de trigo, se produjo un crecimiento más rápido en los dos medios a base de agar, pero no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos ($F= 0,043$, $P= 0,838$).

En la Tabla 8 se muestran ratios de crecimiento de micelio similares al emplear medios con AB y AM ($F= 1,090$, $P= 0,308$), con valores promedio que señalan un desarrollo de alrededor de 0,6 cm / día. La presencia de trigo en los medios supuso un estímulo notable para el crecimiento de las hifas de *D. flagrans*, obteniéndose ratios próximos a 1 tanto en ABT como en AMT ($F= 1,234$, $P= 0,283$). Se establecieron diferencias estadísticamente significativas con la adición del cereal ($F= 67,989$, $P= 0,001$ y $F= 62,275$, $P= 0,001$, respectivamente).

Tabla 8.- Ratios de crecimiento micelial en cultivos con agar y trigo.

Día	AB	AM	ABT	AMT
1	0,45	0,60	1,10	1,28
2	0,36	0,41	1,19	1,28
3	0,47	0,57	1,12	1,22
4	0,53	0,63	1,00	1,08
5	0,49	0,58	0,90	0,94
6	0,62	0,58	0,89	0,95
7	0,57	0,58	0,91	0,96
8	0,61	0,66	0,89	0,95
9	0,69	0,70	0,89	0,89
10	0,70	0,73		
11	0,69	0,73		
12	0,67			
Promedio	0,57	0,62	0,99	1,06

AB: agar-bacteriológico; AM: agar-marino; ABT: agar-bacteriológico-trigo; AMT: agar-marino-trigo.

Debido a que no se detectaron diferencias entre las placas con agar bacteriológico y agar-marino, a partir de este momento se empleó agar comestible con trigo (AMT), teniendo en cuenta que además se trata de un producto que podría administrarse directamente a animales para distribuir las esporas del hongo nematófago.

b) Agar-marino con trigo y zanahoria (AMTZ)

En las placas que contenían agar-marino-trigo con zanahoria al 2% o 4%, se comprobó un desarrollo del micelio muy similar a aquellas con agar-marino solo (sin zanahoria) ($P < 0,005$) (Fig. 27).

4. ENSAYO I: MEDIOS SÓLIDOS CON AGAR

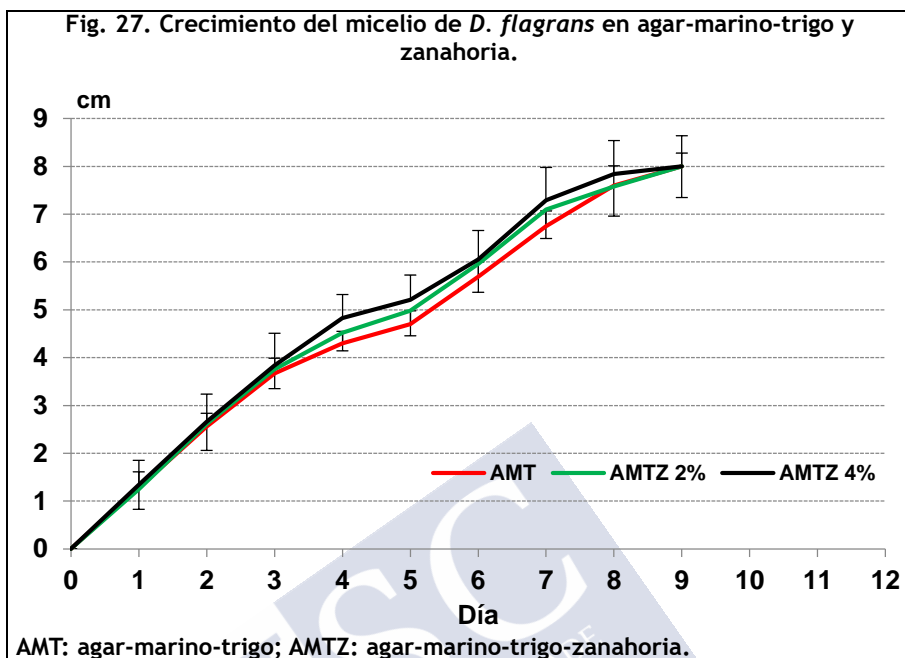


Tabla 9.- Ratios de crecimiento micelial en cultivos con agar-marino-trigo y zanahoria.

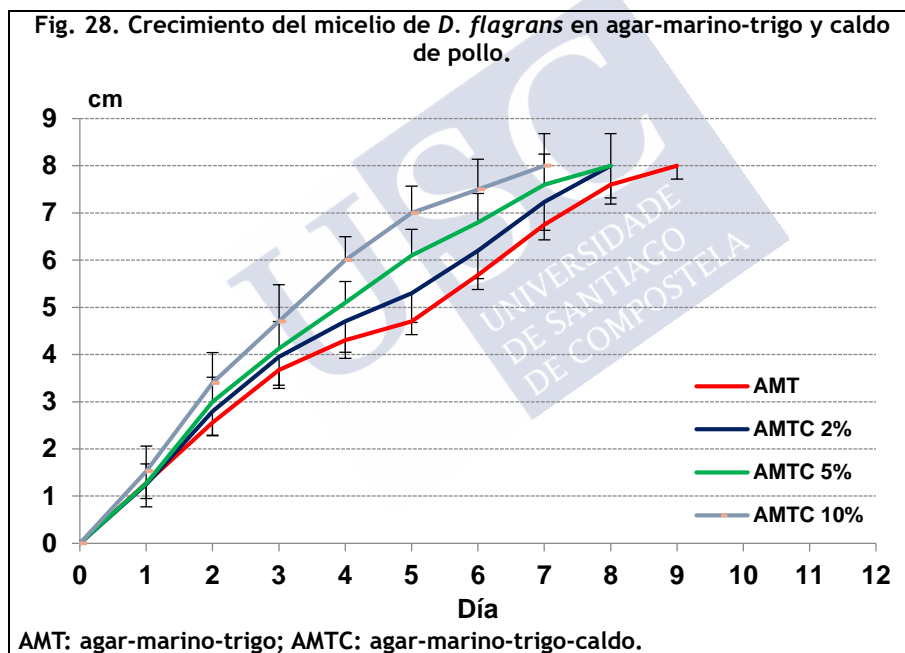
Día	AMT	AMTZ 2%	AMTZ 4%
1	1,28	1,25	1,34
2	1,28	1,31	1,33
3	1,22	1,25	1,28
4	1,08	1,13	1,21
5	0,94	1,00	1,04
6	0,95	0,99	1,01
7	0,96	1,01	1,04
8	0,95	0,95	0,98
9	0,89	0,89	0,89
<i>Promedio</i>	<i>1,06</i>	<i>1,09</i>	<i>1,12</i>

AMT: agar-marino-trigo; AMTZ: agar-marino-trigo-zanahoria.

En la Tabla 9 se muestra que la incorporación de zanahoria al medio AMT prácticamente no afectó a los ratios de crecimiento de las hifas, y pese a alcanzar valores más elevados con un 4% de zanahoria, las diferencias no fueron significativas ($F= 0,360$, $P= 0,701$).

c) Agar-marino con trigo y caldo

En la figura 28 se representa el desarrollo del micelio en agar-marino-trigo al que se añadieron diferentes cantidades de caldo de pollo (preparado comercial). Las hifas de *D. flagrans* crecieron con mayor rapidez en medios con caldo, sobre todo al 10%, ocupando toda la placa en 7-8 días.



Los ratios de crecimiento también resultaron superiores en los medios con caldo (Tabla 10), obteniéndose diferencias estadísticamente significativas ($F= 7,297$, $P= 0,001$); mediante la prueba de Bonferroni se establecieron diferencias entre los medios AMT y AMTC 5% y AMTC 10% ($P= 0,016$ y $P= 0,001$, respectivamente).

Tabla 10.- Ratios de crecimiento micelial en cultivos con agar-marino-trigo y caldo de pollo.

Día	AMT	AMTC 2%	AMTC 5%	AMTC 10%
1	1,28	1,25	1,27	1,53
2	1,28	1,40	1,50	1,70
3	1,22	1,32	1,38	1,57
4	1,08	1,18	1,28	1,50
5	0,94	1,06	1,22	1,40
6	0,95	1,03	1,13	1,25
7	0,96	1,03	1,09	1,14
8	0,95	1,00	1,00	
9	0,89			
Promedio	1,06	1,16	1,23	1,44

AB: agar-bacteriológico; AM: agar-marino; ABT: agar-bacteriológico-trigo; AMT: agar-marino-trigo.

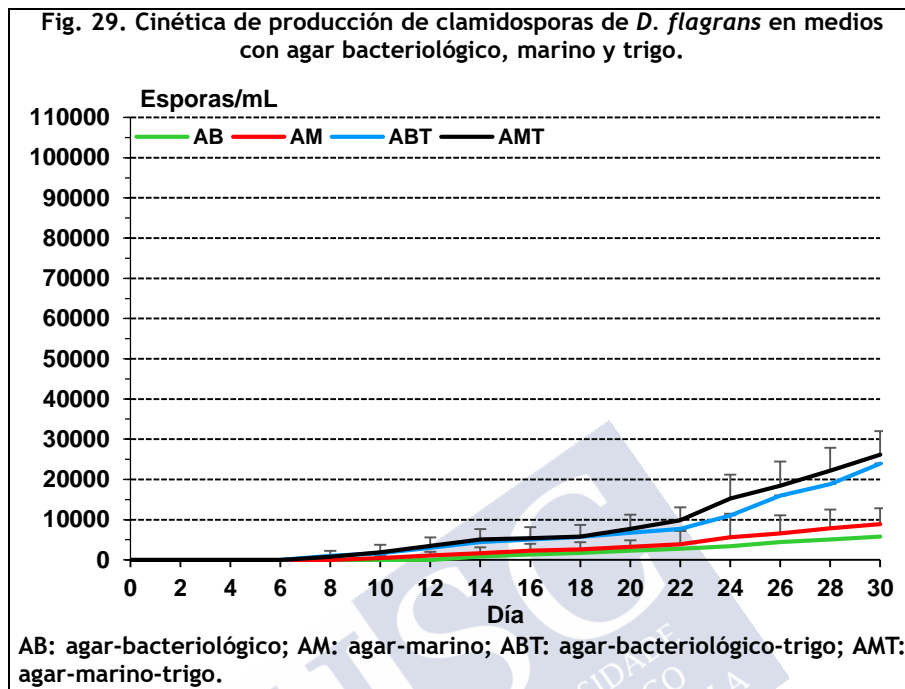
4.2.2. Producción de esporas de *D. flagrans*

Los recuentos se refieren de forma mayoritaria a las *clamidosporas*, puesto que la formación de *conidios* se observó sobre todo durante los primeros días del ensayo.

a) Agar bacteriológico, agar-marino y trigo

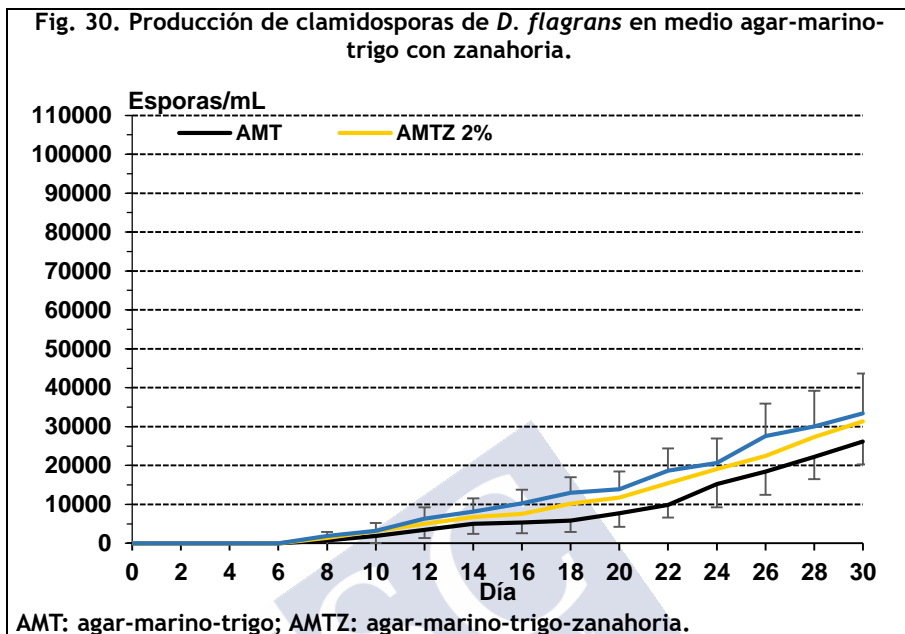
En la figura 29 se representa la producción de clamidosporas de *D. flagrans* en agar. A partir del día 8 se empezaron a observar clamidosporas de *D. flagrans*, y al final se alcanzaron recuentos medios próximos a 6000 (AB) y 9000 esporas(AM) /mL; estas diferencias no resultaron significativas ($F= 1,285$, $P= 0,266$).

Con la adición de trigo a los medios, se incrementó significativamente el número de clamidosporas observadas tanto en medio ABT (4 veces) ($F=6,447$, $P= 0,017$) como en AMT (3 veces) ($F=4,653$, $P= 0,039$) (Fig. 29). Los recuentos de AMT fueron ligeramente más elevados ($F= 0,138$, $P= 0,713$).



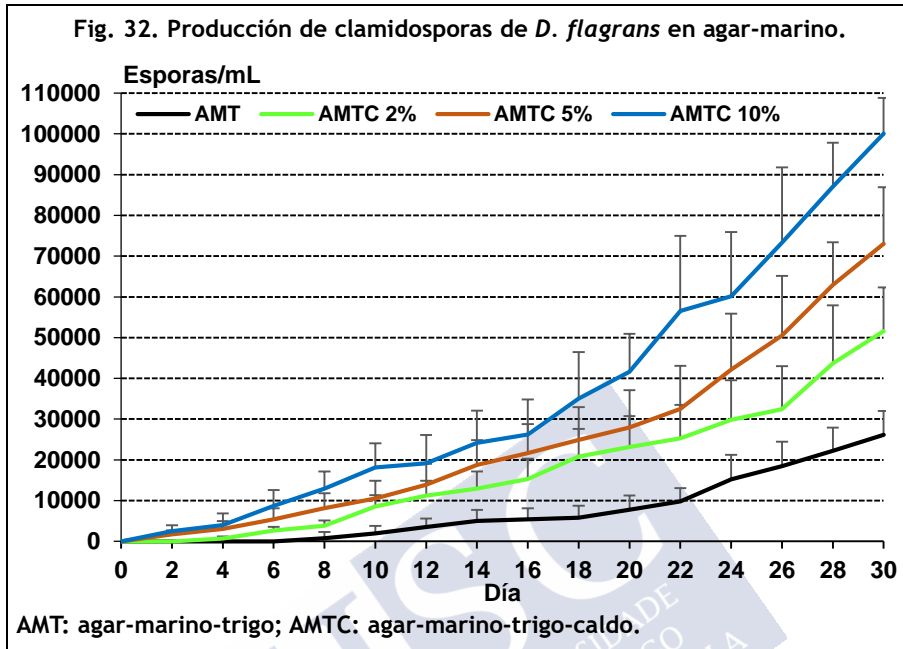
b) *Agar-marino-zanahoria*

A partir del día 8 se observaron clamidosporas de *D. flagrans* en los medios AMTZ. La incorporación de zanahoria al medio AMT no influyó en la producción de clamidosporas, como se puede apreciar en la figura 30. Después de 30 días, los valores de esporas se situaron en torno a 26.000-33.000/mL, lo que supone un incremento del 17%(AMTZ 2%) y 22% (AMTZ 4%), diferencias que no resultaron significativas ($F=0,657$, $P= 0,523$) (Fig. 31).



c) Agar-marino-trigo-caldo

En la figura 32 se puede comprobar que la adición de caldo de pollo afectó a la producción de clamidiosporas, que se adelantó a los días 2 (caldo 5% y 10%) y 4 (caldo 2%) (Fig. 33), mientras que en su ausencia se observó a los 8 días.



Al final del estudio, los recuentos de esporas fueron de 51626 (por mL) en las placas con AMTC 2%, 73075/mL con AMTC 5% y 100087/mL con AMTC 10%. Esto supone un incremento del 49%, 64% y 74%, respectivamente, en relación con el medio sin caldo (AMT). En la figura 33 se muestra el desarrollo de *D. flagrans* en medio ATMC.




4.2.3. Comparación de los resultados

La ausencia de investigaciones basadas en la producción de esporas de *D. flagrans* en medios comestibles dificulta la discusión de los resultados obtenidos. La mayoría de estudios se ha realizado en medios de cultivo sólidos (agar-agua) donde se aprecia una fase de crecimiento lineal de hifas a partir de los cuatro primeros días, y se producen clamidosporas a partir de las dos semanas (Grønvold *et al.*, 1996). La producción máxima de clamidosporas tiene lugar a las tres semanas (Arias *et al.*, 2013).

En el presente estudio se demostró que en las placas con medios de cultivo con trigo se obtenía un desarrollo mayor, y también recuentos superiores de clamidosporas. Se comprobó que no había diferencias al emplear agar bacteriológico y agar comestible, razón por la que se procedió a cesar en el empleo de agar bacteriológico.

Al estudiar la morfogénesis utilizando zanahoria como aditivo en el medio de cultivo, se observó un crecimiento superior al medio de cultivo con trigo, pero el desarrollo no resultó proporcional a la concentración de zanahoria, por lo que se podría obtener idénticos resultados con la menor proporción de la hortaliza. Con la adición de zanahoria la aparición de clamidosporas tuvo lugar a los ocho días.

La adición de caldo de pollo como aditivo a la gelatina comestible provocó que las hifas crecieran de forma muy rápida, sin mostrar dependencia de la concentración de caldo en el medio de cultivo. Por el contrario, la producción de clamidosporas se apreció ya a los dos días después de colocar el inserto en las placas con agar-marino-trigo y caldo, resultados que indican la idoneidad de este producto para el diseño de formulaciones orientadas a especies de carnívoros.



5.- ENSAYO II:
PRODUCCIÓN DE ESPORAS EN
MEDIO LÍQUIDO EMPOBRECIDO





5.- ENSAYO II: Producción de esporas en medio líquido empobrecido

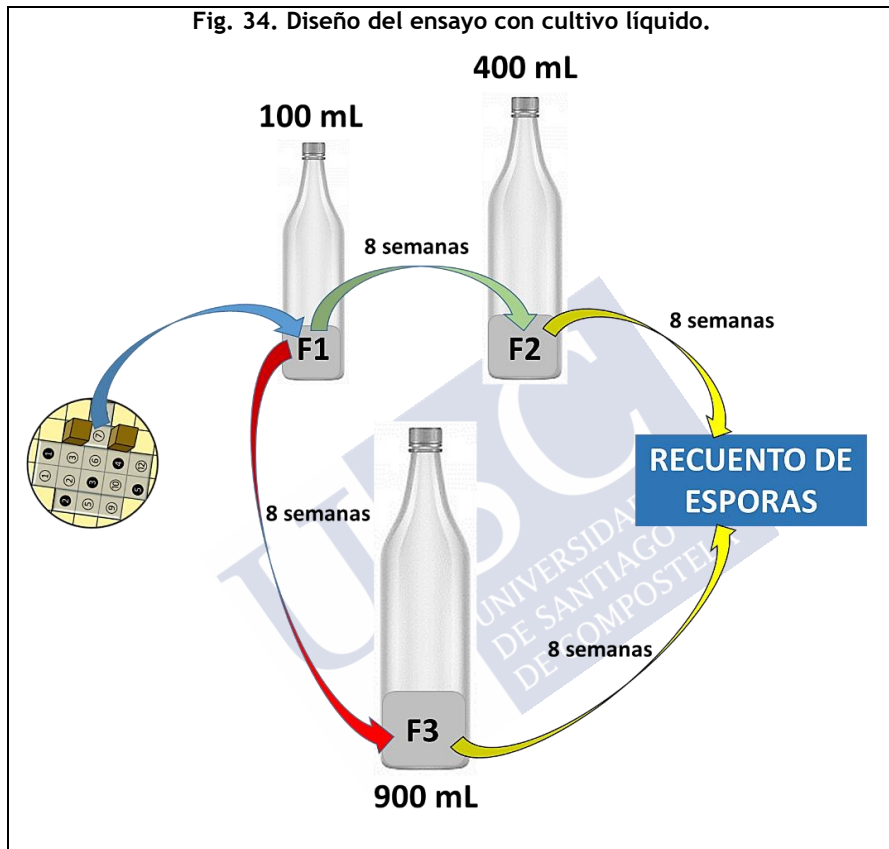
La propagación de hongos filamentosos en cultivos a base de agar dificulta su distribución, puesto que se requiere el raspado superficial del agar y disolución en agua. Con este procedimiento se pierde un número importante de clamidosporas que se encuentran en el interior del agar, y las que se obtienen forman agregados que dificultan su distribución mediante pulverización, así como la mezcla homogénea en formulaciones alimentarias. Para solucionar estos aspectos, se consideró el empleo de un medio de cultivo líquido.

5.1. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1.1. Diseño experimental

Se utilizó un medio de cultivo líquido para propagar las esporas de *D. flagrans* en botellas de plástico gentilmente donadas por el establecimiento “Hostal Bríos” (Lugo, España), que se reciclaron en el Laboratorio del Grupo COPAR (Facultade de Veterinaria, USC). La primera fase (**F1**) consistió en depositar un inserto de agar-marino-trigo con *D. flagrans* en botellas de 0,5 L que contenían 100 mL de medio de cultivo líquido (Fig. 34). Después de ocho semanas, las botellas se dividieron en dos lotes. En la fase **F2**, los 100 mL procedentes de botellas de la fase **F1** se transfirieron a recipientes de 1 L con 400 mL de medio líquido, haciendo un total de 500 mL; en las botellas del otro lote (fase **F3**), el contenido de botellas de la **F1** (100 mL) se añadió a recipientes de 2 L de capacidad en los que había 900 mL de cultivo líquido, para un volumen final de 1 L.

Transcurrido otro periodo de ocho semanas, se determinó el desarrollo del hongo nematófago mediante el recuento de esporas.

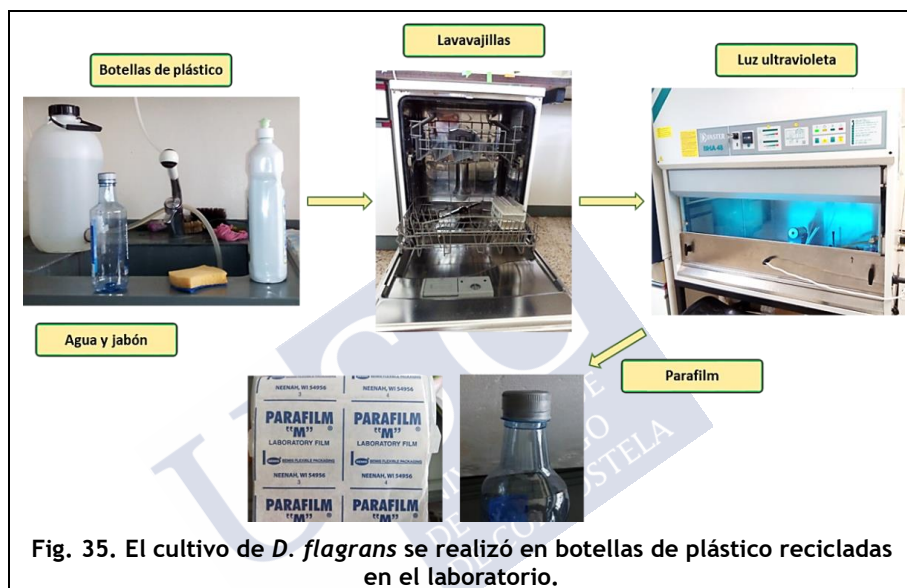


5.1.2. Acondicionamiento de recipientes de plástico

Cada semana durante un mes se recogieron botellas de plástico usadas (de 0,5 y 1,5 L), que en primer lugar se acondicionaron para eliminar restos de contenido y contaminación que pudiesen afectar al cultivo. El reciclado consistió en lavar con agua y jabón, aclarar, retirar las etiquetas y rellenar con hipoclorito sódico (lejía) al 10%, dejando actuar durante 1 hora (Fig. 35). A continuación, se vaciaron y se aclararon en un lavavajillas.

