

REDUCCIÓN *in vitro* DE LARVAS INFECTANTES DEL PARÁSITO *Haemonchus contortus* (NEMATODA) EN MICROPARCELAS POR *Caloglyphus mycophagus* (ACARI: ACARIDAE)

Iván Morales-Soto¹, Pedro Mendoza-de-Gives², Liliana-Aguilar-Marcelino²✉, Esperanza Nohemí Vázquez-Mota¹, María Eugenia López-Arellano² y Edgar Josué Cuevas-Padilla²

¹Universidad Autónoma “Benito Juárez” de Oaxaca. Avenida Universidad S/N. Col. Cinco Señores, Oaxaca, Oax. C.P. 68120, México.

²Unidad de Helminología, CENID-Parasitología Veterinaria, INIFAP. Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla. No. 8534, Jiutepec, Mor., C.P. 62550, México.

✉ Autor de correspondencia: aguilar.liliana@inifap.gob.mx

RESUMEN. En el presente trabajo se evaluó la reducción *in vitro* de larvas infectantes (L3) del nemátodo parásito *Haemonchus contortus* en micro parcelas por el ácaro *Caloglyphus mycophagus*, se elaboraron micro parcelas utilizando charolas de plástico transparentes en las que se sembraron semillas de pasto sudán (*Sorghum sudanense*). El diseño experimental se conformó por dos grupos de microparcels (n = 10). En el grupo 1 (testigo) se adicionaron 5,000 L3 mientras que en el grupo 2 (tratado) se adicionó la misma cantidad de L3 y 30 ácaros (adultos). Las micro parcelas fueron mantenidas durante 15 días dentro del laboratorio bajo condiciones controladas de humedad y temperatura. El contenido total de cada grupo fue transferido a la técnica del embudo de Baermann para la recuperación de L3. Los resultados fueron considerados obteniendo los promedios de larvas recuperadas por cada grupo para su comparación. Se obtuvo una tasa de reducción del promedio de larvas recuperadas por grupo. Los datos fueron transformados a $\sqrt{x + 0.5}$ y se realizó la prueba de “t” de student (programa SAS). Se observó una reducción del 62.07 % ($P < 0.05$). Los resultados muestran evidencia de que *C. mycophagus* ayuda a reducir la contaminación del pasto con L3 del nematodo parásito de ovinos *H. contortus*.

Palabras clave: Ácaros nematófagos, control biológico, depredación, sustentabilidad.

Reduction *in vitro* of infective larvae of parasite *Haemonchus contortus* (Nematoda) in micro-plots by *Caloglyphus mycophagus* (Acari: Acaridae)

ABSTRACT. In this study we evaluated the *in vitro* reduction percentage of *Haemonchus contortus* L3, a sheep gastrointestinal parasitic nematode, by using the mite *Caloglyphus mycophagus* in micro-plots. Micro-plots were plastic trays with Sudan grass (*Sorghum sudanense*) seed were sed. Two groups of micro-plots were conformed (n= 10). Group 1 (control) with five thousand *H. contortus* (L3) were deposited per tray. Group 2 same amount of *H. contortus* infective larvae and 30 adult mites added per tray. Micro-plots were maintained along 15 days under lab conditions, controlled humidity and temperature. At the end of period, the total content of each micro-plot was transferred to the Baermann funnel technique to recovery the total of larvae. Results were considered obtaining the means of the total of recovery larvae per group for comparison. A reduction rate of the mean of recovered larvae per group expressed as percentages was obtained. Data were $\sqrt{x + 0.5}$ square root transformed and “t” student test was performed (SAS program). A 62.07 % reduction of larvae was recorded ($P < 0.05$). Results shown evidence that *C. mycophagus* reduced *H. contortus* (L3) population in the grass.

Keywords: Nematophagous mites, biological control, predation, sustainability.

INTRODUCCIÓN

Actualmente la ovinocultura se ve afectada por las parasitosis, principalmente por nematodos gastrointestinales (NGI) (Angulo-Cubillán, 2007). El nematodo hematófago *Haemonchus contortus* presenta la mayor prevalencia a nivel mundial y nacional con un 37 % en ovinos (Orihuela y Vázquez-Prats, 2009; González-Garduño *et al.*, 2011). Estas parasitosis se ve reflejada

en los ovinos en una baja de peso considerable, mala absorción alimenticia, anorexia y en algunos casos la muerte de los corderos jóvenes (Liéban-Hernández *et al.*, 2011). El método de control de la hemoncosis ha sido principalmente a través del uso de antihelmínticos (AH) como las lactonas macrocíclicas, benzimidazoles e imidazotiazoles; sin embargo, el uso de estos AH ha generado el fenómeno de la resistencia antihelmíntica, además de afectar a organismos benéficos como los escarabajos estercoleros (Torres-Acosta *et al.*, 2012). Dentro del control biológico se encuentran los antagonistas naturales como: los hongos nematófagos, bacterias, virus, protozoarios, tardígrados, nematodos depredadores de otros nematodos y ácaros nematófagos (Aguilar-Marcelino *et al.*, 2015). El ácaro nematófago *Caloglyphus mycophagus* (Méglin, 1874) (= *Sancassania mycophaga* Méglin, 1874) es cosmopolita, tiene un ciclo de vida corto de 9 a 15 días y estudios realizados por Dayan *et al.*, 2015 han demostrado su capacidad depredadora *in vitro* contra nematodos parásitos de animales. En el presente trabajo se evaluó la reducción *in vitro* de larvas infectantes del nematodo parásito *H. contortus* en microparcels por el ácaro *C. mycophagus*.