5. ENSAYO II: MEDIO LÍQUIDO EMPOBRECIDO

El paso siguiente consistió en dejar secar las botellas a temperatura ambiente, en una cámara de flujo laminar bajo luz UV (2-4 h). Finalmente, se colocaron los tapones, que se recubrieron con parafilm para asegurar la correcta conservación hasta el llenado con medio de cultivo líquido.



5.1.3. Preparación del medio de cultivo líquido

Se preparó el medio de cultivo líquido empobrecido COPFr mezclando 10 g de harina de trigo autóctono (*Triticum aestivum*), 7,1 g NaCl, 1,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 0,423 mg FhrAPS (proteína recombinante del tegumento de *Fasciola hepatica*) (Paz-Silva *et al.*, 2005), con 1 L de agua destilada (Arias *et al.*, 2013a).

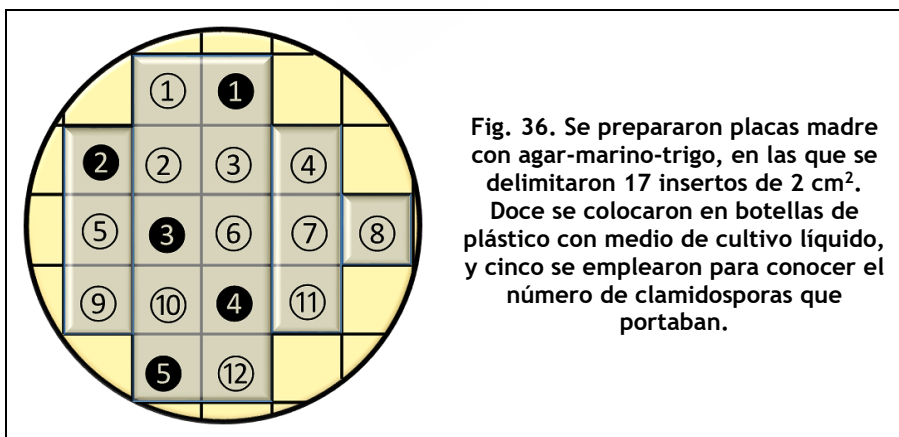
Después de agitar hasta la homogeneización, la solución se hizo pasar por un colador para eliminar los restos insolubles, y se introdujo en matraces de 2 L o en bidones de nalgono autoclavables; a continuación se colocó una gasa con algodón en la boca del recipiente, y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min. El medio esterilizado se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta $40\text{-}50^\circ\text{C}$, y

posteriormente se procedió a dispensarlo en las botellas de plástico (previamente acondicionadas) en la cámara de flujo laminar.

5.1.4. Siembra de medio de cultivo líquido con *D. flagrans*

a) Fase 1

Teniendo en cuenta los resultados del primer ensayo, se prepararon 30 placas con agar-marino-trigo, que se cultivaron con la cepa CECT 20825 del hongo *D. flagrans* (placas madre, *vide* p. 44). Después de mantener a temperatura ambiente durante 28 días, se seleccionaron 20 placas con buen crecimiento y ausencia de contaminación, y en cabina de flujo laminar se abrieron y delimitaron insertos de 2 cm² con ayuda de una espátula esterilizada y una plantilla de papel. Considerando que la superficie de cada placa de 8,5 cm es 56,72 cm², en cada una se obtuvieron alrededor de 17 insertos que se podían retirar con facilidad (Fig. 36). De forma totalmente aleatoria, en cada placa se tomaron doce insertos para sembrar el medio líquido en botellas de plástico, y en los cinco insertos restantes se determinó la cantidad de clamidosporas por cm² y placa, estableciéndose de este modo el valor medio que se depositaba en la siembra de cada botella. Para ello, se introdujeron de forma individual en un matraz con 100 mL de agua, se trituraron con una batidora, y se tomaron 8 alícuotas de 25 µL que se colocaron entre porta y cubre para el recuento bajo microscopio a 20X.



En total, se sembraron 240 botellas de plástico (500 mL de volumen), dispensando 100 mL de medio líquido (previamente esterilizado en autoclave) en cabina de flujo laminar, y añadiendo un inserto con *D. flagrans* a cada una. Finalmente, las botellas se taparon con parafilm y se mantuvieron a temperatura ambiente (16-20°C) hasta su análisis. Las 240 botellas se dividieron en lotes de 80 para cada una de las fases **F1**, **F2** y **F3**. Cada semana se analizaron ocho botellas correspondientes a cada fase, de modo que serían necesarias 64. Sin embargo, se prepararon 80 en previsión de que pudiese producirse contaminación, perderse contenido al manipularlas, etc.

b) Fases 2 y 3

Como se representa en la Fig. 34, el contenido (100 mL) de un total de 80 botellas de la fase **F1** se transfirió a igual número de recipientes de 1 L con 400 mL de medio de cultivo líquido para desarrollar la fase **F2**; el contenido de otros 80 recipientes de **F1** se dispensó en botellas de 2 L con 900 mL de cultivo líquido para llevar a cabo la fase **F3**.

5.1.5. Evaluación del desarrollo de *D. flagrans* en medio líquido

Para determinar el grado de desarrollo durante las tres fases del proceso, se procedió a agitar vigorosamente hasta conseguir una solución homogénea, de la que se tomaron 8 muestras de 100 µL de cada botella, que se depositaron en viales. A continuación, se colocaron 25 µL entre porta y cubre, y se observaron al microscopio (20X), para proceder al recuento de esporas.

Teniendo en cuenta que con elevada frecuencia aparecían pellets, agregados de micelio, etc, se decidió triturar el contenido de la botella a analizar con una batidora durante 30-60 s, antes de tomar las alícuotas. Se empleó un contador para contabilizar el número de esporas de *D. flagrans* en ese volumen. En la evaluación del grado de desarrollo de se consideraron los parámetros siguientes:

- Índice Semanal de Esporogénesis (IE): número de clamidosporas en cada semana por mL de medio de cultivo,

$$ISE = \frac{\text{Esporas semana}}{\text{volumen medio de cultivo (mL)}}$$

- Tasa Semanal de Esporogénesis (TSE): proporción de clamidosporas nuevas que se originan cada semana por mL de medio de cultivo,

$$TSE = \frac{\text{Esporas semana } Y - \text{esporas semana previa}}{\text{volumen medio de cultivo (mL)}}$$

- Incremento Porcentual Relativo (IPR): porcentaje de clamidosporas que se generan cada semana,

$$IPR = \left[\frac{(\text{Esporas semana } Y - \text{Esporas semana previa})}{\text{Esporas semana } Y} \right] \times 100$$

- Incremento Porcentual Absoluto (IPA): porcentaje de clamidosporas que se generan cada semana en relación al inicio del cultivo,

$$IPA = \left[\frac{(\text{Esporas semana } Y - \text{Esporas semana } 0)}{\text{Esporas semana } Y} \right] \times 100$$

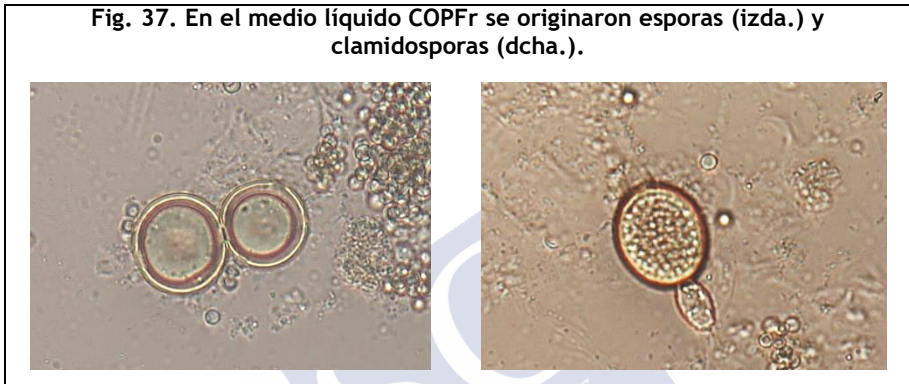
5.1.6. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron con la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar si se ajustaban a una distribución normal, en cuyo caso se examinaron con Análisis de Varianza (ANOVA) a un nivel de significación de $P < 0,05$. Se empleó el test de Bonferroni para el análisis *post-hoc* de los datos, y establecer las posibles diferencias entre diferentes grupos de forma conjunta.

Todas las pruebas se realizaron con el paquete estadístico IBM® SPSS® Statistics, versión 22 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

5.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis del medio líquido se basó en el recuento de clamidosporas de *D. flagrans* (Fig. 37).



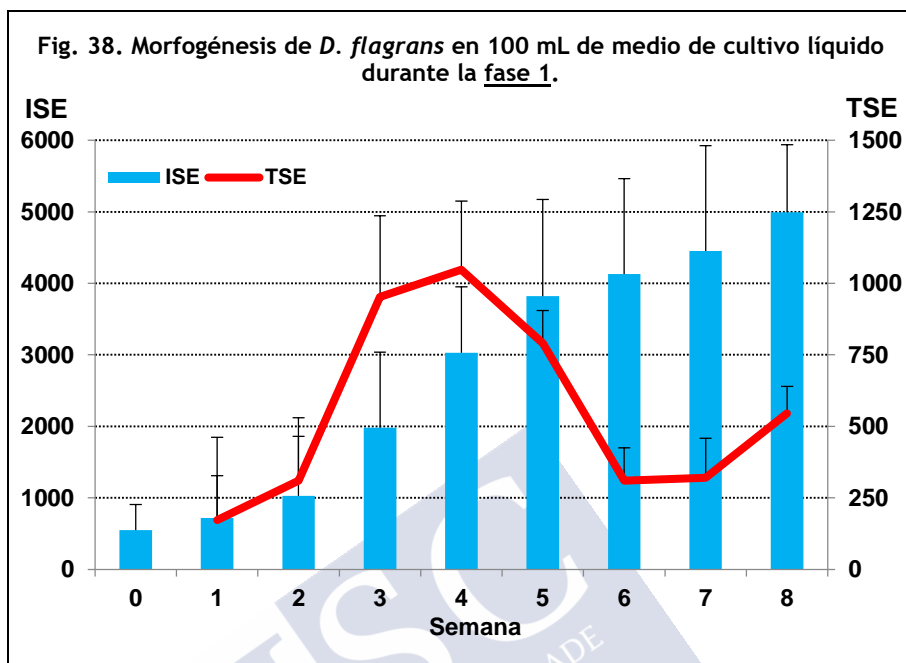
5.2.1. Fase 1: desarrollo de *D. flagrans* en medio líquido

En la Tabla 11 se resumen los valores medios de clamidosporas presentes en los insertos que se retiraron de cada placa para la siembra de las botellas con medio líquido. Como se mencionó en el apartado 5.1.3, se realizó el recuento de un total de cinco insertos por placa con agar-marino-trigo, demostrándose que no existían diferencias estadísticamente significativas en el recuento de clamidosporas de las placas ($X^2= 1,237$, $P= 0,216$).

Tabla 11. Valores medios de clamidosporas por cm² de agar-marino-trigo.

Placa	Promedio	DE	Placa	Promedio	DE
1	14550	8375	11	42120	14350
2	13780	5250	12	19600	6700
3	24120	9625	13	30800	1050
4	19630	8075	14	24060	7875
5	12280	5300	15	27480	11425
6	31150	11100	16	22450	8325
7	35750	12750	17	29340	12050
8	30840	9300	18	31250	7425
9	14220	5575	19	28080	12150
10	13750	6200	20	16860	5175
<i>Promedio ± DE: 24105 ± 9032</i>					

Como se muestra en la figura 38, la producción de clamidosporas aumentó de forma gradual desde la primera semana después de la siembra del medio líquido. A las cuatro semanas el promedio fue de 3030 ± 1420 de clamidosporas/mL, y a las ocho semanas 4995 ± 933 clamidosporas/mL.



El análisis de la morfogénesis de *D. flagrans* mostró los valores más bajos en las dos primeras semanas, que se incrementaron hasta alcanzar los más elevados a las tres y cuatro semanas (Fig. 37). A partir de este momento, se observó un descenso en la TSE (tasa semanal de esporogénesis) hasta la semana siete, en que comenzó a aumentar de nuevo.

En la Tabla 12 se muestran las variaciones porcentuales de la creación de clamidosporas. El incremento semanal (IPR) señaló que los valores más elevados aparecían en las cuatro primeras semanas, sobre todo en la tercera-cuarta, y a partir de este momento se mantienen porcentajes alrededor del 10%.

Semana	1	2	3	4	5	6	7	8
IPR	24	30	48	35	21	8	7	11
IPA	24	47	72	82	86	87	88	89

Con la estimación del incremento absoluto (IPA) se comprobó que, a la cuarta semana, el número de clamidosporas por mL de medio aumentó un 72% con respecto a la concentración inicial, en tanto que en la octava semana resultó del 81%. Del análisis de estos dos parámetros se definen dos fases en la morfogénesis de *D. flagrans*: hasta la cuarta semana se refleja una producción notable de clamidosporas, y a partir de la quinta se ralentiza su formación. Los resultados observados en el presente estudio coinciden con los de ensayos previos con el medio líquido COPFr, determinándose que la esporogénesis aumentaba de forma notable en las dos primeras semanas (Fig. 39), y a partir de este momento se observaban las primeras clamidosporas, con valores máximos alrededor de la 7^a semana (Arias *et al.*, 2013a).

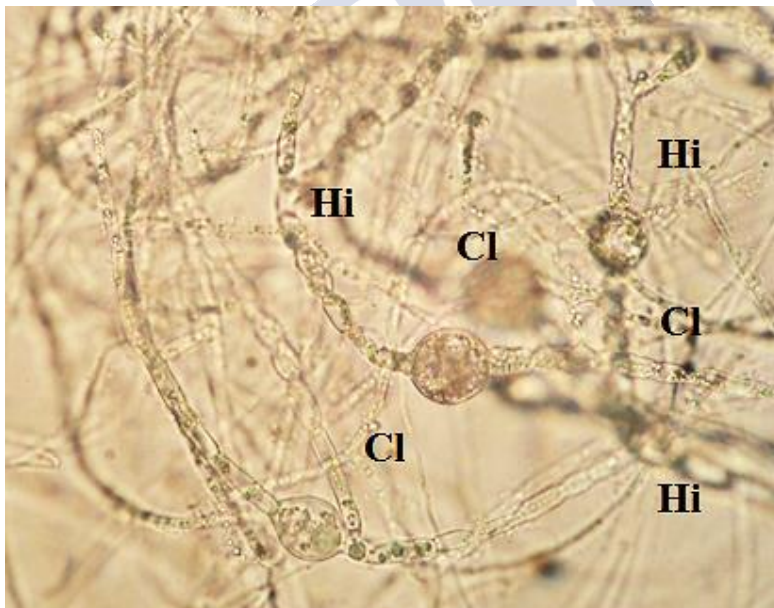


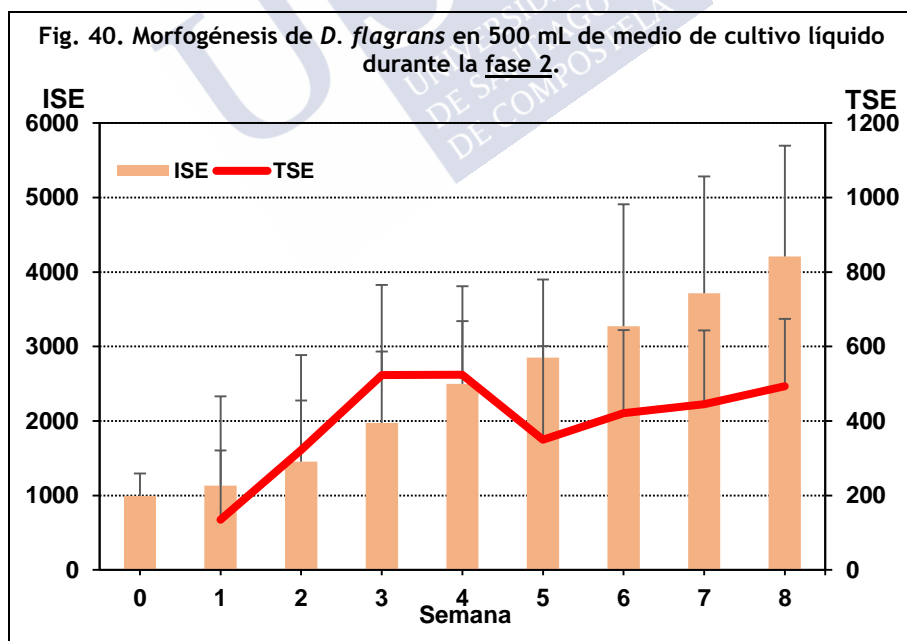
Fig. 39. Esporogénesis de *D. flagrans* en medio de cultivo líquido (Cl: clamidospora; Hi: hifa) (20X).

5.2.2. Fase 2: escalado a 500 mL

Esta fase consistió en el escalado de la producción de clamidosporas de *D. flagrans* desde un volumen de 100 mL de medio de cultivo a otro de 500 mL. Para ello, se utilizaron 80 botellas de la **fase 1**, con una concentración promedio de 999 ± 294 esporas/mL ($X^2=79,002$, $P=0,479$), cuyo contenido se transfirió a 80 botellas de 1 L que contenían 400 mL de medio de cultivo líquido.

Los recuentos de clamidosporas se incrementaron de forma leve en la primera semana de cultivo (Fig. 39), haciéndolo de forma más notable a continuación, de modo que en la semana cuatro la concentración fue de 2499 ± 843 , y al final del periodo de incubación de 4208 ± 1487 clamidosporas/mL.

En la TSE se definieron dos fases, hasta la cuarta semana de cultivo en que los valores oscilaron entre 135 y 524, y desde este momento y hasta la semana ocho, intervalo en el que la TSE comenzó a aumentar 350 hasta alcanzar valores de 493 (Fig. 40). Este modelo resultó muy similar al descrito en la **fase 1** (Fig. 38).



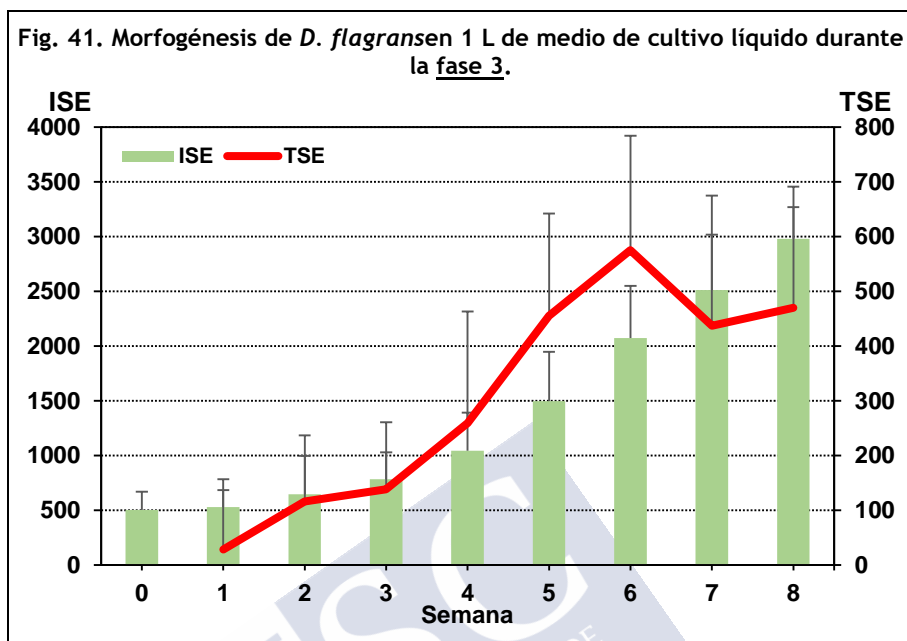
Entre la segunda y cuarta semanas, los incrementos semanales relativos (IPR) mostraron valores del 21-26%, que disminuyeron al 12% hasta el final del ensayo (Tabla 13). Mediante el cálculo del incremento absoluto (IPA) se demostró que en las primeras cuatro semanas, los recuentos de clamidosporas por mL de medio aumentaron un 60% con respecto a la concentración inicial, mientras que se ralentizaron hasta la octava semana, obteniéndose un incremento del 76%.

Semana	1	2	3	4	5	6	7	8
IPR	12	22	26	21	12	13	12	12
IPA	12	31	50	60	65	70	73	76

Los resultados observados con el escalado de 100 a 500 mL son similares a los de la fase anterior, corroborando la aparición de dos fases en la morfogénesis de *D. fragrans*, hasta la cuarta semana tiene lugar un incremento destacado, y desde la quinta a la octava el aumento es inferior. Estos datos parecen confirmar que en la segunda fase una parte de las clamidosporas se dan lugar a nuevas hifas, y por ello se reducen los valores de TSE e IPR.

5.2.3. Fase 3: escalado a 1L

Los recuentos de clamidosporas de *D. fragrans* por mL que resultaron en la fase de **escalado a 1 L** se muestran en la Fig. 41. Hasta la semana cuatro no se alcanzaron promedios de 1000 clamidosporas/mL, y en las cuatro semanas siguientes aumentaron hasta 3000.



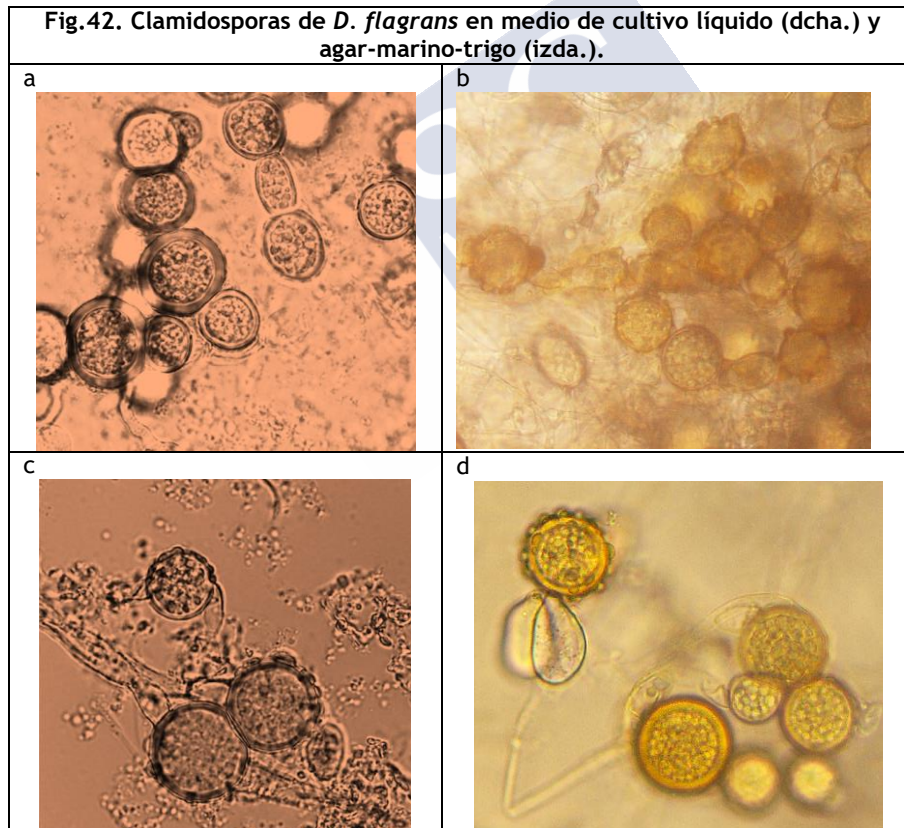
Se detectó un incremento continuado de la tasa semanal de esporogénesis (TSE) hasta la sexta semana, en que se obtuvieron los valores máximos (575 ± 209); a partir de este momento, la TSE disminuyó en la séptima semana, para incrementarse ligeramente en la octava.

En la Tabla 14 se pueden observar los incrementos porcentuales (relativo y absoluto) en la producción de clamidosporas de *D. flagrans* durante el escalado en 1 L de medio de cultivo. Los valores de IPR resultaron del 25-30% entre las semanas cuatro y seis, y disminuyeron hasta el 16% en la octava. Sin embargo, en las primeras cuatro semanas se detectó un incremento absoluto (IPA) del 52%, y en la última semana del 83%.

Semana	1	2	3	4	5	6	7	8
IPR	5	18	18	25	30	28	17	16
IPA	5	22	36	52	66	76	80	83

5.2.4. Comparación de los resultados obtenidos en medio de cultivo líquido

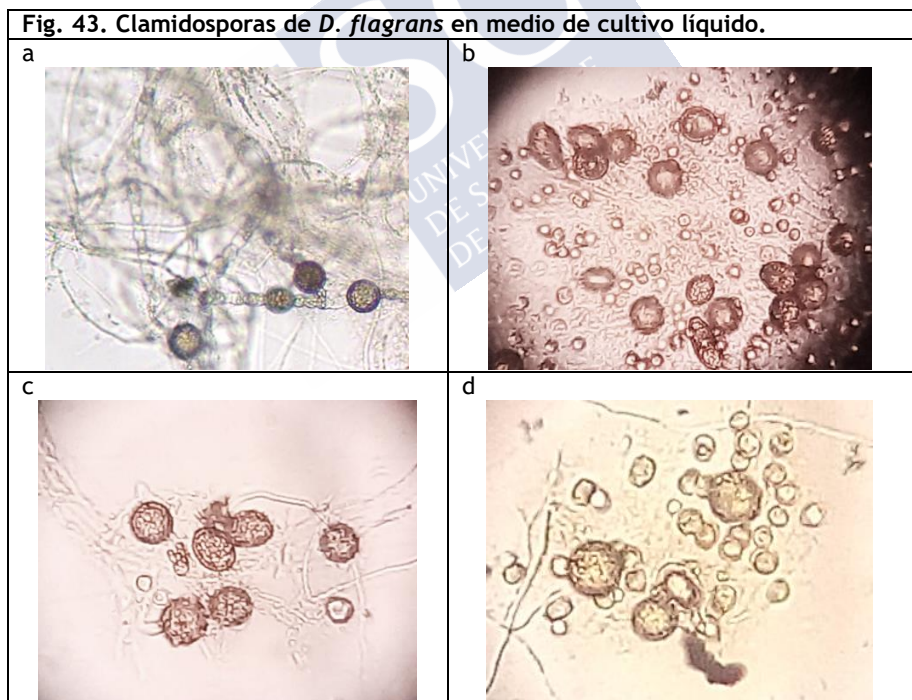
La mayoría de los ensayos realizados hasta el momento consisten en la producción de clamidosporas de *D. flagrans* en medios sólidos a base de agar y cereales. Los resultados obtenidos en medio líquido confirman hallazgos anteriores acerca de su utilidad para producir cantidades elevadas (Arias *et al.*, 2013a). Como se aprecia en la figura 42, las clamidosporas originadas en los cultivos líquidos presentaron como particularidad una superficie más lisa que en medio sólido, aunque más tarde se observaron gránulos en su interior, como sucedió en el medio agar-marino-trigo (Fig. 42c, d).



5. ENSAYO II: MEDIO LÍQUIDO EMPOBRECIDO

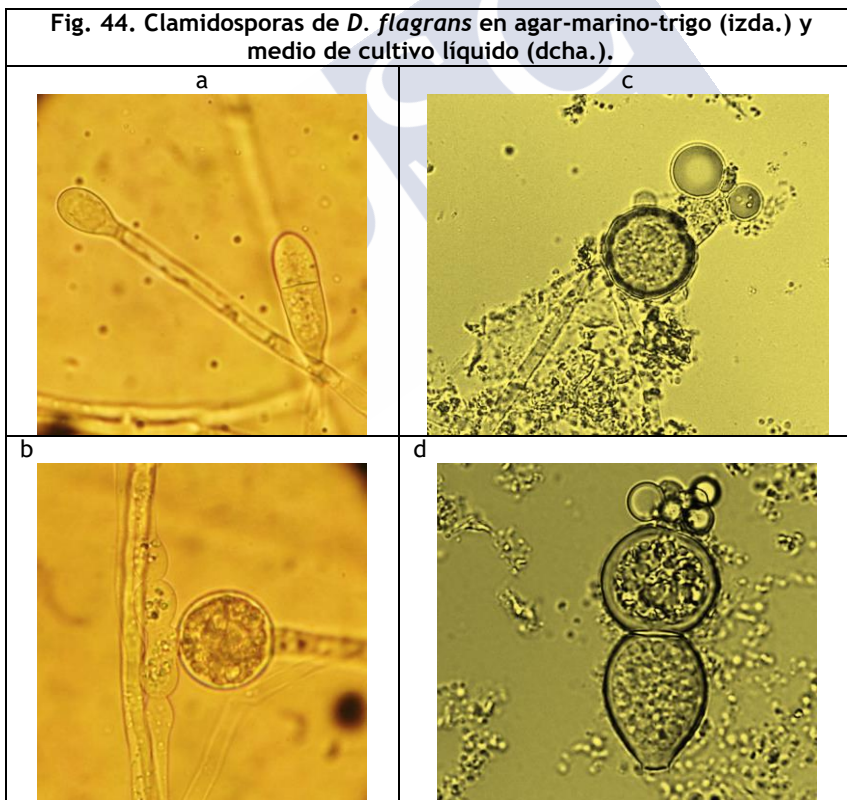
En estudios anteriores se ha defendido que las clamidosporas son formas de resistencia que surgen, en especial, en respuesta a condiciones ambientales desfavorables, de estrés. Recientemente se ha sustentado esta idea, sobre todo basada en la limitación drástica de humedad, como una señal que activaría la formación de estas esporas de cubierta gruesa con capacidad para mantenerse viables durante largos periodos de tiempo (Wang *et al.*, 2019; Blair y Biddle, 2020) (Fig. 43c, d). Sin embargo, los hallazgos del presente estudio señalan la capacidad del hongo filamentoso para propagarse en anaerobiosis y medio líquido, como ya habían señalado previamente Arias *et al.* (2013a).

Un aspecto inesperado fue la observación de un número importante de clamidosporas, que no siempre estuvo acompañado por el incremento notable de micelio (Fig. 43a).



Pese a que inicialmente se consideró la posible influencia del procedimiento al que se sometía al medio líquido para disgregar los posibles *pellets* o agregados de esporas (acción de la batidora para disgregar los pellets de esporas) antes de la observación al microscopio, resultó notable la aparición de estructuras de menor tamaño en las proximidades de clamidosporas (Fig. 43b, c, d), que llevó a considerar que en realidad otros mecanismos podrían estar involucrados en la esporogénesis, como por ejemplo la reproducción asexual simplificada o *microcíclica*, que se caracteriza porque se originan esporas directamente a partir de otras, sin formar micelio (Jung *et al.*, 2014). Este aspecto aun no ha sido descrito para *D. flagrans*.

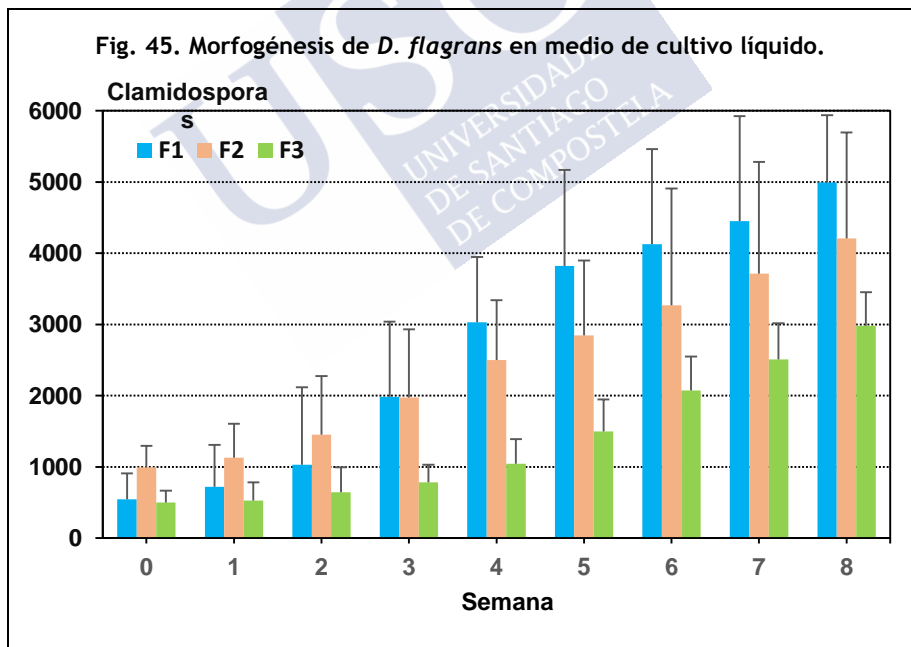
En la figura 44 se presentan imágenes de mecanismos de esporogénesis en medios sólidos a base de agar y líquido.



5. ENSAYO II: MEDIO LÍQUIDO EMPOBRECIDO

Como se expuso en el apartado de **Antecedentes**, en las condiciones naturales que se intentan reproducir en medios con agar, tiene lugar la formación de clamidosporas intercaladas en las hifas, así como de conidios a partir de conidióforos o en los extremos apicales de las hifas (Fig. 44a, b). Sin embargo, en medio líquido se demostró una elevada producción de esporas de estructura similar a las clamidosporas, pero de superficie lisa y menor tamaño, que parecen confirmar que en *D. flagrans* también ocurre **reproducción microcíclica**.

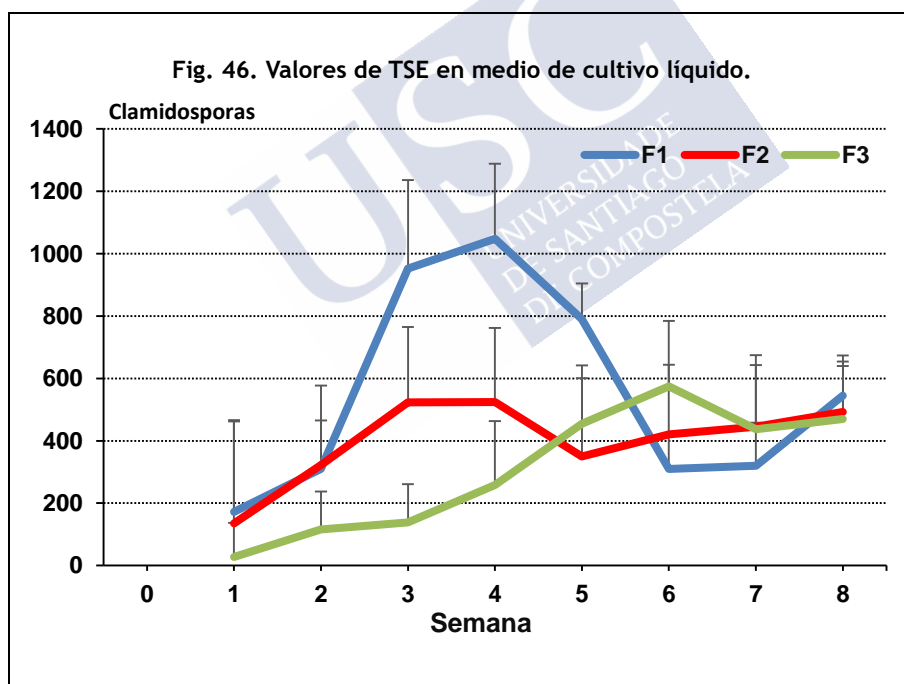
En relación con el rendimiento observado en las diferentes fases en medio de cultivo líquido, en la figura 45 se puede comprobar que los valores más elevados del IE se consiguieron con los menores volúmenes de medio, o lo que es lo mismo, que al incrementar el volumen, disminuye el IE.



La comparación de las tasas semanales de esporogénesis (TSE) (Fig. 46) reveló que en las **fases 1 y 2** (cultivo en 100 mL y 500 mL,

respectivamente) ocurrían dos etapas, una de crecimiento notable progresivo hasta la cuarta semana, y otra con un desarrollo ralentizado desde la quinta a la octava. Una explicación plausible podría radicar en que en la segunda fase en realidad se mantenga el ritmo de producción de clamidosporas, pero además tenga lugar el desarrollo de micelio a partir de estas formas de resistencia, lo que resultaría en la disminución de la TSE. En estudios de crecimiento de *D. flagrans* en agar-agua se definió una fase de crecimiento lineal del micelio en los cuatro primeros días, y aparición de las clamidosporas a partir de las 2 semanas, con valores máximos a las tres semanas (Grønvold *et al.*, 1996).

En la **fase 3** (*cultivo en 1 L*) casi no se observaron diferencias, mostrándose un desarrollo gradual hasta la semana seis, que descendió levemente a continuación.



La mayor concentración de clamidosporas se obtuvo en la **fase 1** (4495) y en la **fase 2** (4208), en tanto que al final de la **fase 3** se contaron 2980 clamidosporas/mL de medio de cultivo líquido. En la Tabla 15 se

comparan los incrementos porcentuales entre las tres fases, resultando que en la **fase 1** se alcanzan los valores de IPR e IPA más elevados, seguidos de la **fase 3**.

Las clamidosporas son formas de resistencia, que en el suelo y ante ciertos estímulos como la presencia de materia orgánica en descomposición, o de algunos organismos (en el caso de *D. flagrans* larvas de nematodos parásitos), se desarrollan hasta formar una red de hifas en las que se intercalan *anillos* o *trampas* que capturan las larvas y finalmente las digieren (Larsen *et al.*, 1995). En caso de no recibir estímulos para su desarrollo, pueden permanecer en estado de latencia hasta dos meses, puesto que se ha demostrado que una gran porporción sirve de alimento a otros organismos como bacterias, virus, ácaros e incluso otros hongos (Saumell *et al.*, 2016).

Semana	IPR			IPA		
	F1	F2	F3	F1	F2	F3
1	24	12	5	24	12	5
2	30	22	18	47	31	22
3	48	26	18	72	50	36
4	35	21	25	82	60	52
5	21	12	30	86	65	66
6	8	13	28	87	70	76
7	7	12	17	88	73	80
8	11	12	16	89	76	83

La idea de escalado industrial se asocia a la optimización del proceso de crecimiento de un microorganismo desde el laboratorio hasta la planta de producción. Para ello, se definen una serie de etapas como concepción, ensayos de laboratorio, en planta piloto y producción industrial, en las que el volumen de producción aumenta de forma progresiva. Para utilizar clamidosporas de *D. flagrans*, resulta imprescindible producir cantidades suficientes para asegurar la obtención de los resultados esperados. En la aplicación práctica de este hongo filamentoso, parecen fundamentales dos variables, **cantidad**

requerida y *tiempo* necesario para obtenerla. En relación con el número de clamidosporas obtenidas, después de ocho semanas los recuentos medios fueron de 499500/recipiente en la **fase 1**, de 2104000/recipiente en la **fase 2** y de 2980000/recipiente en la **fase 3**. Esto indica que si la formulación a emplear requiere de concentraciones de clamidosporas de alrededor de 3000/mL, sería útil utilizar escalados a 1 L de medio. Si el requerimiento se sitúa entre 4000 y 5000, la elección sería escalar a 500 mL, pero si se precisan concentraciones ≥ 5000 clamidosporas/mL lo más apropiado sería emplear medios de 100 mL. Estos cálculos se refieren a un periodo de tiempo de ocho semanas, de modo que la modificación del intervalo también sería útil para adaptarse a las necesidades del momento. Por ejemplo, en caso de requerir 3000 clamidosporas/mL se podría recurrir a un escalado en 100 mL durante cuatro semanas, seis en 500 mL y ocho en 1 L (Fig. 44).

Por último, destacar que en las **fases 1 y 2** se describió una fase de incremento notable de la producción de clamidosporas, que tiene lugar en las primeras cuatro semanas, de manera que la concentración aumenta un 82% y un 60%, respectivamente; mientras que dicho aumento es de un 52% en la **fase 3**. Entre las semanas cinco y ocho, los aumentos fueron del 39%, 41% y 65% en las **fases 1, 2 y 3** respectivamente.

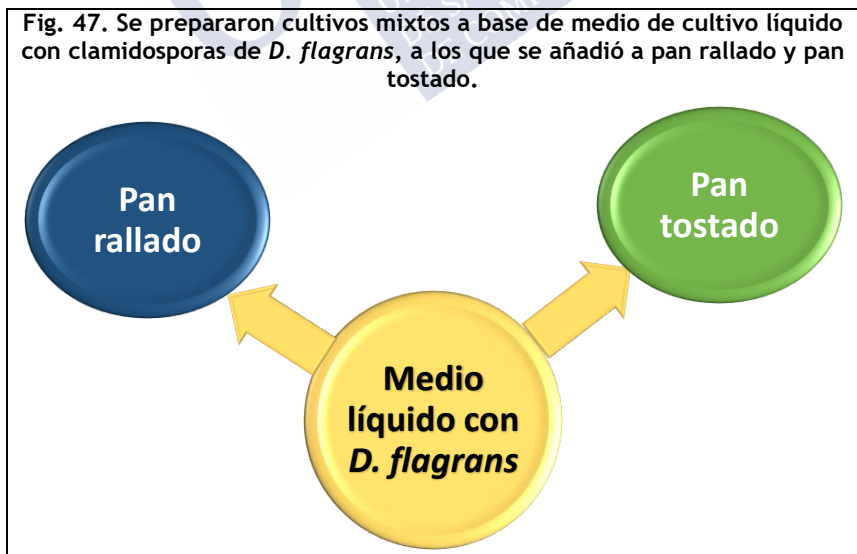


**6.- ENSAYO III:
PRODUCCIÓN DE ESPORAS
EN MEDIOS MIXTOS**



6.- ENSAYO III: Producción de esporas en medios mixtos

En los ensayos anteriores se demostró la utilidad y rendimiento de cultivos a base de agar marino con trigo, y también de medio líquido, para la propagación del hongo filamentoso *D. flagrans*. En base a los resultados obtenidos, se planteó la posibilidad de desarrollar procedimientos mixtos, basados en el empleo secuencial de diferentes medios. En concreto, se diseñó un procedimiento con una primera fase de cultivo del hongo filamentoso en medio líquido, y transcurrido un intervalo de tiempo, se añadió sobre dos alimentos, pan rallado y pan tostado (Fig. 47), considerando la facilidad de obtención, preservación y coste económico.



6.1. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1.1. Medio líquido + pan rallado

En primer lugar se realizó una fase de propagación de las esporas de *D. flagrans* en el medio de cultivo líquido (COPFr). Siguiendo las instrucciones descritas previamente (*cfr.* 5.1.3.), se reciclaron 44 botellas de plástico de 500 mL, y se prepararon para el cultivo de *D. flagrans* en 100 mL de medio de cultivo COPFr/recipiente, que se realizó mediante la adición de un inserto de 2 cm² de agar-marino-trigo extraído de placas madre en cabina de flujo laminar.

Después de colocar parafilm en la boca, los recipientes se mantuvieron a temperatura ambiente durante cuatro semanas, considerando que en el **Ensayo II** (*vide* 67) se demostró que al final de este intervalo se conseguían las mayores tasas de morfogénesis. La concentración media resultó de 2988 ± 881 clamidosporas / mL (Tabla 16).

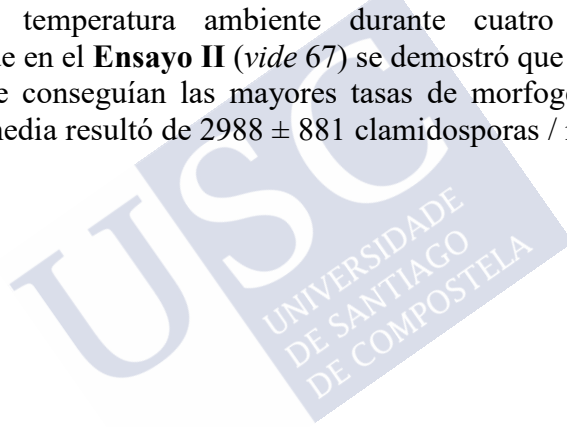


Tabla 16. Valores medios de clamidosporas por mL COPFr.

Placa	Promedio	DE	Placa	Promedio	DE
1	3550	753	23	2814	610
2	2780	620	24	3220	930
3	2446	652	25	3650	990
4	3120	875	26	3140	833
5	1360	850	27	3028	770
6	1380	680	28	3475	815
7	3630	950	29	2670	624
8	2500	890	30	3630	934
9	2780	870	31	2882	710
10	1430	640	32	2944	630
11	1664	875	33	3460	890
12	4250	1150	34	2190	646
13	3380	1004	35	2960	718
14	2460	850	36	3400	1142
15	2970	1290	37	3390	1274
16	3030	1168	38	3210	986
17	3540	1970	39	3358	1010
18	1870	620	40	3600	1024
19	1910	598	41	3384	830
20	2236	740	42	3650	918
21	3542	826	43	4210	965
22	3390	820	44	3980	846
Promedio ± DE: 2988 ± 881					

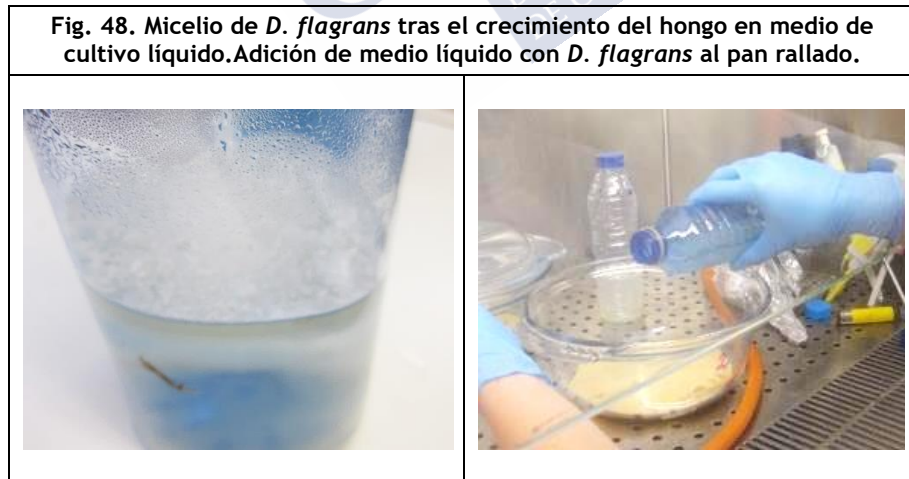
a) *Siembra de pan rallado con esporas de D. flagrans*

Se adquirió pan rallado en un establecimiento comercial, compuesto por harina de trigo (gluten), agua, sal y levadura. En la Tabla 17 se recoge la composición nutricional.

Tabla 17.- Composición (por 100g) de los medios empleados para el desarrollo de *D. flagrans*.

Medio	Valor energético	Proteínas	Hidratos de carbono		Lípidos	
			Totales	Azúcares	Totales	Saturados
Pan rallado	368,4 kcal	9,58 g	78,12 g	3,4 g	1,26 g	0,3 g

La fase siguiente consistió en colocar 100 g de pan rallado en cristalizadores de vidrio (Fig. 48), que se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 16 min, junto con cubetas de PVC y agua destilada milli Q. A continuación, se dejaron enfriar en cabina de flujo laminar hasta alcanzar temperatura ambiente (18-20°C), y se añadieron 80 mL de medio de cultivo líquido con *D. flagrans* (2988 clamidosporas/mL) y 20 mL de agua destilada en cada cristalizador, procediéndose a combinar de forma adecuada todos los elementos.



Finalmente, la mezcla se transfirió a las cubetas de PVC previamente autoclavadas, que se taparon con parafilm y se mantuvieron a temperatura ambiente durante seis semanas. Este procedimiento se realizó en un total de 24 cubetas.

*b) Evaluación del desarrollo de *D. flagrans* en medio con pan rallado*

Cada semana se estimó la concentración de clamidosporas en el medio. Para ello, seseleccionaron cuatro cubetas y se tomaron cinco muestras de 1 g del medio, que se disolvieron en 5 mL de agua para asegurar su máxima disolución. De cada muestra se tomaron cuatro alícuotas de 25 μ L, que se colocaron entre cubre y porta de vidrio para su observación al microscopio óptico (Leica DM2500) (10X) y establecer el número de clamidosporas.

En la evaluación del grado de desarrollo de *D. flagrans* se tuvieron en cuenta el Índice Semanal de Esporogénesis (ISE), la Tasa Semanal de Esporogénesis (TSE), el Incremento Porcentual Relativo (IPR) y el Incremento Porcentual Absoluto (IPA).

6.1.2. Medio líquido + pan tostado

*a) Siembra de pan tostado con esporas de *D. flagrans**

Se emplearon hogazas de pan tostado adquirido en un establecimiento comercial, de 3x4x0,5 cm y un peso aproximado de 5 g, cuyos ingredientes eran harina de trigo (gluten), levadura, aceite de girasol alto oleico, azúcar, sal, mejorante panario, y harina de malta cebada. La composición nutritiva se refleja en la Tabla 18.

Tabla 18. Composición (por 100g) de los medios empleados para el desarrollo de *D. flagrans*.

Medio	Valor energético	Proteínas	Hidratos de carbono		Lípidos	
			Totales	Azúcares	Totales	Saturados
Pan tostado	389 kcal	11,5 g	73,4 g	5,2 g	4,6 g	0,5 g

Se colocaron cuatro hogazas en 30 cajas de translúcidas de polipropileno (15 x 6 x 15 cm) (1,3 L de volumen) (Fig. 49) con un

Fig. 49. Se añadió medio de cultivo líquido con esporas a hogazas de pan tostado.



orificio de 5 mm de diámetro en la parte superior de cada pared para facilitar el intercambio gaseoso, que se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 16 min, junto con agua destilada milli Q. Después de enfriar en cabina de flujo laminar hasta que la temperatura disminuyó a $\approx 18-20^{\circ}\text{C}$, se añadieron 20

mL de medio de cultivo líquido con una concentración de 2988 clamidosporas *D. flagrans*/mL, poniendo especial cuidado en que las hogazas se humedeciesen completamente. Se colocaron las tapas, y las cajas se mantuvieron a temperatura ambiente durante seis semanas.

b) Evaluación del desarrollo de D. flagrans en medio con pan tostado

Con objeto de examinar el desarrollo de *D. flagrans* en el medio, cada semana se separaron cinco cajas, y de cada una se recogieron cinco muestras de 1 g de medio, que se introdujeron en tubos de plástico con 5 mL de agua. Después de homogeneizar completamente, se tomaron cuatro alícuotas de 25 μL , que se colocaron entre porta y cubre de vidrio, y se analizaron bajo microscopio óptico (Leica DM2500) (10X) para el recuento de clamidosporas identificadas.

En la evaluación del grado de desarrollo de *D. flagrans* se consideró el Índice Semanal de Esporogénesis (ISE), la Tasa Semanal de Esporogénesis (TSE), el Incremento Porcentual Relativo (IPR) y el Incremento Porcentual Absoluto (IPA).

6.1.3. Análisis estadístico

Se empleó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar si los datos se ajustaban a una distribución normal, en cuyo caso se examinaron con Análisis de Varianza (ANOVA) a un nivel de significación de $P < 0,05$. Todas las pruebas se realizaron con el paquete estadístico IBM® SPSS® Statistics, versión 22 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

6.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.2.1. Producción de clamidosporas

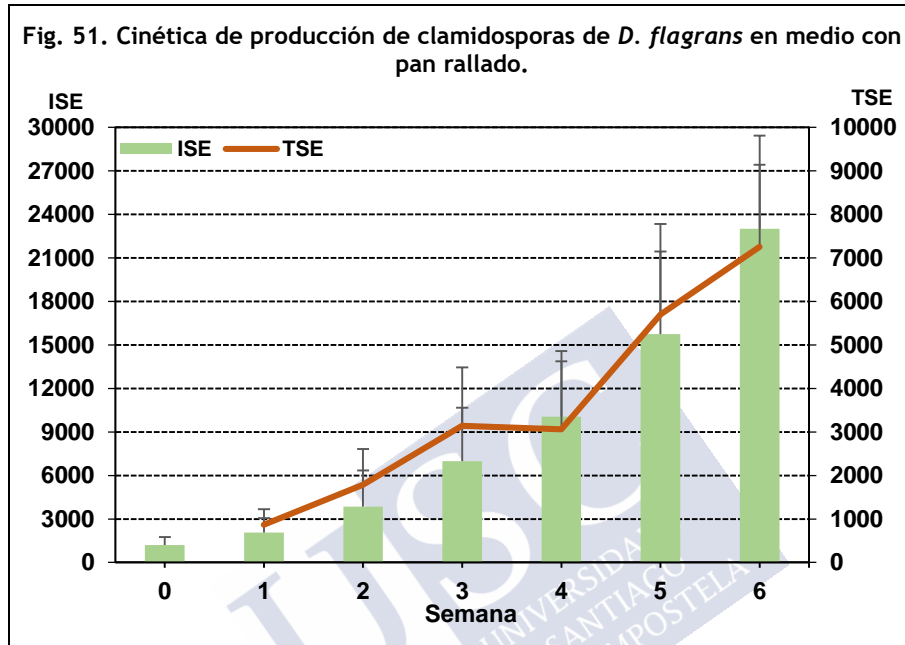
Con la adición de esporas de *D. flagrans* en medio líquido a pan rallado se estimuló el crecimiento del hongo en este medio (Fig. 50). De las 24 cubetas inicialmente preparadas, hubo que retirar ocho en el transcurso del ensayo debido a la aparición de contaminación por bacterias y hongos diferentes a *D. flagrans*.

Fig. 50. Desarrollo de micelio de *D. flagrans* en cubetas con pan rallado.



En las tres primeras semanas, los valores del ISE llegaron a las 6990 clamidosporas/MI (Fig. 51), y a partir de este momento se produjo

un incremento de la esporogénesis, obteniéndose un recuento promedio de 23000 a las seis semanas.



En relación con la TSE, se observó un patrón similar al del ISE, incrementándose de forma notable en especial desde la semana cuatro hasta la sexta.

Como se resume en la Tabla 19, en las tres primeras semanas de ensayo el IPR resultó del 42-46%, descendiendo hasta el 32% hacia el final. Los valores del IPA aumentaron en relación con el tiempo, obteniéndose porcentajes del 92-95% en la sexta semana.

Tabla 19. Valores de Incremento Porcentual Relativo (IPR) y Absoluto (IPA) en medio con pan rallado.						
Semana	1	2	3	4	5	6
IPR	42	46	45	30	36	32
IPA	42	69	83	88	92	95

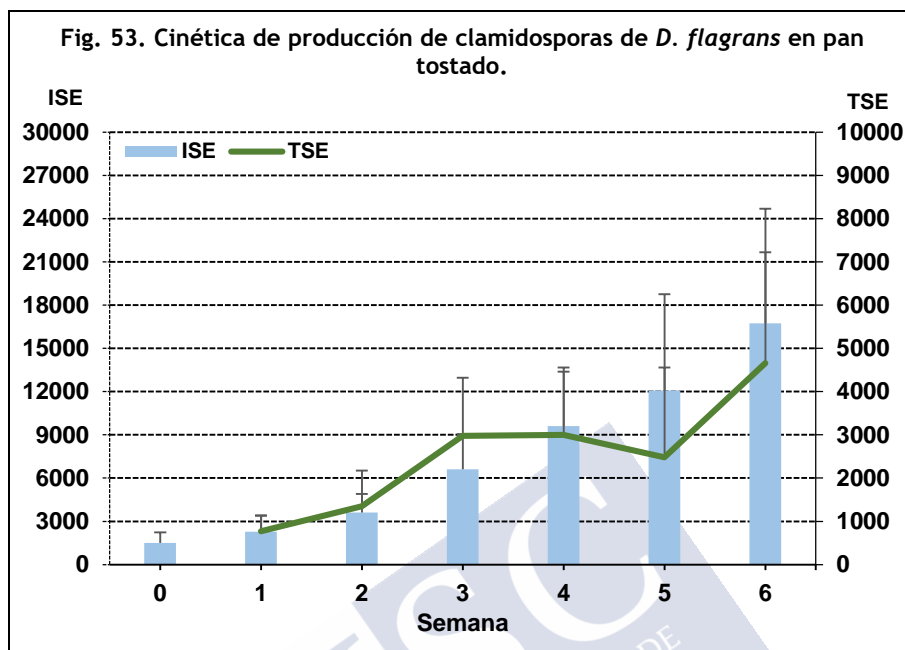
En la figura 52 se muestra el desarrollo notable de micelio en hogazas de pan tostado, que previamente habían sido humedecidas con medio acuoso en el que se cultivó *D. flagrans* en una primera fase. Debido a que se contaminaron once de las cajas preparadas al inicio, se procedió a su retirada.

Fig. 52. Desarrollo de micelio de *D. flagrans* en pan tostado.



Durante las tres primeras semanas, la producción de clamidosporas resultó lenta, y el ISE mostró valores alrededor de 6000 clamidosporas/mL (Fig. 53). Entre las semanas cuatro y seis el aumento de los recuentos de esporas fue notable, alcanzándose los máximos en la última (16740).

El incremento semanal de la producción de clamidosporas (TSE) exhibió tres etapas (Fig. 53), crecimiento en las tres primeras semanas, a continuación una fase de meseta hasta la quinta semana, y finalmente otra fase de crecimiento.



En la Tabla 20 se muestran el incremento porcentual relativo (IPR) durante todo el ensayo, comprobándose que en las primeras cuatro semanas los valores oscilaron entre el 34 y el 45%, y hacia el final de la prueba disminuyeron a 21-28%. El IPA aumentó de forma significativa en especial durante las tres primeras semanas, obteniéndose un valor del 91% al final del ensayo.

Tabla 20. Valores de Incremento Porcentual Relativo (IPR) y Absoluto (IPA) en medio con pan tostado.

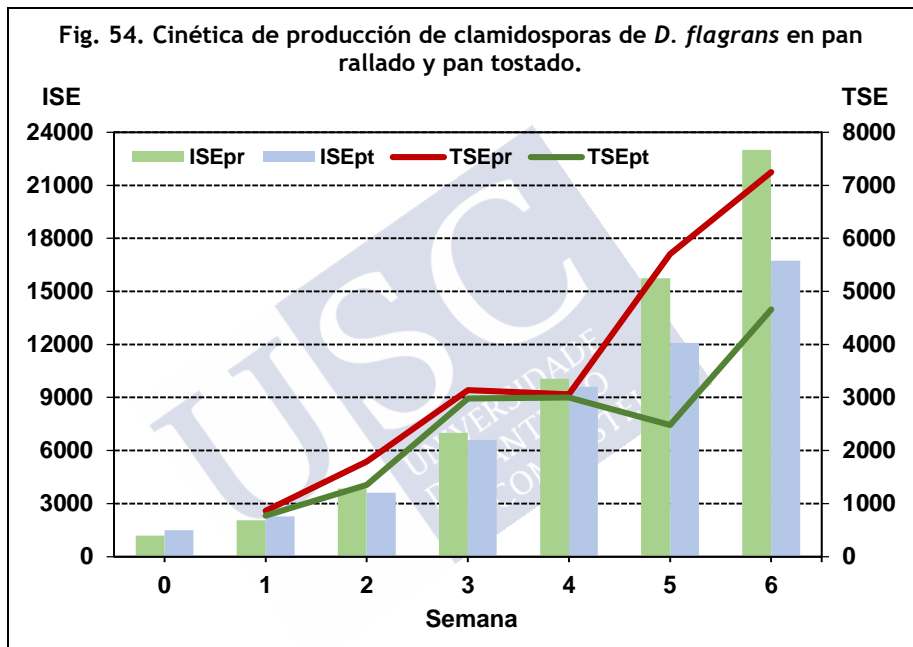
Semana	1	2	3	4	5	6
IPR	34	37	45	31	21	28
IPA	34	59	77	84	88	91

6.2.2. Comparación de los resultados

De los dos ensayos mixtos realizados con medio líquido en el que previamente se había cultivado *D. flagrans*, los recuentos más elevados se obtuvieron al verterlo sobre pan rallado, como se aprecia en la Figura

54. Hasta la cuarta semana, se observaron valores de ISE similares, y a partir de este momento aumentaron de forma más notable en pan rallado, resultando 1,4 veces superior ($F= 0,165, 0,692$).

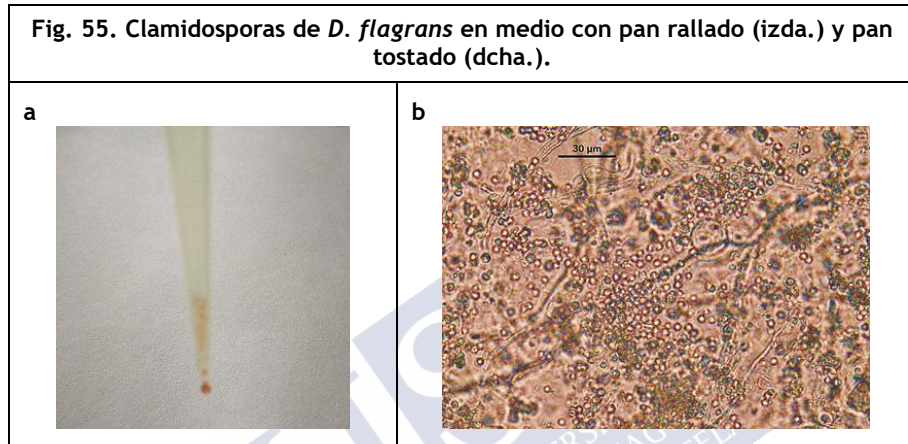
La tasa semanal de esporogénesis (TSE) resultó similar en ambos ensayos hasta la cuarta semana (Fig. 54); a continuación, la TSE aumentó de forma considerable en el pan rallado y mostró valores 1,6 superiores a los obtenidos con pan tostado ($F= 0,934, 0,357$).




Al comparar los valores del IPR, se comprobó una notable similitud en los dos ensayos, con los porcentajes más elevados durante las tres primeras semanas y un descenso a continuación. El análisis del IPA mostró valores más elevados en medio con pan rallado.

En la interpretación de los datos recabados en estos dos ensayos es necesario tener en cuenta la dificultad para realizar los recuentos de clamidosporas en medio con pan tostado, mucho más elevada que con pan rallado. Además del inconveniente ya reseñado de la coloración del medio (pardo-amarillenta), se detectó un número muy elevado de estructuras refringentes, vesículas lipídicas, diferentes estructuras

derivadas de la composición de las hogazas, que dificultaron la propia toma de alícuotas con micropipeta, e hicieron realmente tedioso el recuento bajo microscopio, prolongándolo de forma considerable. Incluso se llegó en numerosas ocasiones a diluir con agua el medio mixto, para tratar de solucionar estos problemas, pero el resultado no fue exitoso (Fig. 55).



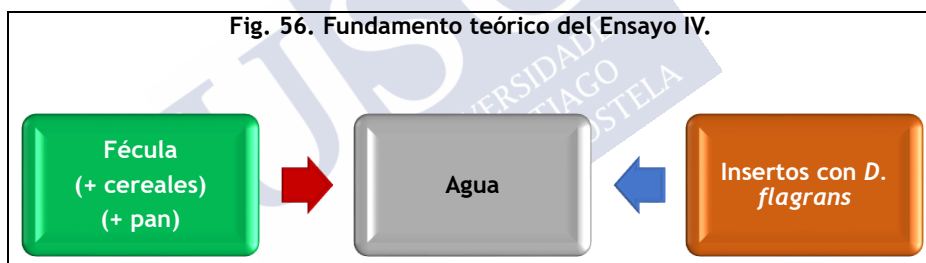


**7.- ENSAYO III:
PRODUCCIÓN DE ESPORAS
EN MEDIOLÍQUIDO ENRIQUECIDO**



7.- ENSAYO IV: Producción de esporas en medio líquido enriquecido

Los inconvenientes señalados con el enriquecimiento de medios líquidos con pan, sobre todo en relación a la facilidad de contaminación, llevaron a considerar el empleo de medios líquidos enriquecidos con cereales. En concreto, se decidió preparar un medio compuesto por agua + fécula (almidón de maíz), y compararlo con otro a base de agua + fécula + pan rallado (Fig. 56).



7.1. MATERIAL Y MÉTODOS

Con objeto de disponer de clamidosporas para sembrar el medio a base de fécula, se emplearon 10 placas con medio agar-marino-trigo, que se sembraron con insertos retirados de una placa madre, y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 28 días. Transcurrido este periodo, se seleccionaron seis placas que mostraban buen crecimiento, y se procedió como se indica en el apartado 5.1.4., dividiendo el medio en cada una en 17 insertos de 2 cm². El recuento de clamidosporas en las placas mostró un valor medio de 23926 ± 3361/cm² (Tabla 21).

Tabla 21. Valores medios de clamidosporas por cm² de agar-marino-trigo.

Placa	Promedio	DE	Placa	Promedio	DE
1	21560	2750	6	22080	3540
2	18800	2550	7	25430	3700
3	19350	3630	8	28320	2850
4	26680	3000	9	24060	2875
5	25500	5300	10	27480	3420
Promedio ± DE: 23926 ± 3361					

7.1.1. Medio líquido + fécula

Para incentivar la propagación de *D. flagrans*, en botellas de cristal de 500 mL se preparó un medio a base de agua (100 mL) + 6 g de fécula (almidón de maíz). En la Tabla 22 se resume la composición nutritiva de la fécula.

Tabla 22.- Composición (por 100g) de los medios empleados para el desarrollo de *D. flagrans*.

Medio	Valor energético	Proteínas	Hidratos de carbono		Lípidos	
			Totales	Azúcares	Totales	Saturados
Fécula	355 kcal	0,5 g	86 g	0 g	0,5 g	0,1 g

a) Siembra con insertos con esporas de *D. flagrans*

Después de esterilizar las botellas con el medio (121°C/16 min), se dejaron enfriar en una cabina de flujo laminar. El paso siguiente consistió en depositar dos insertos de agar-marino-trigo de 2 cm² (cfr: 5.1.4.), tapar con una torunda de algodón y mantener a temperatura ambiente y ciclos naturales de luz-oscuridad durante seis semanas (Fig. 57).

7.- ENSAYO IV: PRODUCCIÓN DE ESPORAS EN MEDIO LÍQUIDO ENRIQUECIDO

Fig. 57. Desarrollo de micelio de *D. flagrans* en medio líquido con fécula.



b) Evaluación del desarrollo de *D. flagrans* en medio con fécula

Se prepararon 48 botellas con medio a base de fécula, y cada semana se analizaron ocho; este procedimiento consistió en homogeneizar su contenido con una batidora, y tomar seis alícuotas de 25 μ L del medio, que se observaron entre porta y cubre al microscopio (Leica DM2500) (10X), para facilitar la estimación del número de clamidosporas por mL.

El análisis del desarrollo de *D. flagrans* en este medio se basó en el cálculo del Índice Semanal de Esporogénesis (ISE), la Tasa Semanal de Esporogénesis (TSE), el Incremento Porcentual Relativo (IPR) y el Incremento Porcentual Absoluto (IPA), según las fórmulas mostradas en el apartado 5.1.5.

7.1.2. Medio líquido + fécula + pan rallado

Se preparó un medio compuesto por agua (100 mL) + 6 g de fécula (almidón de maíz) + 6 g pan rallado, cuya composición nutritiva se presenta en la Tabla 23.

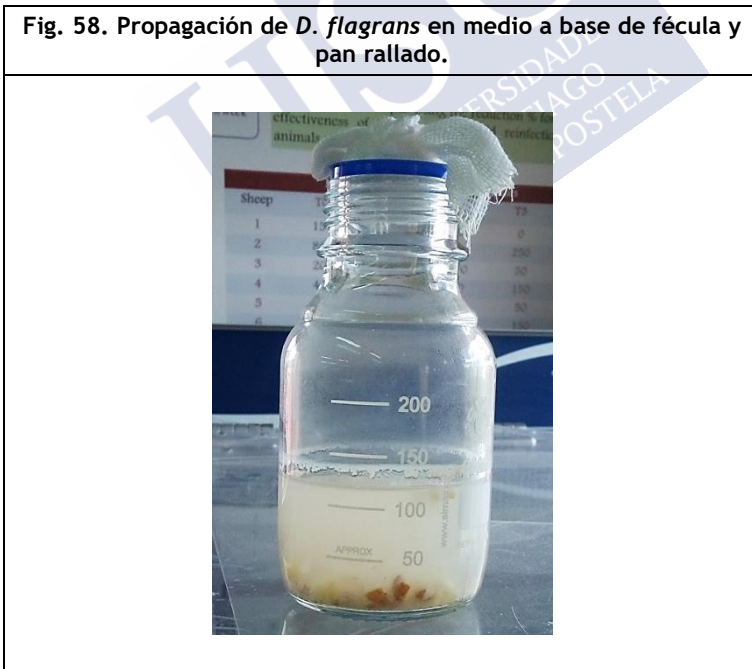
Tabla 23.- Composición (por 100g) de los medios empleados para el desarrollo de *D. flagrans*.

Medio	Valor energético	Proteínas	Hidratos de carbono		Lípidos	
			Totales	Azúcares	Totales	Saturados
Fécula	355 kcal	0,5 g	86 g	0 g	0,5 g	0,1 g
Pan rallado	368,4 kcal	9,58 g	78,12 g	3,4 g	1,26 g	0,3 g

a) Siembra con insertos con esporas de *D. flagrans*

Como se mencionó en el apartado anterior (cfr. 7.1.1.), se colocaron dos insertos de agar-marino-trigo de 2 cm² obtenidos de placas madre con *D. flagrans*(cfr. 5.1.4.) en botellas con 100 mL del medio que previamente habían sido esterilizadas en autoclave (121°C/16 min). Se utilizaron 48 botellas que se mantuvieron a temperatura ambiente y ciclos naturales de luz-oscuridad durante seis semanas (Fig. 58).

Fig. 58. Propagación de *D. flagrans* en medio a base de fécula y pan rallado.



7.- ENSAYO IV: PRODUCCIÓN DE ESPORAS EN MEDIO LÍQUIDO ENRIQUECIDO

*b) Evaluación del desarrollo de *D. flagrans* en medio con fécula + pan tostado*

Cada semana se analizó la producción de clamidosporas de *D. flagrans* de ocho botellas con medio a base de fécula + pan tostado, procediendo de acuerdo a lo indicado en la sección 7.1.1. De igual modo, se calcularon los valores del Índice Semanal de Esporogénesis (ISE), la Tasa Semanal de Esporogénesis (TSE), el Incremento Porcentual Relativo (IPR) y el Incremento Porcentual Absoluto (IPA) (cfr. 5.1.5.).

7.1.3. Análisis estadístico

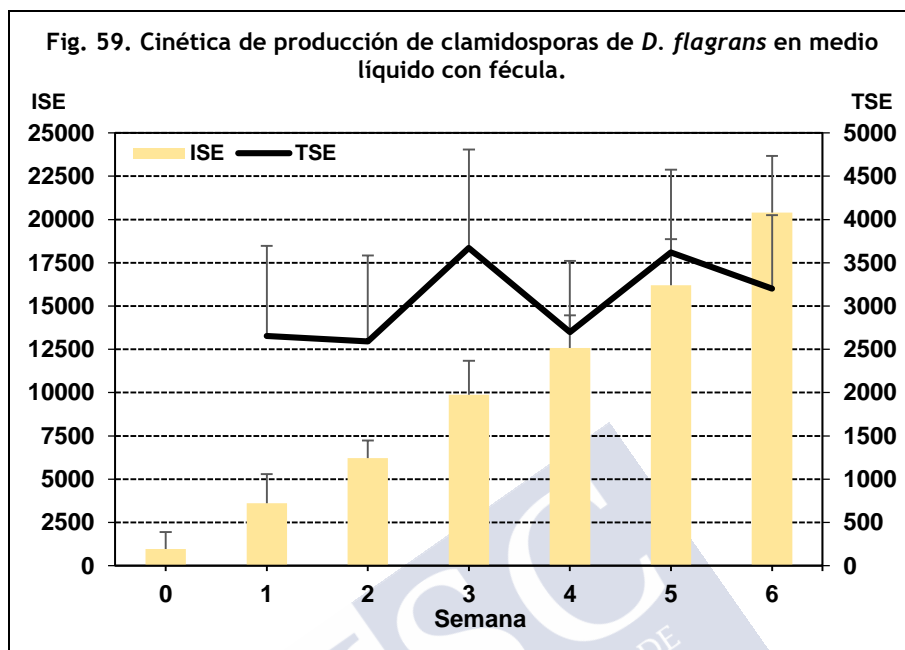
Los datos obtenidos se analizaron con la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar si se ajustaban a una distribución normal, en cuyo caso se examinaron con Análisis de Varianza (ANOVA) a un nivel de significación de $P < 0,05$. Se empleó el test de Bonferroni para el análisis *post-hoc* de los datos, y establecer las posibles diferencias entre diferentes grupos de forma conjunta.

Todas las pruebas se realizaron con el paquete estadístico IBM® SPSS® Statistics, versión 22 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

7.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.2.1. Producción de clamidosporas

En la figura 59 se puede observar que el Índice Semanal de Esporogénesis (ISE) de *D. flagrans* en medio acuoso con fécula aumentó rápidamente en las primeras semanas, mostrando un incremento gradual hasta el final del ensayo (20400 ± 3200). Los valores de la Tasa Semanal de Esporogénesis (TSE) no mostraron variaciones notables, y oscilaron entre 2656 y 3670.



En la Tabla 24 se puede observar que el Incremento Porcentual Relativo (IPR) en los recuentos de clamidosporas del hongo filamentosó disminuyó progresivamente durante el intervalo de seis semanas, alcanzando valores del 73% al 21%. Por el contrario, el Incremento Porcentual Absoluto (IPA) aumentó con el tiempo, obteniéndose porcentajes del 73% al inicio, hasta el 95% al final.

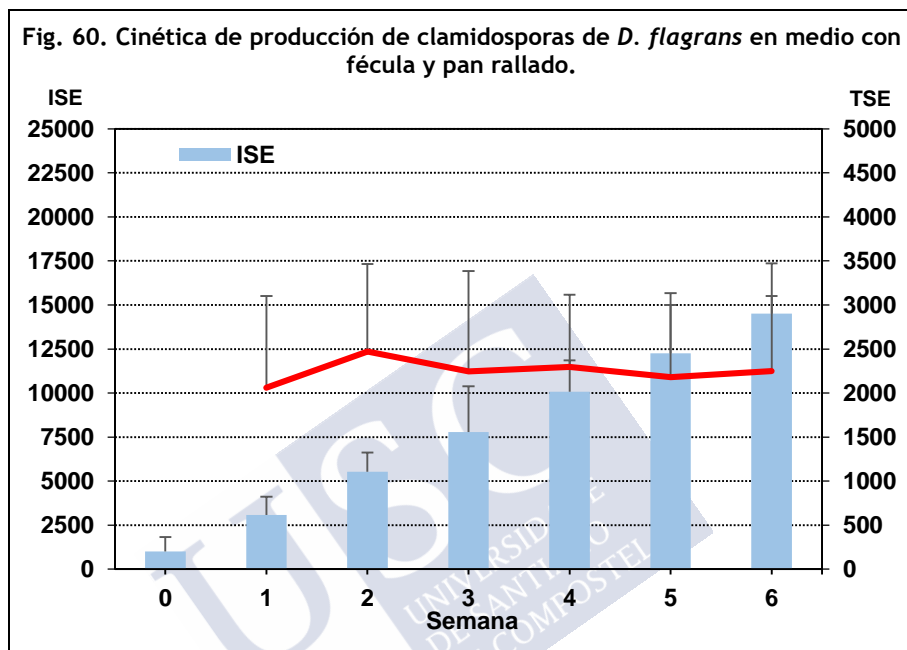
Tabla 24. Valores de Incremento Porcentual Relativo (IPR) y Absoluto (IPA) en medio con fécula.

Semana	1	2	3	4	5	6
IPR	73	42	37	21	22	21
IPA	73	84	90	92	94	95

Al añadir pan rallado al medio acuoso con fécula se comprobó (Fig. 60) que el número de clamidosporas de *D. flagrans* también aumentaba de forma notable a lo largo del intervalo, alcanzándose el máximo en la sexta semana (ISE= 14510 ± 2250 clamidosporas/mL). La Tasa

7.- ENSAYO IV: PRODUCCIÓN DE ESPORAS EN MEDIO LÍQUIDO ENRIQUECIDO

Semanal de Esporogénesis (TSE) exhibió valores más o menos constantes durante todo el periodo de estudio, oscilando entre 2062 y 2470.



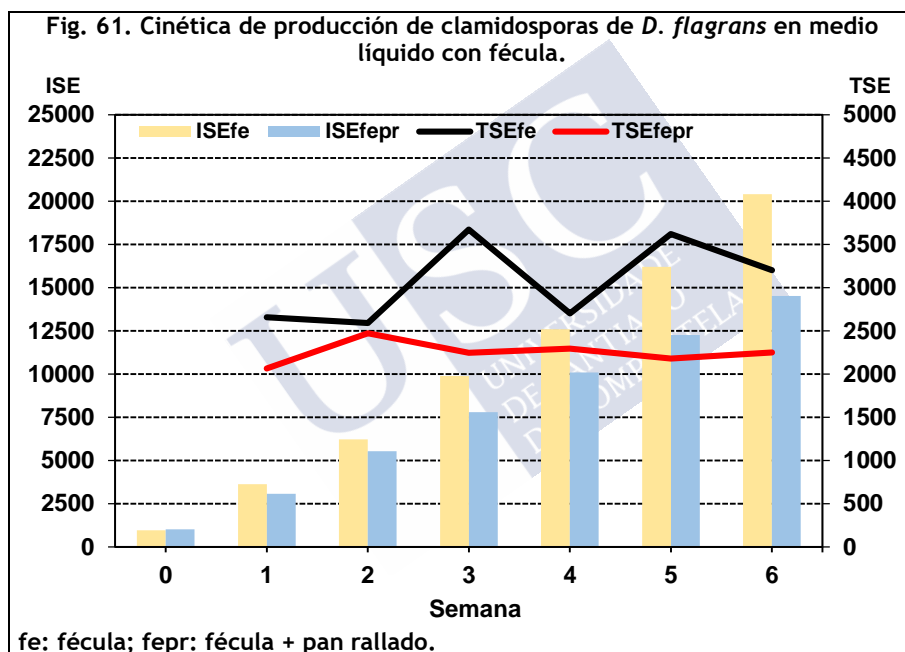
Los incrementos porcentuales relativos (IPR) más elevados se obtuvieron en las dos primeras semanas (67-45%), y se ralentizaron hacia las últimas semanas (16%) (Tabla 25). Los valores del IPA oscilaron entre el 67% (primera semana) y el 93% (sexta).

Tabla 25. Valores de Incremento Porcentual Relativo (IPR) y Absoluto (IPA) en medio con fécula y pan rallado.

Semana	1	2	3	4	5	6
IPR	67	45	29	23	18	16
IPA	67	82	87	90	92	93

7.2.2. Comparación de los resultados

Como se puede observar en la figura 61, en ambos medios a base de fécula, la esporogénesis aumentó de forma progresiva durante el ensayo, pero la adición de pan rallado al medio compuesto por agua y fécula no incrementó el ISE, y en ausencia del pan los recuentos de clamidosporas fueron 1,1-1,4 superiores ($F= 0,481$, $P= 0,501$). Los valores de TSE fueron 1,2-1,7 veces superiores en el medio que solo contenía fécula, y estas diferencias resultaron estadísticamente significativas ($F= 15,501$, $P= 0,003$).

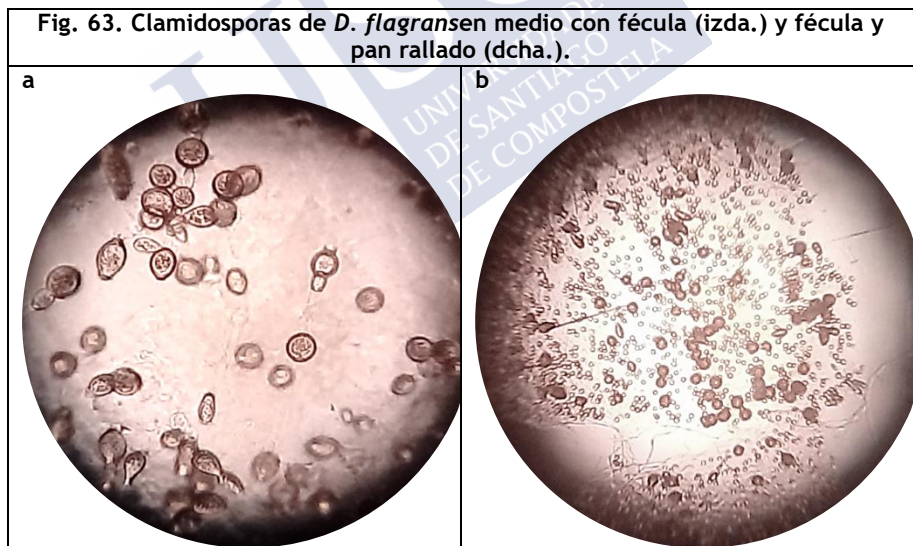
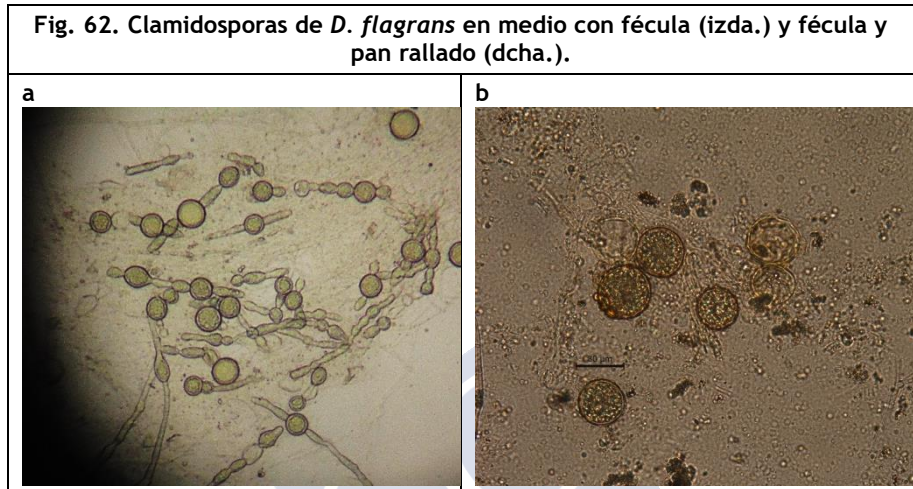


Con la adición de pan rallado se buscaba dotar al medio de mayor presencia en cereales (nitrógeno); sin embargo, surgió una traba inesperada, que consistió en la dificultad para el recuento de clamidosporas en presencia del pan (Fig. 62).

Como se aprecia en la Fig. 62, la incorporación del pan rallado confirió al medio una coloración pardo-amarillenta, muy similar a la que presentan las clamidosporas de forma natural, lo que alargó

7.- ENSAYO IV: PRODUCCIÓN DE ESPORAS EN MEDIO LÍQUIDO ENRIQUECIDO

considerablemente el tiempo del recuento, y probablemente explique la obtención de valores inferiores.



Es importante hacer notar que pese a que estos datos no se incorporaron a la Memoria actual, únicamente en el medio con fécula se observó un elevado grado de esporogénesis (Fig. 63), destacando en especial la presencia de esporas de pequeño tamaño ($< 30 \mu\text{m}$),

fenómeno que se atribuyó a la *esporogénesis microcíclica* (Fig. 63b). En los medios con fécula y pan rallado, también se apreció este hallazgo, pero en menor grado.

De la comparación de las Tablas 24 y 25 se colige un patrón similar para el IPR y el IPA en ambos medios; el IPR descendió por debajo del 40% a partir de la tercera semana, mientras que el IPA aumentó progresivamente hasta alcanzar valores superiores al 90% en las últimas semanas.



A large, light blue watermark of the USC logo is positioned diagonally across the page. The logo consists of the letters 'USC' in a large, bold, sans-serif font, with the full name 'UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA' written in a smaller font below it.

8.- ANÁLISIS CONJUNTO DE LOS RESULTADOS



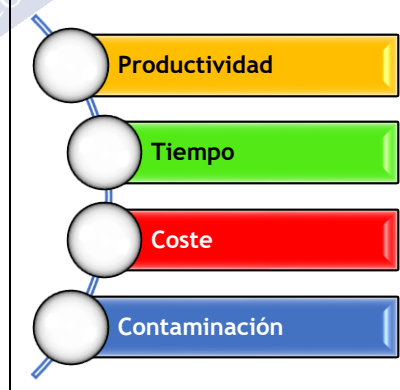
8.- ANÁLISIS CONJUNTO DE LOS RESULTADOS

Con objeto de dirimir cuál de las opciones ensayadas en esta investigación resulta más adecuada para la propagación de clamidosporas de *D. flagrans*, se llevó a cabo el análisis conjunto de los resultados obtenidos con cada uno de los medios utilizados, que se sustentó en dos pilares: de un lado, el rendimiento, y de otro, la aplicación práctica. Es importante tener en cuenta que este análisis debería realizarse de forma simultánea.

8.1. RENDIMIENTO

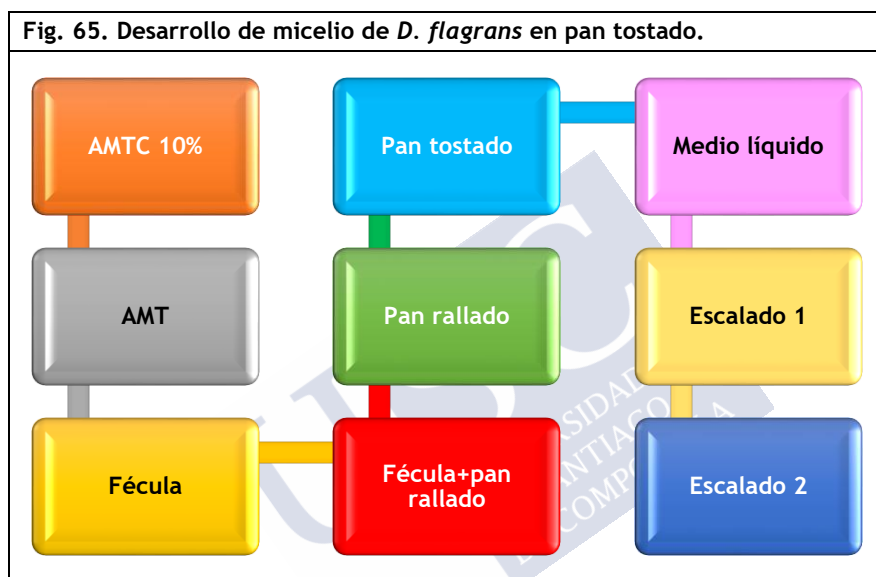
La valoración del rendimiento de los procedimientos aplicados para la propagación de clamidosporas de *D. flagrans* se basó en cuatro aspectos, productividad (relacionada con la cantidad de esporas), tiempo (entendido como periodo necesario para alcanzar una concentración determinada), coste (económico) y finalmente susceptibilidad de contaminación o experimentar alteraciones por otros microorganismos (Fig. 64). Debido a que la duración de los ensayos no siempre fue la misma, este análisis abarcó las primeras cuatro semanas.

Fig. 64. Parámetros considerados en el análisis del rendimiento.



8.1.1. Productividad

En la figura 65 se representa el orden establecido atendiendo al número de clamidosporas de *D. flagrans* por mL de medio de cultivo. Los recuentos más elevados en las primeras cuatro semanas se obtuvieron con medios sólidos a base de agar-marino (trigo y trigo-caldo), seguidos por los mixtos y a continuación los líquidos.



Los recuentos de clamidosporas en medios con agar-marino-trigo resultaron dos (sin caldo) y cuatro veces (10% caldo) superiores a los mixtos (Tabla 26), y 29 y 7 veces superiores a los líquidos. Como se recoge en la Tabla 24, en los medios sólidos las concentraciones de clamidosporas aumentaron semanalmente entre 1,5 y 2,9 veces, en los mixtos entre 1,3 y 3,8, y en los líquidos de 1,1 a 1,9 veces.

Estos resultados señalan que el empleo de medios compuestos por agar-marino-trigo hacen posible la obtención de grandes cantidades de esporas, que tiene lugar de forma constante a lo largo del tiempo, sin presentar variaciones importantes. Con la utilización de medios mixtos con fécula o pan rallado se consigue un buen rendimiento en cuatro semanas, mientras que los valores obtenidos con medio líquido y los

8. ANÁLISIS CONJUNTO DE LOS RESULTADOS

subsiguientes escalados no parecen sustentar la utilidad de este tipo de cultivos, para intervalos de cuatro semanas.

Tabla 26. Rendimiento de diferentes medios de cultivo para la producción de clamidosporas de <i>D. flagrans</i> .									
	Medio	Semana							
		1		2		3		4	
		N°	Δ	N°	Δ	N°	Δ	N°	Δ
Sólido	AMT	0	-	5039	-	7713	1,5	22187	2,9
	AMTC 10%	8727	-	24184	2,8	41639	1,7	86996	2,1
Líquido	Medio líquido	720	1,3	1030	1,4	1982	1,9	3030	1,5
	Escalado 1	1130	1,1	1452	1,3	1975	1,4	2499	1,3
	Escalado 2	530	1,1	646	1,2	784	1,2	1043	1,3
Mixto	Fécula	3620	3,8	6210	1,7	9880	1,6	12580	1,3
	Fécula+pan rallado	3070	3	5540	1,8	7785	1,4	10080	1,3
	Pan rallado	2060	3,7	3850	1,9	6990	1,8	10050	1,4
	Pan tostado	2270	1,5	3620	1,6	6600	1,8	9600	1,5

N°: recuento de clamidosporas/mL de medio; Δ: incremento semanal del recuento.
 AMT: agar-marino-trigo; AMTC 10%: AMT 10% caldo.

Existe poca información acerca del rendimiento de los cultivos preparados para la propagación de *D. flagrans* con objeto de obtener cantidades notables de clamidosporas. En medio agar-glucosa-Sabouraud suplementado con inositol ofreció un rendimiento de 51.715.000 clamidosporas por placa después de cuatro semanas a 27°C (Sagüés *et al.*, 2012), pero habría que tener en cuenta que la obtención de las esporas conlleva el raspado de la superficie de las placas, dado que no se considera comestible. Por el contrario, los medios con agar-

marino presentan la ventaja de poder administrarse sin operaciones intermedias.

8.1.2. Tiempo requerido

El interés de tener en cuenta este parámetro radica en poder llegar a determinar si se podría llegar a cubrir las necesidades de clamidosporas, en un intervalo de tiempo determinado, cuando se tome en consideración desarrollar programas de control integrado de parásitos en animales. Los datos presentados en la Tabla 27 indican que con medios líquidos es posible conseguir concentraciones alrededor de 4995 clamidosporas/mL si transcurre al menos un periodo de 6 semanas, que se convierten en 4208 después de idéntico intervalo con un escalado (de 100 a 500 mL); sin embargo, con dos escalados el recuento de esporas se reduce de forma importante (2980) al cabo de seis semanas. Estos rendimientos se alcanzarían en una semana con agar-marino-trigo 10%, dos semanas con fécula o fécula+pan rallado, tres semanas con medio mixto con pan rallado o tostado, o cuatro semanas con agar-marino-trigo sin caldo (AMT).

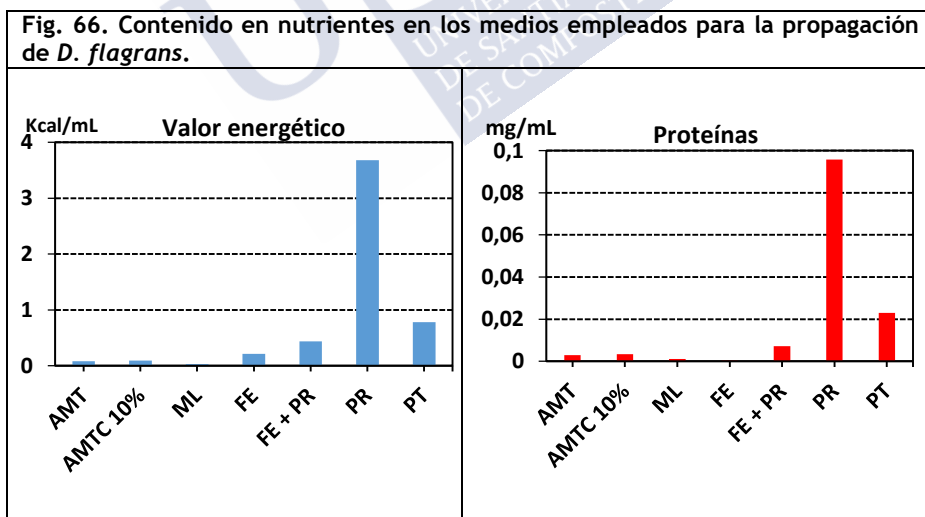
Tabla 27. Valores de clamidosporas/mL en diferentes medios de cultivo.					
	Medio	ISE	Semana	TSE	Semana
Sólido	AMT	8912	7		
	AMTC 10%	100088	7		
Líquido	Medio líquido	4995	8	1048	4
	Escalado 1	4208	8	524	4
	Escalado 2	2980	8	575	6
Mixto	Fécula	20400	6	3670	3
	Fécula+pan rallado	14510	6	2470	2
	Pan rallado	23000	6	7250	6
	Pan tostado	16740	6	4660	6

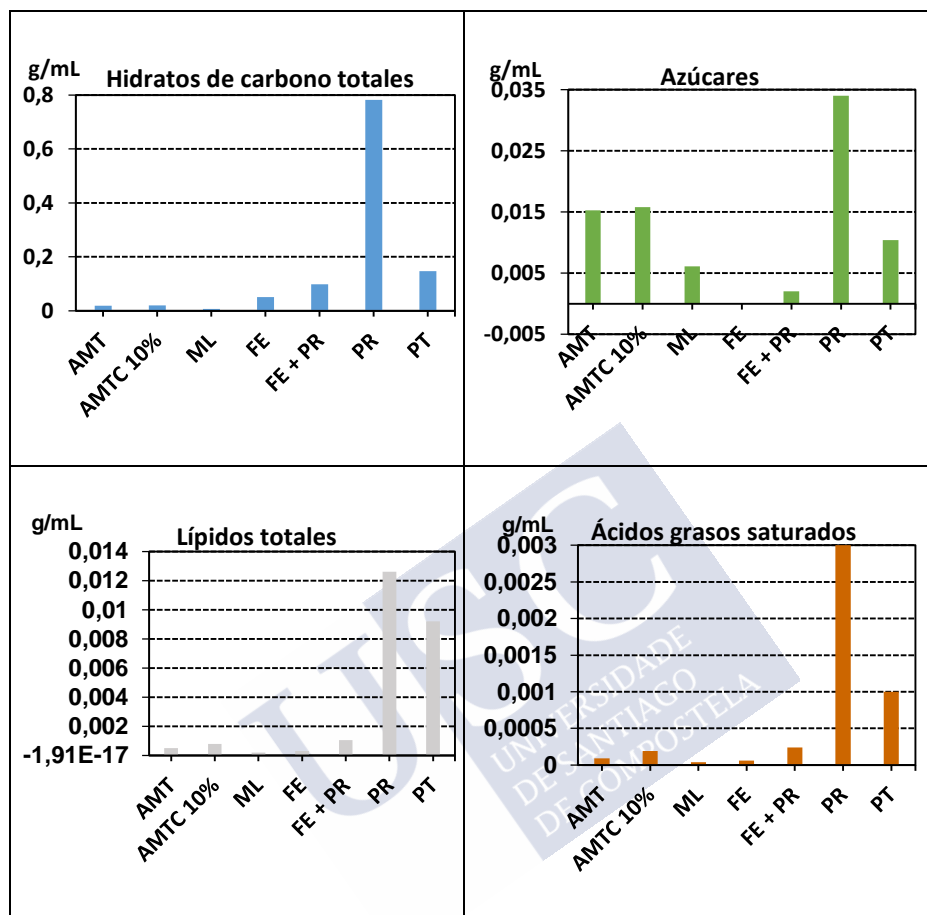
ISE: Índice Semanal de Esporogénesis; TSE: Tasa Semanal de Esporogénesis.
AMT: agar-marino-trigo; AMTC 10%: AMT 10% caldo.

8.1.3. Composición nutricional

Con objeto de profundizar en el conocimiento de la utilidad de los medios testados en la presente investigación, se tuvo en cuenta su composición nutritiva en términos de valor energético, contenido en proteínas, hidratos de carbono totales y azúcares, y lípidos y ácidos grasos saturados.

En la figura 66 se puede comprobar que la composición fue muy similar en todos los medios, a excepción del **pan rallado** y **pan tostado**, que arrojaron los valores más elevados, y el **medio líquido**, que presentó los más bajos. Si se tienen en cuenta los datos recogidos en la Tabla 27, no es posible discernir con claridad si existe relación entre la composición nutritiva y el rendimiento de los medios, puesto que las concentraciones más elevadas de clamidiosporas de *D. flagrans* se obtuvieron en los medios con agar-marino-trigo-caldo, pero los de mayor riqueza nutritiva resultaron a base de pan rallado y pan tostado. Sin embargo, sí es preciso tener en cuenta que el medio líquido resultó un medio *empobrecido*, en el que se obtuvo el menor rendimiento de clamidiosporas.





Para tratar de aclarar la influencia de la composición nutritiva sobre el rendimiento, se procedió a estimar el porcentaje que suponía cada nutriente (Tabla 28), observándose una composición muy similar en los medios con agar-marino-trigo, líquido y pan tostado (7% proteínas/46% hidratos de carbono/46% lípidos); en los compuestos por fécula y pan rallado disminuyó la proporción de proteínas y aumentó la de hidratos y lípidos. Asimismo, en relación con el porcentaje de azúcares sobre glúcidos totales y el de ácidos grasos saturados sobre lípidos totales, se comprobó que para los medios con agar y líquido suponían alrededor del 80% y 0,6% respectivamente, valores que disminuyeron sensiblemente en el resto de medios.

8. ANÁLISIS CONJUNTO DE LOS RESULTADOS

	Kcal	% Prots	% HC	% Lips	% Azs	% AGS
AMT	0,081	7,43	46,28	46,28	82,48	0,50
AMTC 10%	0,091	7,84	46,08	46,08	79,60	0,97
ML	0,031	7,58	46,21	46,21	85,55	0,52
Fécula	0,2130	0,29	49,86	49,86	0,00	0,12
Fe+Pr	0,4340	3,53	48,24	48,24	2,07	0,24
Pr	3,6800	5,78	47,11	47,11	4,35	0,38
Pt	0,7780	7,26	46,37	46,37	7,08	0,68

AMT: agar-marino-trigo; AMTC 10%: AMT 10% caldo; ML: medio líquido; FE: fécula; PR: pan rallado; PT: pan tostado.

Estas diferencias en la composición nutricional tampoco esclarecen el rendimiento de los medios, de modo que se consideró interesante relacionar la composición del medio agar-marino-trigo-caldo 10% (de mayor rendimiento) y el resto (Tabla 29).

Medio	Kcal	Proteínas	HC		Lípidos	
			Totales	Azúcares	Totales	Saturados
AMT	0,9	0,9	0,9	1,0	0,6	0,5
ML	0,3	0,3	0,4	0,4	0,3	0,2
Fécula	2,3	0,1	2,6	0,0	0,4	0,3
Fe+Pr	4,8	2,1	5,0	0,1	1,3	1,2
Pr	40,4	28,4	39,4	2,2	15,8	15,6
Pt	8,5	6,8	7,4	0,7	11,5	5,2

HC: hidratos de carbono; AMT: agar-marino-trigo; AMTC 10%: AMT 10% caldo; ML: medio líquido; FE: fécula; PR: pan rallado; PT: pan tostado.

En agar-marino-trigo *sin caldo* se apreció un menor contenido en lípidos (casi la mitad). El medio líquido presentó una reducción de 1/3-1/4 del valor energético, proteínico, glucídico y en lípidos totales, y 1/5

en ácidos grasos saturados. Por el contrario, la presencia de fécula se asoció a un incremento del valor energético e hidratos de carbono totales, y el pan proporcionó además proteínas y lípidos totales.

Los datos anteriormente expuestos llevan a considerar la implicación de otros aspectos, como por ejemplo el contenido en micronutrientes, dado que el análisis llevado a cabo en esta investigación se basó exclusivamente en algunos macronutrientes. A tal efecto, resulta interesante tener en cuenta estudios previos en los que se señaló el efecto estimulante del inositol sobre la producción de clamidosporas de *D. flagrans* en placas con agar Saboraud (Sagüés *et al.*, 2012). Ciertas investigaciones indicaron que este metabolito participa de forma activa en la reproducción sexual de *Cryptococcus neoformans* (Xue *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011), aunque en actinobacterias filamentosas (*Streptomyces coelicolor*) se ha asociado a la formación de septos en hifas aéreas, proceso en el que las membranas dobles crecen para formar septos de esporulación (Zhang *et al.*, 2016).

Otro punto que precisa aclaración es el de la consistencia del medio. Los mejores rendimientos se alcanzaron en medios viscoelásticos, y el empleo de medios sólidos de mayor dureza (pan) no supuso un estímulo de la esporogénesis. En relación con los medios líquidos, la disparidad en los resultados conseguidos en medio líquido *empobrecido* y el que contenía fécula conducen a descartar la influencia de la consistencia y centrarse en la composición nutritiva.

8.1.4. Coste

Un aspecto clave para la elección del medio a emplear en la propagación del hongo filamentoso lo constituye el coste aproximado, pero como se indicaba previamente, en realidad ha de analizarse teniendo en cuenta también el rendimiento del medio y el tiempo necesario para alcanzar los recuentos esperados.

El coste deviene directamente de la composición del medio, específicamente de los alimentos empleados y del agar marino. Puesto que en esta investigación los cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente, no parece necesario introducir estimaciones relacionadas con el tiempo de incubación en términos de gastos de electricidad. En la

8. ANÁLISIS CONJUNTO DE LOS RESULTADOS

estimación del coste se incluyó una cuantía de 1€ por L de agua destilada.

El menor importe se atribuyó a la preparación de medio líquido (emprobrecido), y el mayor a los que incorporaban fécula (Tabla 30), con valores intermedios para el resto. Si se ordenan los medios en función de la producción de esporas (Fig. 67a) y del coste de elaboración (Fig. 67b), resulta que prácticamente coinciden a excepción del AMTC 10%, que proporcionó mayor rendimiento, y el mixto FE+PR, de mayor coste pero con un rendimiento intermedio-bajo.

Estos datos conducen a considerar que en función de estos dos parámetros, el medio de elección sería el AMTC 10%, y a continuación el PT, siempre teniendo en cuenta las dificultades señaladas en apartados anteriores en relación con el recuento fiable de las clamidosporas de *D. flagrans*; con fécula se obtienen rendimientos importantes y el recuento es muy cómodo y factible, aunque se duplica el costo de producción.

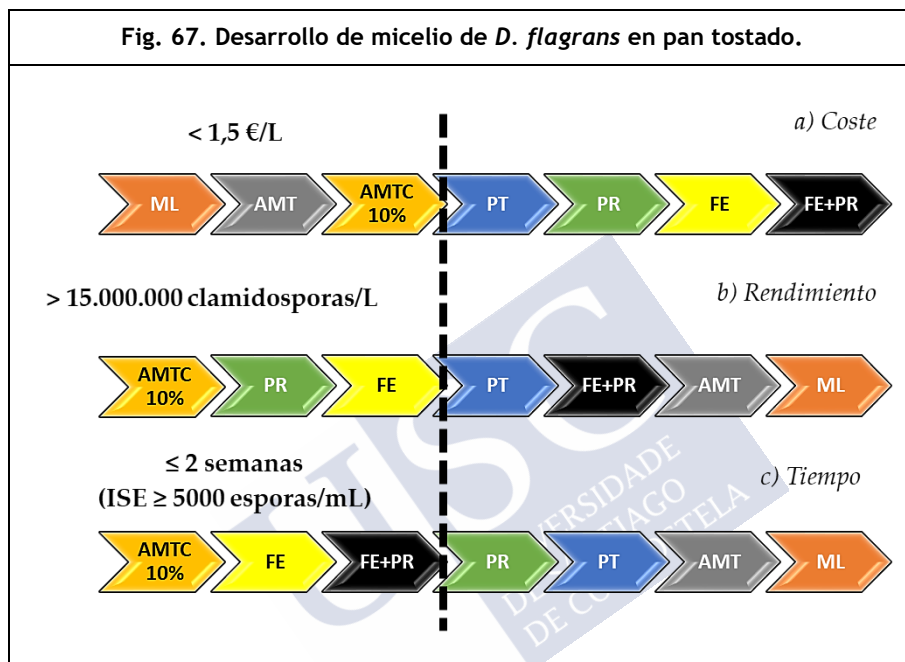
Tabla 30. Coste aproximado de medios de cultivo para producir clamidosporas de *D. flagrans*.

Medio	Coste/L	Esporas/L
AMT	1,35	8.912.000
AMTC 10%	1,45	100.088.000
ML		4.995.000
FE	3,52	20.400.000
FE + PR	3,58	14.510.000
PR	2,00	23.000.000
PT	1,52	16.740.000

AMT: agar-marino-trigo; AMTC 10%: AMT 10% caldo; ML: medio líquido; FE: fécula; PR: pan rallado; PT: pan tostado.

Si además de coste, rendimiento y facilidad de recuento, se considera el tiempo requerido para alcanzar concentraciones notables de clamidosporas (Fig. 67c), se llega a la conclusión de que el AMTC 10% resultaría el más adecuado, puesto que además de un precio bajo,

mayores recuentos y sencillez en el recuento, es el que ofrece condiciones para una esporogénesis más rápida que el resto de medios, seguido por el FE.



Es interesante destacar la trascendencia de esta información, puesto que facilita de forma significativa la capacidad de adaptación a diferentes situaciones que puedan surgir. Casi siempre se tiende a tener en cuenta en primer lugar el costo de producción, y a continuación el rendimiento. Sin embargo, ante circunstancias en las que se requieran cantidades elevadas de clamidosporas, sería posible impulsar la utilización de medios a base de fécula asumiendo que incrementaría el importe final; por el contrario, si no existe premura en las necesidades de clamidosporas, se podría seleccionar la opción de emplear medio de cultivo líquido, lo que reduciría notablemente su coste. También resulta relevante tener en cuenta que el medio con *pan rallado* se encuentra prácticamente en una posición intermedia según los aspectos

analizados, y que en caso de mejorar los procedimientos para el recuento de clamidosporas, probablemente conduciría a re-escribir el presente análisis.

8.1.5. Alteraciones de los medios

Además de los parámetros evaluados, un punto importante lo constituye la integridad de los medios que se emplean para la propagación de *D. flagrans*, que además de proporcionar un rendimiento adecuado, deben mantenerse inocuos y libres de contaminaciones secundarias por bacterias, virus u otras especies de hongos, que puedan suponer un perjuicio para la salud de individuos que entren en contacto con los mismos, además de limitar el acceso de *D. flagrans* a nutrientes y el menoscabo que podría suponer en términos de productividad (esporogénesis).

En anteriores apartados se han ido mencionando los inconvenientes que plantean algunos medios de cultivo, y en cuanto a la contaminación, los principales problemas se encontraron con los medios a base de pan rallado y pan tostado, y también en ocasiones con agar; por el contrario, los medios líquidos (*empobrecido* o mixtos con fécula) no experimentaron grandes dificultades en este sentido. Como se resumió en la figura 66, el *medio líquido* y el que incorpora *fécula* tienen un contenido reducido en proteínas, hidratos de carbono y lípidos totales, al contrario que *pan rallado* y *pan tostado*, con los mayores valores de los macronutrientes considerados; en *AMT* y *AMTC* destaca la importante presencia de azúcares (sobre el total de hidratos de carbono) como fuente de energía altamente accesible, que podría favorecer la aparición de microorganismos indeseados.

Otro aspecto a considerar es el de la preparación de los medios. Aquellos compuestos por agar se dispusieron en placas Petri, favoreciendo la propagación del hongo, pero también presentando una gran superficie de nutrientes susceptible de contaminación por microorganismos que se encuentran en el ambiente, a pesar de tomar las medidas oportunas para evitarlo como esterilización, manipulación en cámara de flujo laminar y empleo de luz UV. En la preparación de los medios con pan, también se emplearon recipientes *abiertos* y de

notable superficie, que posiblemente contribuyen a la aparición de contaminaciones por bacterias u otros hongos. Por el contrario, el medio líquido (*empobrecido*) y los mixtos a base de fécula se prepararon en botellas de cristal, lo que supone de un lado la reducción de la superficie de exposición, y de otro, la accesibilidad de microorganismos indeseados a los nutrientes, que se encuentran en fase acuosa. Este sistema presenta también la ventaja de que prácticamente resulta imposible que tengan lugar contaminaciones por cierto tipo de ácaros que se alimentan de *D. flagrans*, y que causan importantes mermas cuando se emplean placas con agar-trigo que se mantienen en espacios provistos de madera (Mendoza de Gives, comunicación personal).

En resumen, que la composición de los medios condiciona notablemente la preservación de sus características iniciales, por lo que es necesario tener en cuenta que con medios a base de agar o pan se requiere extremar todos los procesos, desde la esterilización a la siembra y posterior mantenimiento a temperatura ambiente, mientras que en los líquidos se ha de hacer especial hincapié en la siembra, asegurándose de que los insertos que se introducen en las botellas no se encuentren contaminados; con esta observación resultará muy improbable que estos medios lleguen a mostrar presencia de microorganismos, en especial de bacterias, de otras especies de hongos o de ácaros, problemas detectados en medios sólidos.

8.2. APLICACIÓN PRÁCTICA

La finalidad de la evaluación de diferentes medios de cultivo para la obtención de clamidosporas de *D. flagrans* es facilitar su distribución para que surtan su actividad parasiticida. Ya se ha mencionado con anterioridad que existe abundante conocimiento de la actividad de este hongo filamentoso sobre los estadios larvarios de algunas especies de estróngilos, nematodos gastrointestinales que desarrollan una fase de su ciclo biológico en el suelo, donde tiene lugar su transformación desde huevos eliminados en las heces de individuos infectados hasta las larvas de tercer estadio (L3), que son los estadios que provocan la infección en especial en animales en pastoreo (Buzatti *et al.*, 2015; Zarrin *et al.*,

8. ANÁLISIS CONJUNTO DE LOS RESULTADOS

2017; Bilotto *et al.*, 2018; Mendoza de Gives *et al.*, 2018). Por todo ello, se postulan dos acciones de mayor utilidad para prevenir la infección de animales en pastoreo, I) asegurar la presencia de *D. flagrans* en las heces de estos individuos, que reducirá las posibilidades de evolución de los parásitos hasta L3, o II) actuar sobre las larvas que se encuentran en el suelo para provocar su eliminación.

En un estudio presentado recientemente (Hernández, 2019) se indicó que las formulaciones fúngicas que podrían resultar más interesantes desde un punto de vista comercial eran como *aditivo alimentario*, que garantizaría la existencia del hongo en las heces, o como *biocida*, en cuyo caso *D. flagrans* actuaría sobre los estadios larvarios que ya se han desarrollado en el medio. Resulta incuestionable que el destino final de las esporas condiciona el medio en el que se obtienen, por lo que a continuación se analizarán estas dos posibilidades.

En base a los resultados del análisis de diferentes medios realizado en el presente estudio, se propone su aplicación para el desarrollo de diferentes formulaciones que podría llevarse a cabo de distintas formas (Tabla 31).

Los medios compuesto por agar-marino-trigo presentan una cierta viscosidad, que complica su distribución con pulverizadores por el riesgo de obstrucción de las boquillas, de modo que se aconsejaría su empleo como aditivo en alimentación animal, por ejemplo añadido a pellets antes de su administración (premezcla alimentaria) o incorporado durante la fabricación de alimento peletizado. Estas aplicaciones requerirían de la vigilancia de la homogeneidad de los productos finales, puesto que la naturaleza del medio no facilita la obtención de una mezcla uniforme, de ahí que no se pueda asegurar que los animales ingieran la cantidad establecida como necesaria.

En los medios acuosos (líquido *empobrecido* y con fécula), no se observarían los inconvenientes señalados para los sólidos a base de agar, de modo que además de hacer posible su utilización como aditivo alimentario, también lo sería como biocida, que se podría distribuir con ayuda de pulverizadores. Esta solución parece idónea en el caso de animales que se mantienen en parcelas de tamaño pequeño-mediano, que no reciben con frecuencia suplementos alimenticios; otra aplicación podría encontrarse en el control de parásitos en parques zoológicos,

para evitar modificar las características de los alimentos, como sabor, olor o consistencia.

Finalmente, los medios que contienen pan tampoco parecen adecuados para su distribución como biocidas, por la dificultad para su pulverización, **y se recomendaría su empleo como aditivo en premezcla o en concentrado alimentario.**

Tabla 31. Cultivos útiles para desarrollar diferentes formulaciones para <i>D. flagrans</i> .		
Medio	Formulación	Aplicación
AMT	Aditivo alimentario	Premezcla alimentaria Concentrado alimentario
AMTC 10%		
ML	Aditivo alimentario Biocida	Premezcla alimentaria Concentrado alimentario Pulverización
FE	Aditivo alimentario Biocida	
FE + PR	Aditivo alimentario	Premezcla alimentaria Concentrado alimentario
PR	Aditivo alimentario	
PT	Aditivo alimentario	
AMT: agar-marino-trigo; AMTC 10%: AMT 10% caldo; ML: medio líquido; FE: fécula; PR: pan rallado; PT: pan tostado.		

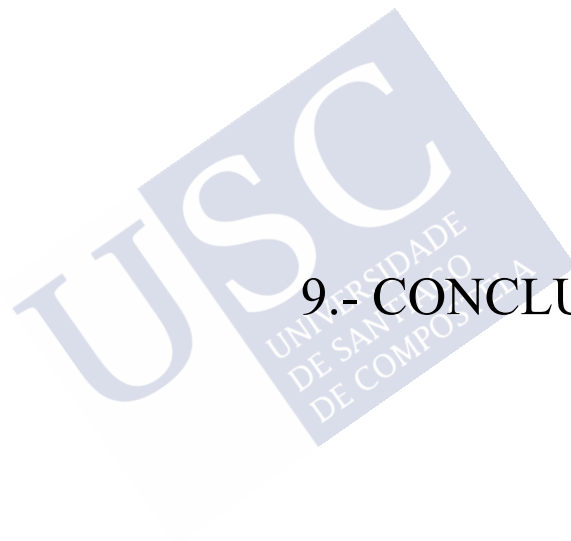
La administración de estructuras fúngicas por vía oral a los animales constituye una estrategia idónea para asegurar su presencia en la materia fecal, donde también se van a encontrar los huevos de los estróngilos (Saumell *et al.*, 2015). De este modo, de forma simultánea a la evolución de los huevos de los nematodos, tiene lugar el desarrollo del micelio de *D. flagrans*, donde las larvas finalmente serán atrapadas. En las dos últimas décadas se han desarrollado numerosos estudios en los que se han administrado clamidosporas de *D. flagrans* en soluciones orales, en premezcla alimentaria o en concentrado alimentario, como aditivo (Arias *et al.*, 2013a; Arroyo *et al.*, 2017; Silveira *et al.*, 2017a; Fernandes *et al.*, 2017; Hernández *et al.*, 2016, 2018a, b; Voinot *et al.*, 2020), e incluso ya se han registrado dos (Healey *et al.*, 2018; Braga *et*

8. ANÁLISIS CONJUNTO DE LOS RESULTADOS

al., 2020). En estas formulaciones, se han empleado de forma mayoritaria cultivos en placa con agar-trigo, y también medios a base de arroz, que se incuban a 25°C durante 3-4 semanas (Braga *et al.*, 2020). Se trata de procedimientos que requieren de una gran cantidad de espacio, y para evitar los problemas de contaminación, se suelen llevar a cabo en instalaciones de elevado nivel de protección, en el que los operarios deben vestir EPIs adecuados.







9.- CONCLUSIONES



9. CONCLUSIONES

Los ensayos realizados en el presente Estudio llevaron a concluir que:

- 1.- El empleo de medios de cultivo sólidos comestibles enriquecidos con caldo nutritivo hace posible una notable producción de esporas de *D. flagrans*, al tiempo que proporciona una formulación idónea para la administración directa a los animales por su comestibilidad.
- 2.- El medio líquido COPFr resulta de enorme interés y aplicabilidad para la obtención de cantidades elevadas de esporas de *D. flagrans*, facilitando además su distribución en diferentes formulaciones como pulverización directa sobre el suelo, preparación de premezclas alimentarias o incluso elaboración de alimentos.
- 3.- En la esporogénesis de *D. flagrans* en medio líquido se describen dos fases, una de crecimiento exponencial hasta la cuarta semana, y otra de multiplicación ralentizada entre la quinta y octava.

- 4.- La morfogénesis de *D. flagrans* en medio líquido incluye mecanismos de reproducción asexual en anaerobiosis, y de esporulación microcíclica, caracterizada por la aparición de esporas directamente a partir de otras esporas, sin la formación de micelio.
- 5.- La aplicación de procedimientos bifásicos en los que se intercalan un medio de cultivo líquido y otro sólido, puede entrañar grandes inconvenientes para el recuento de las esporas, especialmente si se emplea medios a base de pan.
- 6.- La producción de esporas de *D. flagrans* no depende de la composición en macronutrientes de los medios empleados.
- 7.- Con medios de cultivo sólidos, la producción de cantidades elevadas de esporas de *D. flagrans* es más rápida pero también más costosa, al contrario de lo que sucede con los medios líquidos. Esto ofrece la posibilidad de adaptarse a las necesidades del momento.
- 8.- La elección de un medio de cultivo para obtener esporas de *D. flagrans* ha de fundamentarse en el rendimiento, coste y vía de administración considerada.



**10.- RESUMEN /
RESUMO /
SUMMARY**



10. RESUMEN / RESUMO / SUMMARY

10.1. RESUMEN

La finalidad de la evaluación de diferentes medios de cultivo para la En las últimas décadas han tenido lugar cambios sustanciales en el control de infecciones parasitarias, poniéndose especial énfasis en la prevención como medida para evitar lesiones en animales (y también personas), proteger la eficacia de los antiparasitarios convencionales limitando su aplicación a los casos necesarios, y fomentar la sostenibilidad al disminuir los posibles efectos ecotóxicos que se derivan de la utilización de fármacos.

Entre las soluciones aportadas para eludir ciertas infecciones parasitarias, se ha planteado el control biológico, entendido como *un método ecológico desarrollado para disminuir la población parasitaria presente en el medio a niveles no perjudiciales, usando antagonistas naturales vivos*. Basándose en el descubrimiento de ciertas especies de hongos filamentosos saprófitos que se encuentran en el suelo, y que en presencia de algunos estadios parasitarios (ooquistes/quistes, metacercarias, huevos, larvas) exhiben la capacidad de alimentarse de ellos, se diseñaron algunas estrategias para evaluar la utilidad potencial de un número reducido de especies. *Duddingtonia flagrans* es la que ha concitado mayor interés desde el punto de vista veterinario, posiblemente por la capacidad nematófaga que despliega mediante la elaboración de *anillos* o *trampas* en el micelio, que sirven para capturar las formas inmaduras de nematodos estrongilados (L2, L3) que se desarrollan en el suelo.

Uno de los inconvenientes que plantea la aplicación de hongos filamentosos reside en la posibilidad de multiplicar de forma conveniente, y obtener estadios suficientes para abordar el control parasitario en situaciones reales. La mayoría de los programas que incluyen el empleo de *D. flagrans* se basan en la administración de esporas, generalmente formas de resistencia denominadas *clamidosporas*, que se obtienen en placas Petri con medio a base de agar y cereales. Sin embargo, esta metodología no resulta útil ni asequible desde un punto de vista económico, lo que ha llevado a la investigación de diferentes procedimientos para conseguir el escalado de la producción de esporas, y proporcionar una solución que acerque esta estrategia a las situaciones reales en las que se desenvuelve la ganadería. Con tal motivo, se planteó un estudio sustentado en cuatro ensayos, que incluyeron la preparación y evaluación de diferentes medios de cultivo. En el **primer ensayo** se prepararon medios de cultivo sólido a base de gelatina comestible, añadiéndose diferentes aditivos (trigo, zanahoria y caldo comercial), en aras no solo de para obtener cantidades elevadas de esporas de *D. flagrans*, sino también de intentar fomentar la aceptación entre las diferentes especies animales a las que iban destinadas. De este modo, se comprobó que tanto el agar bacteriológico como el *comestible* posibilitaban la obtención de cantidades notables de clamidosporas, y se procedió a añadir diferentes alimentos al agar comestible. Con zanahoria, se observó un crecimiento superior al medio de cultivo con trigo, pero el desarrollo no resultó proporcional a la concentración de zanahoria. Al añadir caldo de pollo las hifas crecieron rápidamente, con independencia de su concentración. Estos resultados señalan la idoneidad del medio a base de agar comestible – trigo – caldo para el desarrollo de programas de control mediante esporas de *D. flagrans*.

La administración de esporas de hongos se realiza, con elevada frecuencia, por vía oral, lo que conlleva el raspado de placas con agar y disolución en agua; el producto se puede proporcionar directamente si las especies animales lo permiten, o mezclado con alimento (concentrado, grano...). Esto supone algún que otro inconveniente, puesto que el agar que se suele utilizar no es comestible, las esporas tienden a agregarse y el resultado final no es homogéneo. Para tratar de

buscar una solución a esta situación, se llevó a cabo un **segundo ensayo** que consistió en analizar el desarrollo de *D. flagrans* en un medio de cultivo líquido, centrando la atención en dirimir si el hongo crecía en anaerobiosis, y se obtenían cantidades elevadas de esporas. Entre las razones que llevaron a considerar un medio de esta naturaleza conviene destacar la aplicabilidad para distribuir por medio de pulverizadores, preparar premezclas alimentarias, o incluso elaborar pellets nutricionales que vehiculen las esporas.

La preparación del medio líquido empobrecido y posterior siembra con *D. flagrans* confirmó que esta especie se desarrolla en anaerobiosis, da lugar a micelio y finalmente a clamidosporas, delimitándose a este respecto dos fases, una de crecimiento exponencial hasta la cuarta semana, y otra de multiplicación ralentizada (quinta a octava). Además, también se comprobó que aparecía un número de esporas que no parecía guardar relación con el desarrollo de hifas, concluyéndose la participación de otros mecanismos como la denominada *esporogénesis microcíclica*, que tiene como resultado la génesis de esporas directamente desde otras esporas.

En numerosos procedimientos industriales en los que se emplean levaduras, se ha demostrado que los sistemas bifásicos de producción aportan una solución idónea para producir grandes cantidades de organismos (*escalado industrial*). Por ello, se realizó un **tercer ensayo** en el que se combinaron medios de cultivo comestibles que contenían pan, y el medio de cultivo líquido empobrecido. Los recuentos fueron elevados al depositar el medio líquido sobre pan rallado y pan tostado, mejores con el primero. Sin embargo, se identificaron algunos problemas a la hora de obtener los recuentos de esporas, debidos a la composición del pan y a su coloración, que hicieron realmente complicado obtener el número de esporas que contenía cada medio. Otro inconveniente consistió en la facilidad con que tenía lugar la contaminación de los medios por otros microorganismos, sobre todo bacterias, así como diferentes especies de hongos.

Teniendo en cuenta los resultados mencionados, se consideró oportuno desarrollar un **cuarto ensayo** en el que se enriqueció el medio de cultivo líquido con fécula (almidón de maíz), y comparar los resultados con otro medio enriquecido con fécula + pan rallado. En este caso, se

perseguía combinar la utilidad del medio de cultivo líquido con la posibilidad de incrementar el rendimiento al adicionar un alimento que no confiere coloración, y por tanto no dificulta el recuento.

Con ambos medios se obtuvieron recuentos elevados de clamidosporas, pero no se observaron diferencias en función de la presencia de pan rallado, que resultó en una mayor complicación para el recuento de esporas por los motivos ya reseñados en el **tercer ensayo**. En los medios con fécula también se comprobó la producción de esporas mediante *esporogénesis microcíclica*.

En conclusión, en la elección de un medio de cultivo para obtener esporas de *D. flagrans* ha de tenerse en cuenta el rendimiento, coste y vía de administración que se va a emplear para su distribución. La producción de esporas de *D. flagrans* no depende de la composición en macronutrientes de los medios empleados, y aunque se consiguen cantidades elevadas de forma rápida con medios de cultivo sólidos, el coste es más elevado, al contrario de lo que sucede con los medios líquidos.

El conocimiento de la cinética de esporogénesis resulta imprescindible para ajustar el rendimiento en función de los requerimientos. Con la posibilidad de emplear medios sólidos o líquidos, y de suplementarlos con diferentes alimentos, se dispone de procedimientos clave para responder a las necesidades de obtención de esporas y con ello dar respuesta a las situaciones reales en las que se manejan animales de renta y de compañía.

10.2. RESUMO

Nas últimas décadas tiveron lugar cambios substanciais no control de infeccións parasitarias, poñéndose especial énfase na prevención como medida para evitar lesións en animais (e tamén persoas), protexer a eficacia dos antiparasitarios convencionais limitando a súa aplicación aos casos necesarios, e fomentar a sustentabilidade ao diminuír os posibles efectos ecotóxicos que se derivan da utilización de fármacos. Entre as solucións achegadas para eludir certas infeccións parasitarias, expúxose o control biolóxico, entendido como *un método ecolóxico*

desenvolvido para diminuir a poboación parasitaria presente no medio a niveis non prexudiciais, usando antagonistas naturais vivos. Baseándose no descubrimento de certas especies de fungos filamentosos saprófitos que se atopan no chan, e que en presenza dalgúns estadios parasitarios (ooquistes/ quistes, metacercarias, ovos, larvas) exhiben a capacidade de alimentarse deles, deseñáronse algunhas estratexias para avaliar a utilidade potencial dun número reducido de especies. *Duddingtonia flagrans* é a que concitou maior interese desde o punto de vista veterinario, posiblemente pola capacidade nematófaga que desprega mediante a elaboración de *aneis* ou *trampas* no micelio, que serven para capturar as formas inmaturoas de nematodos estronxilados (L2, L3) que se desenvolven no chan.

Un dos inconvenientes que expón a aplicación de fungos filamentosos reside na posibilidade de multiplicar de forma conveniente, e obter estadios suficientes para abordar o control parasitario en situacións reais. A maioría dos programas que inclúen o emprego de *D flagrans* baséanse na administración de esporas, xeralmente formas de resistencia denominadas *clamidosporas*, que se obteñen en placas Petri con medio a base de agar e cereais. Porén, esta metodoloxía non resulta útil nin alcanzable dende un punto de vista económico, o que levou á investigación de diferentes procedementos para conseguir o escalado da produción de esporas, e proporcionar unha solución que achegue esta estratexia ás situacións reais nas que se desenvolve a gandería. Con tal motivo, expúxose un estudo sustentado en catro ensaios, que incluíron a preparación e avaliación de diferentes medios de cultivo. No **primeiro ensaio** preparáronse medios de cultivo sólido a base de xelatina *comestible*, engadíndose diferentes aditivos (trigo, cenoria e caldo comercial), co obxectivo non só de obter cantidades elevadas de esporas de *D. flagrans*, senón tamén de tentar fomentar a aceptación entre as diferentes especies animais ás que ían destinadas. Deste xeito, comprobouse que tanto o agar bacteriolóxico como o *comestible* posibilitaban a obtención de cantidades notables de clamidosporas, e procedeuse a engadir diferentes alimentos ao agar comestible. Con cenoria, observouse un crecemento superior ao medio de cultivo con trigo, pero o desenvolvemento non resultou proporcional á concentración de cenoria. Ao engadir caldo de pito as hifas creceron

rapidamente, con independencia da súa concentración. Estes resultados sinalan a idoneidade do medio a base de agar comestible – trigo – caldo para o desenvolvemento de programas de control mediante esporas de *D. flagrans*.

A administración de esporas de fungos realízase, con elevada frecuencia por vía oral, o que conleva o raspado de placas con agar e disolución en auga; o produto pódese proporcionar directamente se as especies animais permíteno, ou mesturado con alimento (concentrado, gran...). Isto supón algún que outro inconveniente, posto que o agar que se adoita utilizar non é comestible, as esporas tenden a agregarse e o resultado final non é homoxéneo. Para tratar de buscar unha solución a esta situación, levou a cabo un **segundo ensaio** que consistiu en analizar o desenvolvemento de *D. flagrans* nun medio de cultivo líquido, centrando a atención en dirimir se o fungo crecía en anaerobiose, e obtíñanse cantidades elevadas de esporas. Entre as razóns que levaron a considerar un medio desta natureza convén destacar a aplicabilidade para distribuír por medio de pulverizadores, preparar premisturas alimentarias, ou mesmo elaborar pellets nutricionais que vehiculen as esporas.

A preparación do medio líquido empobrecido COPFr e posterior sementa con *D. flagrans* confirmou que esta especie desenvólvese en anaerobiose, dá lugar a micelio e finalmente a clamidosporas, delimitándose a este respecto dúas fases, unha de crecemento exponencial ata a cuarta semana, e outra de multiplicación retardada (quinta a oitava). Así mesmo, demostrouse unha relación inversamente proporcional entre o volume de escalado e a concentración final de esporas, de forma que ao escalar a produción de esporas a volumes próximos a 1 L de medio, os rendementos máis frecuentemente observados sitúanse ao redor de 3000 esporas/ mL, por 4000-5000 se leva a 500 mL, e ≥ 5000 clamidosporas/ mL cando se fai en 100 mL. Un achado inesperado foi a aparición dun número de esporas que non parecía gardar relación co desenvolvemento de hifas, concluíndose a participación doutros mecanismos como a denominada *esporoxénesis microcíclica*, que ten como resultado a xénese de esporas directamente desde outras esporas.

En numerosos procedimientos industriais nos que se empregan fermentos, demostrouse que os sistemas bifásicos de produción achegan unha solución idónea para producir grandes cantidades de organismos (*escalado industrial*). Por iso, realizouse un **terceiro ensaio** no que se combinaron medios de cultivo comestibles que contiñan pan, e o medio de cultivo líquido empobrecido COPFr. Os recontos foron elevados ao depositar o medio líquido sobre pan relado e pan tostado, mellores co primeiro. Con todo, identificáronse algúns problemas á hora de obter os recontos de esporas, debidos á composición do pan e ao súa coloración, que fixeron realmente complicado obter o número de esporas que contiña cada medio. Outro inconveniente consistiu na facilidade con que tiña lugar a contaminación dos medios por outros microorganismos, sobre todo bacterias, así como diferentes especies de fungos.

Tendo presente os resultados mencionados, considerouse oportuno desenvolver un **cuarto ensaio** no que se enriqueceu o medio de cultivo líquido con fécula (amidón de millo), e comparar os resultados con outro medio enriquecido con fécula + pan relado. Neste caso, perseguíase combinar a utilidade do medio de cultivo líquido coa posibilidade de incrementar o rendemento ao engadir un alimento que non confire coloración, e por tanto non dificulta o reconto.

Con ambos os medios obtivéronse elevados recontos de clamidosporas, pero non se observaron diferenzas en función da presenza de pan relado, que resultou nunha maior complicación para o reconto de esporas polos motivos xa apuntados no **terceiro ensaio**. Nos medios con fécula tamén se comprobou a produción de esporas mediante *esporoxénesis microcíclica*.

Dos resultados obtidos no presente estudo, cabe destacar que a produción de esporas de *D. flagrans* non depende da composición en macronutrientes dos medios empregados. Aínda que os medios de cultivo sólidos proporcionan cantidades elevadas de esporas de *D. flagrans* de forma rápida, o custo é máis elevado, ao contrario do que ten lugar cos medios líquidos. A relación inversamente proporcional entre a concentración de esporas e o volume de escalado resulta moi interesante para deseñar estratexias de prevención de infeccións parasitarias en animais, porque permite axustar o rendemento ás doses

que estes reciben e á vez que se tarda en conseguir o número suficiente de esporas. Por último, na elección dun medio de cultivo para obter esporas de *D. flagrans* hai que ter presente o rendemento, custo e vía de administración considerada.

10.3. SUMMARY

In recent decades, substantial changes have taken place in relation to the control of parasitic infections, with special emphasis on prevention as a measure to avoid injury to animals (and also people), protect the efficacy of conventional antiparasitics, limiting their application to necessary cases, and to promote sustainability by reducing the possible ecotoxic effects derived from the use of drugs.

Among the solutions provided to avoid certain parasitic infections, biological control has been proposed, understood as *an ecological method developed to reduce the parasite population present in the environment to non-harmful levels, using live natural antagonists*. Based on the discovery of certain species of saprophytic filamentous fungi that are found in the soil, and that in the presence of some parasitic stages (oocysts / cysts, metacercariae, eggs, larvae) exhibit the ability to feed on them, some strategies were designed to evaluate the potential usefulness of a small number of species. *Duddingtonia flagrans* is the one that has attracted the most interest from the veterinary point of view, possibly due to the nematophagous capacity that it displays by making *rings* or *traps* in the mycelium, which serve to capture the immature forms of strongylated nematodes (L2, L3) that develop in the soil.

One of the drawbacks posed by the application of filamentous fungi resides in the possibility of conveniently multiplying, and obtaining sufficient stages to address parasitic control in real situations. Most of the programs that include the use of *D. flagrans* are based on the administration of spores, generally forms of resistance called chlamydospores, which are obtained in Petri dishes with an agar-based medium and cereals. However, this methodology is neither useful nor affordable from an economic point of view, which has led to the investigation of different procedures to achieve the scaling up of spore

production, and provide a solution that brings this strategy closer to real farm situations. For this reason, a study based on four trials was proposed, which included the preparation and evaluation of different culture media. In the **first trial**, solid culture media based on edible gelatin were prepared, adding different additives (wheat, carrot and commercial stock), in order not only to obtain high amounts of *D. flagrans* spores, but also to try to promote the acceptance among the different animal species for which they were intended. Thus, it was found that both bacteriological and *edible* agar made it possible to obtain significant amounts of chlamydo spores, and different foods were added to the edible agar. With carrot, a growth higher than the observed in the wheat culture medium was observed, but the development was not proportional to the carrot concentration. By adding chicken stock the hyphae grew rapidly, regardless of their concentration. These results indicate the suitability of the medium based on edible agar - wheat - broth for the development of control programs using *D. flagrans* spores. The administration of fungal spores is carried out, with high frequency, orally, which involves scraping plates with agar and dissolving them in water; the product can be provided directly if the animal species allow it, or mixed with food (concentrate, grain ...). This poses some other inconvenience, since the agar that is usually used is not edible, the spores tend to aggregate and the final result is not homogeneous. With the intention of trying to find a solution to this situation, a **second trial** was carried out, which consisted of analysing the development of *D. flagrans* in a liquid culture medium, focusing on deciding whether the fungus grew in anaerobiosis, and on obtaining elevated quantities of spores. Among the reasons that led to consider a medium of this nature, it is worth highlighting the applicability to distribute by means of sprays, prepare food premixes, or even make nutritional pellets that could carry the spores.

The preparation of the depleted liquid medium COPFr and subsequent seeding with *D. flagrans* confirmed that this species develops in anaerobiosis, gives rise to mycelium and finally to chlamydo spores, observing in this regard two phases, one of exponential growth until the fourth week, and another slowed multiplication (fifth to eighth week). Likewise, an inversely proportional relationship between the scaling

volume and the final concentration of spores was demonstrated, so that when scaling the production of spores to volumes close to 1 L of medium, the most frequently observed yields are around 3000 spores / mL, 4000-5000 if carried to 500 mL, and ≥ 5000 chlamydo spores / mL when done in 100 mL. An unexpected finding was the appearance of a number of spores that did not seem to be related to the development of hyphae, concluding the participation of other mechanisms such as the so-called *microcyclic sporogenesis*, which results in the direct genesis of spores from other spores.

In many industrial processes using yeast, biphasic production systems have been shown to provide an ideal solution for producing large numbers of organisms (*industrial scaling*). Therefore, a **third trial** was conducted in which edible culture media containing bread and the depleted liquid culture medium COPFr were combined. The counts were high when the liquid medium was deposited on breadcrumbs and toast, better with the former. However, some problems were identified in obtaining spore counts, due to the composition of the bread and its coloration, which made it really difficult to count the number of spores that each medium contained. Another drawback was the ease with which contamination of the media by other microorganisms took place, especially by bacteria, as well as by different species of fungi.

Taking into account the aforementioned results, it was considered appropriate to carry out a **fourth trial** in which the liquid culture medium was enriched with starch (corn starch), and to compare the results with another medium enriched with starch + breadcrumbs. In this case, the aim was to combine the usefulness of the liquid culture medium with the possibility of increasing the yield by adding a food that does not confer coloration, and therefore does not make counting difficult.

With both measures, high chlamydo spore counts were obtained, but no differences were observed based on the presence of breadcrumbs, which resulted in a greater complication with regards to the spore count for the reasons already reported in the third trial. In starch media, spore production was also verified by *microcyclic sporogenesis*.

From the results obtained in the present study, it should be noted that the production of *D. flagrans* spores does not depend on the

macronutrient composition of the media used. Although solid culture media provide high amounts of *D. flagrans* spores in a short period of time, the cost is higher, contrary to what happens with liquid media. The inversely proportional relationship between spore concentration and scaling volume is very interesting when designing strategies for the prevention of parasitic infections in animals, because it allows us to adjust the performance to the doses they receive and the time it takes to get enough spore numbers. Finally, in the choice of a culture medium to obtain *D. flagrans* spores, the yield, cost and route of administration considered must be taken into account.







11.- BIBLIOGRAFÍA



11. BIBLIOGRAFÍA

- Almendros M (2016) Control de estrogilidos en caballos en pastoreo. Trabajo de Fin de Grado. Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.
- Anan'ko GG, Teplyakova TV (2011) Factors responsible for transition of the *Duddingtonia flagrans* carnivorous fungus from the saprotrophic to the zootrophic nutrition type. *Microbiology* 80: 188-193. doi: 10.1134/S0026261711020020.
- Araujo JM, Araújo JV, Braga FR, Carvalho RO (2010) In vitro predatory activity of nematophagous fungi and after passing through gastrointestinal tract of equine on infective larvae of *Strongyloides westeri*. *Parasitol. Res.* 107: 103-108. doi: 10.1007/S00436-010-1841.
- Arias M, Lomba C, Dacal V, Vázquez L, Pedreira J, Francisco I, Piñeiro P, Cazapal-Monteiro C, Suárez JL, Díez-Baños P, Morrondo P, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A (2011) Prevalence of mixed trematode infections in an abattoir receiving cattle from northern Portugal and north-west Spain. *Vet Rec.* 168: 408. doi: 10.1136/vr.d85
- Arias M, Suárez J, Cortiñas FJ, Francisco I, Suárez JL, Romasanta A, Cazapal-Monteiro C, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A (2012) Restoration of fungal biota in the soil is essential to prevent infection by endoparasites in grazing animals. En: Paz-Silva A, Arias MS (eds.). *Fungi: Types, Environmental Impact and Role in Disease*. Nova Science Publishers, Hauppauge (NY), USA, pp. 341-358.

- Arias MS, Cazapal-Monteiro CF, Suárez J, Miguélez S, Francisco I, Arroyo FL, Suárez JL, Paz-Silva A, Sánchez-Andrade R, Mendoza de Gives P (2013a) Mixed production of filamentous fungal spores for preventing soil-transmitted helminth zoonoses: a preliminary analysis. *Biomed Res Int* 567876. doi: 10.1155/2013/567876.
- Arias MS, Cazapal-Monteiro, CF, Francisco I, López-Arellano ME, Piñeiro P, Suárez JL, Sánchez-Andrade R, Mendoza de Gives P, Paz-Silva A (2013b) Trematodes enhance the development of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys (Duddingtonia) flagrans*. *Fungal Biol.* 117: 540-544. doi: 10.1016/j.funbio.2013.06.003
- Arroyo Balán, FL (2017) Formulación de esporas de hongos parasiticidas en pellets nutricionales. Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela. <https://minerva.usc.es/xmlui/handle/10347/15820>
- Arroyo FL, Hernández JÁ, Cazapal-Monteiro CF, Pedreira J, Sanchís J, Romasanta Á, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A, Arias MA (2017) Effect of the filamentous fungus *Mucor circinelloides* on the development of eggs of the rumen fluke *Calicophoron daubneyi* (Paramphistomidae). *J Parasitol.* doi: 10.1645/16-76.
- Barry DJ, Williams GA (2011) Microscopic characterisation of filamentous microbes: Towards fully automated morphological quantification through image analysis. *J. Microsc.* 244: 1-2. doi: 10.1111/j.1365-2818.2011.03506.x.
- Barron GL (1979) Observations of predatory fungi. *Can. J. Bot.* 57: 187–193. doi: 10.1139/b79-028.
- Berezow A (2017) Two Fungal Species Cooperate to Synthesize an Antibiotic. American Council on Science and Health. <https://www.acsh.org/news/2017/05/01/two-fungal-species-cooperate-synthesize-antibiotic-11215>.
- Berka RM, Nelson BA, Zaretsky EJ, Yoder WT, Rey MW (2004) Genomics of *Fusarium venenatum*: An Alternative Fungal Host for Making Enzymes. *Appl. Mycol. Biotechnol.* 4: 191-203. doi: 10.1016/S1874-5334(04)80010-8.

- Bilotto F, Fusé LA, Sagües MF, Iglesias LE, Fernández AS, Zegbi S, Guerrero I, Saumell CA (2018) Predatory effect of *Duddingtonia flagrans* on infective larvae of gastro-intestinal parasites under sunny and shaded conditions. *Exp Parasitol.* 193: 27-32. doi: 10.1016/j.exppara.2018.07.016.
- Blair J, Biddle A (2020) Stimulating *Duddingtonia flagrans* chlamyospore production through dehydration. *Parasitol. Res.* 119: 123–128. doi: 10.1007/s00436-019-06499-0.
- Boguś MI, Czygier M, Kddra E, Samborski J (2005) In vitro assessment of the influence of nutrition and temperature on growing rates of five *Duddingtonia flagrans* isolates, their insecticidal properties and ability to impair *Heligmosomoides polygyrus* motility. *Exp Parasitol.* 109: 115-123. doi: 10.1016/j.exppara.2004.12.001.
- Braga FR, Araújo JV, Campos AK, Carvalho RO, Silva AR, Tavela AO, Maciel AS (2007) *In vitro* observation of the action of isolates of the fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* and *Verticillium chlamydosporium* on the eggs of *Ascaris lumbricoides* (Linnaeus, 1758). *Rev Soc Bras Med Trop.* 40: 356-358. doi: 10.1590/s0037-86822007000300024.
- Braga FR, de Araújo JV (2014) Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals. *Appl Microbiol Biotechnol* 98: 71–82. doi: 10.1007/s00253-013-5366-z.
- Braga FR, Ferraz CM, da Silva EN, de Araújo JV (2020) Efficiency of the *Bioverm* (*Duddingtonia flagrans*) fungal formulation to control in vivo and in vitro of *Haemonchus contortus* and *Strongyloides papillosus* in sheep. *Biotech.* 10: 62. doi:10.1007/s13205-019-2042-8.
- Buzatti A, Santos CP, Fernandes MAM, Yoshitani UY, Sprenger LK, Dos Santos CD, Molento MB (2015) *Duddingtonia flagrans* in the control of gastrointestinal nematodes of horses. *Exp Parasitol.* 159: 1–4. doi: 10.1016/j.exppara.2015.07.006.
- Carrillo L (2003) *Microbiología Agrícola*. Universidad Nacional de Salta. ISBN 987-9381-16-5.

- Chandrawathani P, Jamnah O, Waller PJ, Hoglund J, Larsen M, Zahari WM (2002) Nematophagous fungi as a biological control agent for nematode parasites of small ruminants in Malaysia: a special emphasis on *Duddingtonia flagrans*. *Vet Res.* 33: 685-696. doi: 10.1051/vetres:2002049.
- Chávez R, Roa A, Navarrete K, Trebotich J, Espinosa Y, Vaca I (2010) Evaluation of properties of several cheese-ripening fungi for potential biotechnological applications. *Mycoscience* 51: 84-87. doi: 10.1007/s10267-009-0004-4.
- Choe A, von Reuss SH, Kogan D, Gasser RB, Platzer EG, Schroeder FC, Sternberg, PW (2012) Ascarioside Signaling Is Widely Conserved among Nematodes. *Curr. Biol.* 22: 772-780. doi: 10.1016/j.cub.2012.03.024.
- Da Silva ME, de Araújo JV, Braga FR, Borges LA, Soares FE, Lima Wdos S, Guimarães MP (2013) Mycelial mass production of fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* under different culture conditions. *BMC Res Notes* 6: 340. doi: 10.1186/1756-0500-6-340.
- Da Silva ME, Braga FR, de Gives PM, Uriostegui MAM, Reyes M, Soares FEF, de Carvalho LM, Rodrigues FB, Araújo, JV (2015) Efficacy of *Clonostachys rosea* and *Duddingtonia flagrans* in Reducing the *Haemonchus contortus* Infective Larvae. *Biomed Res Int.* 2015;2015:474879. doi: 10.1155/2015/474879
- Dackman C, Nordbring-Hertz B (1992) Conidial traps – a new survival structure of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Mycol. Res.* 96: 194-198. doi: 10.1016/S0953-7562(09)80965-9.
- Dahlberg K, Etten J (1982) Physiology and Biochemistry of Fungal Sporulation. *Ann Rev Phytopathol.* 20: 281-301. doi: 10.1146/annurev.py.20.090182.001433.
- Dyer PS, Paoletti M (2005) Reproduction in *Aspergillus fumigatus*: Sexuality in a supposedly asexual species? *Medical Mycol.* 43 Suppl 1. S7-14. 10.1080/13693780400029015.
- Dynesen J, Nielsen J (2003) Surface Hydrophobicity of *Aspergillus nidulans* Conidiospores and Its Role in Pellet Formation. *Biotechnol Prog.* 19: 1049-52. doi: 10.1021/bp0340032.

- Facchini Rodrigues JV, Braga FR, Campos AK, de Carvalho LM, Araujo JM, Aguiar AR, Ferraz CM, da Silveira WF, Valadão MC, de Oliveira T, de Freitas SG, de Araújo JV (2018) *Duddingtonia flagrans* formulated in rice bran in the control of *Oesophagostomum* spp. intestinal parasite of swine. *Exp Parasitol.* 184: 11-15. doi: 10.1016/j.exppara.2017.11.001
- Fernandes FM, Aguiar AR, Costa-Silva LP, Senna T, de Mello INK, de Oliveira R, de Freitas SG, Silveira WF, Braga FR, Araújo JV (2017) Biological control on gastrointestinal nematodes in cattle with association of nematophagous fungi. *Biocontrol Sci. Technol.* 27: 1145-1453. doi: 10.1080/09583157.2017.1406063.
- Fernández AS, Henningsen E, Larsen M, Nansen P, Grønvold J, Søndergaard J (1999) A new isolate of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* a biological control agent against free-living larvae of horse strongyles. *Equine Vet J* 31: 488-491. doi: 10.1111/j.2042-3306.1999.tb03856.x.
- Fitz-Aranda JA, Mendoza-de-Gives P, Torres-Acosta JF, Liébano-Hernández E, López-Arellano ME, Sandoval-Castro CA, Quiroz-Romero H (2015) *Duddingtonia flagrans* chlamydospores in nutritional pellets: effect of storage time and conditions on the trapping ability against *Haemonchus contortus* larvae. *J Helminthol* 89): 13-18. doi: 10.1017/S0022149X13000539.
- Flores Crespo J, Herrera Rodríguez D, Vázquez Prats V, Martínez Gaytan JC, Mendoza de Gives P (1999) Capacidad nematófaga de dos cepas del hongo *Duddingtonia flagrans* desarrollada en harina de maíz-agar. *Veterinaria México* 30: 199-203.
- Gadd GM (2007) Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycol Res.* 111: 3-49. doi: 10.1016/j.mycres.2006.12.001.
- Gao L, Sun MH, Liu XZ, Che YS (2007) Effects of carbon concentration and carbon-to-nitrogen ratio on growth and sporulation of several biocontrol fungi. *Mycol Res.* 111: 87-92. doi: 10.1016/j.mycres.2006.07.019.

- Gardner K, Wiebe MG, Gillespie AT, Trinci APJ (2000) Production of chlamydospores of the nematode-trapping *Duddingtonia flagrans* in shake flask culture. *Mycol Res.* 104:205–209. doi: 10.1017/S0953756299001124.
- Goyal S, Ramawat KG, Mérillon, J-M (2016) Different Shades of Fungal Metabolites: An Overview. En: Mérillon JM, Ramawat K (eds.). *Fungal Metabolites. Reference Series in Phytochemistry.* Springer, Cham. doi: 10.1007/978-3-319-25001-4_34.
- Greene GH, McGary KL, Rokas A, Slot JC (2014) Ecology drives the distribution of specialized tyrosine metabolism modules in fungi. *Genome Biol Evol.* 6: 121–132. doi: 10.1093/gbe/evt208.
- Grønvold J, Wolstrup J, Nansen P, Henriksen SA, Larsen M, Bresciani J (1993) Biological control of nematode parasites in cattle with nematode-trapping fungi: a survey of Danish studies. *Vet Parasitol.* 48: 311-325. doi: 10.1016/0304-4017(93)90165-J.
- Grønvold J, Nansen P, Henriksen SA, Larsen M, Wolstrup J, Bresciani J, Rawat H, Fribert L (1996) Induction of traps by *Ostertagia ostertagi* larvae, chlamydospore production and growth rate in the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*. *J Helminthol* 70: 291-297. doi: 10.1017/S0022149X00015571.
- Gudikandula K, Vadapally P, Singara-Charya M (2017) Biogenic synthesis of silver nanoparticles from white rot fungi: Their characterization and antibacterial studies. *OpenNano* 2: 64-78. doi: 10.1016/j.onano.2017.07.002.
- Hanlin R (1994) Microcycle conidiation - A review. *Mycoscience* 35: 113-123. doi: 10.1007/BF02268539.
- Healey K, Lawlor C, Knox RM, Chambers M, Lamb J (2018) Field evaluation of *Duddingtonia flagrans* IAH 1297 for reduction of worm burden in grazing animals: tracer studies in sheep. *Vet. Parasitol.* 253: 48–54. doi: 10.1016/j.vetpar.2018.02.010.
- Hebbar PK, Martel MH, Heulin T (1998) Suppression of pre- and postemergence damping-off in corn by *Burkholderia cepacia*. *European Journal of Plant Pathology* 104: 29-36. doi: 10.1023/A:1008625511924.

- Hernández JÁ, Arroyo FL, Suárez J, Cazapal-Monteiro CF, Romasanta Á, López-Arellano ME, Pedreira J, de Carvalho LM, Sánchez-Andrade R, Arias MS, de Gives PM, Paz-Silva A (2016) Feeding horses with industrially manufactured pellets with fungal spores to promote nematode integrated control. *Vet Parasitol* 229: 37-44. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.09.014.
- Hernández JÁ, Cazapal-Monteiro CF, Sanchís J, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A, Arias MS (2018a) Potential Usefulness of Filamentous Fungi to Prevent Zoonotic Soil-Transmitted Helminths. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 18: 690-696. doi: 10.1089/vbz.2018.2296.
- Hernández JÁ, Sánchez-Andrade R, Cazapal-Monteiro CF, Arroyo FL, Sanchís JM, Paz-Silva A, Arias MS (2018b) A combined effort to avoid strongyle infection in horses in an oceanic climate region: rotational grazing and parasitocidal fungi. *Parasit Vectors* 11: 240. doi: 10.1186/s13071-018-2827-3.
- Hernández Malagón JÁ (2019) Formulaciones comerciales para el hongo parasiticida *Mucor circinelloides*. Tesis Doctoral, Universidade de Santiago de Compostela, 153 pp.
- Hsueh YP, Mahanti P, Schroeder FC, Sternberg PW. Nematode-trapping fungi eavesdrop on nematode pheromones (2013) *Curr Biol.* 23: 83–6. doi: 10.1016/j.cub.2012.11.035.
- Hsueh YP, Gronquist MR, Schwarz EM, Nath RD, Lee CH, Gharib S, et al. (2017) Nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora* mimics olfactory cues of sex and food to lure its nematode prey. *Elife* 6: e20023. doi: 10.7554/eLife.20023.
- Hyde KD, Bahkali AH, Moslem MA (2010) Fungi – an unusual source for cosmetics. *Fungal Diversity* 43(1), 1–9. doi: 10.1007/s13225-010-0043-3.
- Jenkins NE, Heviefio G, Langewald J, Cherry AJ, Lomer CJ. (1998). Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol News and Information* 19: 21-31.
- Jerusik R (2010) Fungi and paper manufacture. *Fungal Biol. Rev.* 24: 68-72. doi: 10.1016/j.fbr.2010.04.003.

- Jung B, Soyeon K, Lee J (2014) Microcycle Conidiation in Filamentous Fungi. *Mycobiology* 42: 1-5. doi: 10.5941/MYCO.2014.42.1.1.
- Keller N, Turner G, Bennett JW (2005) Fungal secondary metabolism — from biochemistry to genomics. *Nat Rev Microbiol.* 3: 937–947. doi: 10.1038/nrmicro1286.
- Keyes K, Lee MD, Maurer JJ (2003) Antibiotics: Mode of Action, Mechanisms of Resistance and Transfer. *Microbial Food Safety in Animal Agriculture Current Topics*. Torrence ME, Isaacson RE, (eds.). Iowa State Press, Ames, Iowa, USA. doi: 10.1002/9780470752616.ch6.
- Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA (2008) *Dictionary of the Fungi*. 10th Edition. CABI Europe - UK. ISBN-10, 0851998267.
- Krull R, Wucherpfennig T, Esfandabadi ME, Walisko R, Melzer G, Hempel DC, Kampen I, Kwade A, Wittmann C (2013) Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. *J Biotechnol.* 163: 112-123. doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.06.024.
- Kulshreshtha S, Mathur N, Bhatnagar P (2014) Mushroom as a product and their role in mycoremediation. *AMB Express* 4: 29. doi: 10.1186/s13568-014-0029-8.
- Larsen M, Nansen P, Henriksen SA, Wolstrup J, Grønvold J, Zorn A, Wedø E (1995) Predacious activity of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against cyathostome larvae in faeces after passage through the gastrointestinal tract of horses. *Vet Parasitol.* 60: 315-320. doi: 10.1016/0304-4017(95)00792-8.
- Lin, Xiaorong & Heitman, Joseph. (2005) Chlamydospore Formation during Hyphal Growth in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic cell.* 4: 1746-54. doi: 10.1128/EC.4.10.1746-1754.2005.
- Llerandi-Juárez RD, Mendoza de Gives P (1998) Resistance of chlamydospores of nematophagous fungi to the digestive processes of sheep. *J Helminthol.* 72: 209-213. doi: 10.1017/S0022149X00016345.

- Maciel A, Araújo J, Campos A (2006) Viability of nematophagous fungi *Arthrobotrys robusta*, *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* after sporulation in different culture media. *Rev Bras Parasitol Vet* 15: 182-7. ISBN: 0103-846X.
- Maciel AS, Freitas LG, Campos AK, Lopes EA, Araújo JV (2010) The biological control of *Ancylostoma* spp. dog infective larvae by *Duddingtonia flagrans* in a soil microcosm. *Vet Parasitol.* 173: 262- 270. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.06.027.
- Madeira de Carvalho LM, Bernardo FA, Paz-Silva A (2012) The role of fungi in the control of animal parasites – classification, mode of action and practical applications. En: Paz-Silva A, Arias MS (eds.). *Fungi: Types, Environmental Impact and Role in Disease*. Nova Science Publishers, Hauppauge (NY), USA, pp. 271-308.
- Masangkay RF, Paulitz TC, Hallett SG, Watson AK (2000) Characterization of Sporulation of *Alternaria alternata* f. sp. sphenocleae. *Biocontrol Sci. Technol.* 10: 385-397. doi: 10.1080/09583150050114981.
- McInnes S (2003) A predatory fungus (hyphomycetes: Lecophagus) attacking rotifera and tardigrada in maritime Antarctic lakes. *Polar Biol* 26:79–82. doi: 10.1007/s00300-002-0449-9.
- McKoy JF, Trinci APJ (1987) Sporulation of *Verticillium agaricinum* and *Schizosaccharomyces pombe* in batch and chemostat culture. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 88: 299-307. doi: 10.1016/S0007-1536(87)80002-5.
- Mendoza de Gives P, Zapata Nieto C, Hernández EL, Arellano ME, Rodríguez DH, Garduño RG (2006) Biological control of gastrointestinal parasitic nematodes using *Duddingtonia flagrans* in sheep under natural conditions in Mexico. *Ann NY Acad Sci* 1081: 355-359. doi: 10.1196/annals.1373.050.
- Mendoza-de Gives P, López-Arellano ME, Aguilar-Marcelino L, Olazarán-Jenkins S, Reyes-Guerrero D, Ramírez-Vargas G, Vega Murillo VE (2018) The nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* reduces the gastrointestinal parasitic nematode larvae population in faeces of orally treated calves

- maintained under tropical conditions-Dose/response assessment. *Vet Parasitol.* 263: 66-72. doi: 10.1016/j.vetpar.2018.01.025.
- Neira-Vielma AA, Aguilar CN, Ilyina A, Contreras-Esquivel JC, Carneiro-da-Cunha MG, Michelena-Álvarez G, Martínez-Hernández JL (2018) Optimized production of phytase by solid-state fermentation using triticale as substrate and source of inducer. *Afr. J. Biotechnol.*, 17: 81-90. doi: 10.5897/AJB2017.16267.
- Nieuwenhuis BPS, James TY (2016) The frequency of sex in fungi. *Philos T R Soc B* 371: 20150540. doi: 10.1098/rstb.2015.0540.
- Nordbring-Hertz B (1977) Nematode-induced morphogenesis in the predacious fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Nematologica* 23: 443-451. doi: 10.1163/187529277X00372.
- O'Hanlon SJ, Rieux A, Farrer RA, Rosa GM, Waldman B, Bataille A, Kosch TA, Murray KA, Brankovics B, Fumagalli M, Martin MD, Wales N, Alvarado-Rybak M, Bates KA, Berger L, Böll S, Brookes L, Clare F, Courtois EA, Cunningham AA, Doherty-Bone TM, Ghosh P, Gower DJ, Hintz WE, Höglund J, Jenkinson TS, Lin CF, Laurila A, Loyau A, Martel A, Meurling S, Miaud C, Minting P, Pasmans F, Schmeller DS, Schmidt BR, Shelton JMG, Skerratt LF, Smith F, Soto-Azat C, Spagnoletti M, Tessa G, Toledo LF, Valenzuela-Sánchez A, Verster R, Vörös J, Webb RJ, Wierzbicki C, Wombwell E, Zamudio KR, Aanensen DM, James TY, Gilbert MTP, Weldon C, Bosch J, Balloux F, Garner TWJ, Fisher MC (2018) Recent Asian origin of chytrid fungi causing global amphibian declines. *Science* 360: 621–627. doi: 10.1126/science.aar1965.
- Osharov N, May GS (2001) The molecular mechanisms of conidial germination. *FEMS Microbiol Lett.* 199: 153-160. doi: 10.1016/S0378-1097(01)00178-1.
- Palomero Salinero AM (2015) Análisis de la eficacia de hongos frente a parásitos que afectan a la gallina ponedora. Trabajo de Fin de Grado. Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.

- Paz-Silva A, Francisco I, Valero-Coss RO, Cortiñas FJ, Sánchez JA, Francisco R, Arias M, Suárez JL, López-Arellano ME, Sánchez-Andrade R, Mendoza de Gives P (2011) Ability of the fungus *Duddingtonia flagrans* to adapt to the cyathostomin egg-output by spreading chlamydospores. *Vet Parasitol.* 179: 277-282. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.02.014.
- Pramer D, Stoll NR (1959) Nemin: a morphogenic substance causing trap formation by predaceous fungi. *Science* 129: 966-967. doi: 10.1126/science.129.3354.966.
- Pramer D, Kuyama S (1963) Symposium on biochemical bases of morphogenesis in fungi. II. Nemin and the nematode-trapping fungi. *Bacteriol Rev.* 27: 282-292. ISBN: 0005-3678
- Pucheta M, Flores A, Rodríguez S, De La Torre M (2006) Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia.* 31 (Supl. 12): 856-860. ISBN: 0378-1844.
- Righelato, RC, Trinci APJ, Pirt SJ, Peat A (1968) The influence of maintenance energy and growth rate on the metabolic activity, morphology and conidiation of *Penicillium chrysogenum*. *J. Gen. Microbiol.* 50: 399-412. doi: 10.1099/00221287-50-3-399.
- Sadler M (2003) Nutritional properties of edible fungi. *Nutrition Bulletin* 28: 305-308. doi: 10.1046/j.1467-3010.2003.00354.x.
- Sagüés MF, Purslow P, Fernández S, Fusé L, Iglesias L, Saumell C (2011) Hongos nematófagos utilizados para el control biológico de nematodos gastrointestinales en el ganado y sus formas de administración. *Rev Iberoam Micol.* 28: 143-7. doi: 10.1016/j.riam.2011.06.009.
- Sagüés MF, Fusé LA, Iglesias LE, Moreno FC, Saumell CA (2012) Optimization of production of chlamydospores of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* in solid culture media. *Parasitol Res* 112: 1047-1051. doi: 10.1007/s00436-012-3231-0.
- Sagüés MF, Purslow P, Fernández AS, Iglesias LE, Fusé LA, Saumell CA (2013) The use of soy protein polymers as a release device for nematophagous fungi in the control of parasitic nematodes in ruminants. *J Helminthol.* 88: 1-4. doi: 10.1017/S0022149X13000394.

- Santurio JM, Zanette RA, Da Silva AS, De La Rue ML, Monteiro SG, Alves SH (2009) Improved method for *Duddingtonia flagrans* chlamydospores production for livestock use. *Vet Parasitol* 164: 344–346. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.05.012.
- Saumell CA, Fernández AS, Fusé LA, Rodríguez M, Sagüés MF, Iglesias LE (2015) Nematophagous fungi from decomposing cattle faeces in Argentina. *Rev Iberoam Micol.* 32: 252-256. doi: 10.1016/j.riam.2014.09.003.
- Saumell CA, Fernández AS, Echevarria F, Gonçalves I, Iglesias L, Sagüés MF, Rodríguez E (2016) Lack of negative effects of the biological control agent *Duddingtonia flagrans* on soil nematodes and other nematophagous fungi. *J Helminthol* 90: 706-711. doi: 10.1017/S0022149X1500098X.
- Scholte E-J, Knols BGJ, Samson RA, Takken W (2004) Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. *J Insect Sci.* 4: 19. doi: 10.1673/031.004.1901.
- Siddiqui ZA, Mahmood I (1996) Biological control of plant-parasitic nematodes by fungi: a review. *Bioresour. Technol.* 58: 229-239. doi: 10.1016/S0960-8524(96)00122-8.
- Sigoillot C, Camarero S, Vidal T, Record E, Asther M, Pérez-Boada M, Martínez MJ, Sigoillot JC, Asther M, Colom JF, Martínez AT. (2005) Comparison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps. *J Biotechnol.* 115: 333-343. doi: 10.1016/j.jbiotec.2004.09.006.
- Silveira WF, Braga FR, Tavela AD, Santos LF, Domingues RR, Aguiar AR, Ferraz CM, Carvalho LM, Ayupe TD, Zanuncio JC, Araújo JV (2017) Nematophagous fungi combinations reduce free-living stages of sheep gastrointestinal nematodes in the field. *J. Invertebr. Pathol.* 150: 1-5. doi: 10.1016/j.jip.2017.08.013.
- Su Y-Y, Qi Y-L, Cai L (2012) Induction of sporulation in plant pathogenic fungi. *Mycology* 3: 195-200. doi: 10.1080/21501203.2012.719042.
- Suárez Sánchez-Andrade J (2017) Control biológico de parasitismos gastrointestinales en caballos Tesis Doctoral, Universidade de Santiago de Compostela.

- Trinci APJ (1972) Culture turbidity as a measure of mould growth. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 58: 467-473. doi: 10.1016/S0007-1536(72)80095-0.
- Veiter L, Rajamanickam V, Herwig C (2018) The filamentous fungal pellet—relationship between morphology and productivity. *Appl. Microbiol. Biot.* 102: 2997-3006. doi: 10.1007/s00253-018-8818-7.
- Voinot M, Cazapal-Monteiro C, Hernández JÁ, Palomero AM, Leonardo-Arroyo F, Sanchís J, Pedreira J, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A, Arias MS (2020) Integrating the control of helminths in dairy cattle: Deworming, rotational grazing and nutritional pellets with parasiticide fungi. *Vet Parasitol* 278: 109038. doi:10.1016/j.vetpar.2020.109038.
- Walker GM, White NA (2018) Introduction to Fungal Physiology. En *Fungi: Biology and Applications*, Kavanagh K (ed), John Wiley & Sons, Inc., Third Edition. ISBN 9781119374329.
- Wang C, Zhang S, Hou R, Zhao Z, Zheng Q, Xu Q, Zheng D, Wang G, Liu H, Gao X, Ma JW, Kistler HC, Kang Z, Xu JR (2011) Functional analysis of the kinome of the wheat scab fungus *Fusarium graminearum*. *PLoS Pathog.* 7: e1002460. doi: 10.1371/journal.ppat.1002460.
- Wang X, Li GH, Zou CG, Ji XL, Liu T, Zhao PJ, Liang LM, Xu JP, An ZQ, Zheng X, Qin YK, Tian MQ, Xu YY, Ma YC, Yu ZF, Huang XW, Liu SQ, Niu XM, Yang JK, Huang Y, Zhang KQ (2014) Bacteria can mobilize nematode-trapping fungi to kill nematodes. *Nat Commun.* 5: 5776. doi: 10.1038/ncomms6776.
- Wang Z, Zhang Q, Staley C, Gao H, Ishii S, Wei X, Liu J, Cheng J, Hao M, Sadowsky MJ (2019) Impact of long-term grazing exclusion on soil microbial community composition and nutrient availability. *Biol Fertil Soils* 55: 121–134. doi: 10.1007/s00374-018-01336-5.
- Wisecaver JH, Slot JC, Rokas A (2014) The evolution of fungal metabolic pathways. *PLoS Genet.* 10: e1004816. doi: 10.1371/journal.pgen.1004816.
- Wulandari N, To-Anun C, Hyde K, Duong L, de Gruyter J, Meffert J, Groenewald J, Crous P (2009) *Phyllosticta citriasiana* sp. nov.,

- the cause of *Citrus* tan spot of *Citrus maxima* in Asia. *Fungal Divers.* 34:23–39.
- Xu L, Li F, Xie H-Y, Liu X-Z (2009) A novel method for promoting conidial production by a nematophagous fungus, *Pochonia chlamydosporia* AS6.8. *World J Microbiol Biotechnol* 25: 1989–1994. doi: 10.1007/s11274-009-0099-y.
- Xue C, Liu T, Chen L, Li W, Kronstad JW, Seyfang A, Heitman J (2010) Role of an expanded inositol transporter repertoire in *Cryptococcus neoformans* sexual reproduction and virulence. *mBio.* 1: e00084-10. doi:10.1128/mBio.00084-10.
- Yang Y, Yang E, An ZQ, Liu XZ (2007) Evolution of nematode-trapping cells of predatory fungi of the Orbiliaceae based on evidence from rRNA-encoding DNA and multiprotein sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 8379–8384. doi: 10.1073/pnas.0702770104.
- Yang E, Xu L, Yang Y, Zhang X, Xiang M, Wang C, An Z, Liu X (2012) Origin and evolution of carnivorism in the Ascomycota (fungi). *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 10960–10965. doi: 10.1073/pnas.1120915109.
- Zarrin M, Rahdar M, Poormohamadi F, Rezaei-Matehkolaei A (2017) In Vitro Nematophagous Activity of Predatory Fungi on Infective Nematodes Larval Stage of Strongyloidea Family. *Open Access Maced J Med Sci* 5: 281-284. doi: 10.3889/oamjms.2017.064.
- Zhang L, Willemsse J, Claessen D, van Wezel GP (2016) SepG coordinates sporulation-specific cell division and nucleoid organization in *Streptomyces coelicolor*. *Open Biol.* 6: 150164. doi: 10.1098/rsob.150164.