MATERIALES Y MÉTODO

El presente estudio se llevó a cabo en la Unidad de Helminología del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) ubicado en Jiutepec, Morelos, México.

Material biológico

***Haemonchus contortus*.** La obtención de larvas infectantes (L3) de *H. contortus* se realizó a través de la administración de 350 L3 en un ovino donador por vía oral y fue mantenido bajo condiciones controladas de alojamiento y alimentación *ad libitum* en las instalaciones del CENID-PARASITOLOGÍA VETERINARIA, INIFAP. Las muestras se procesaron para la obtención de L3 en cultivos a partir de heces positivas, siguiendo la metodología citada por Liéban *et al.* (2011). Después de seis días de incubación se obtuvieron las L3, mediante la técnica del embudo de Baermann por 12 h.

***Panagrellus redivivus*.** Se empleó una cepa del nematodo de vida libre *P. redivivus*, proporcionada por el Dr. Roberto de Lara de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM, Campus Xochimilco, México). Los nematodos fueron cultivados en recipientes de plástico empleando hojuelas de avena comercial y agua como sustrato. Las hojuelas de avena y el agua se mezclaron y se esterilizaron en un horno de microondas por cinco minutos (De Lara *et al.*, 2007). Algunos nematodos fueron transferidos al sustrato frío. Los recipientes fueron cubiertos con una tapa de aluminio con una ventana de malla de tela fina para permitir la oxigenación y evitar la entrada de insectos. Los cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente (28 ± 2 °C) (De Lara *et al.*, 2007). Después de una semana la población de nematodos se incrementó de manera considerable.

Ácaro, *Caloglyphus mycophagus*. Los ácaros fueron aislados en el año 2013 a partir de muestras de hojarasca y suelo provenientes del poblado de San Juan Tlacotenco, Morelos, México. Para el ensayo, los ácaros fueron transferidos a placas de Petri con medio agua-agar al 5 %, posteriormente se adicionó un número indeterminado de especímenes de vida libre de nematodos como fuente principal de alimento para facilitar su reproducción e incrementar la población. Se realizaron pases periódicos de ácaros (cada cinco días) a cajas con agar estéril con la finalidad de obtener una colonia pura de ácaros. Los cultivos de ácaros fueron mantenidos a temperatura ambiente (28 ± 2) (Fig. 1).

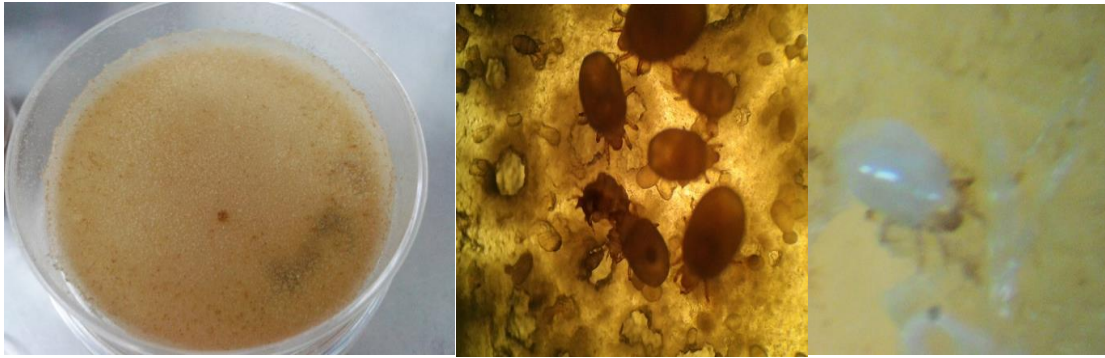


Figura 1. Fotografías mostrando el cultivo *in vitro* del ácaro *Caloglyphus mycophagus* con el nematodo de vida libre *Panagrellus redivivus*.

Microparcels. Se elaboraron 20 microparcels utilizando charolas de plástico transparentes en las que se sembraron semillas de pasto de Sudán (*Sorghum sudanense*). Inicialmente se pesaron 220 g de suelo estéril y se depositó en las charolas de plástico, posteriormente se colocaron cinco gramos de semillas de pasto esparciéndolas de manera uniforme sobre el suelo. Las microparcels se regaron diariamente hasta que quedaran completamente húmedas y se dejaron por un periodo de 20 días, al término de este tiempo se realizó una poda del pasto y al día 21 se inició con el experimento.

Diseño experimental. Se formaron dos grupos con diez repeticiones cada uno ($n=10$), el primer grupo fungió como el testigo que contenía 5,000 larvas (L3) de *H. contortus* y el segundo grupo tratado donde se depositaron 5,000 larvas (L3) de *H. contortus* y 30 ácaros adultos de sexo indistinto de *C. mycophagus* a las microparcels utilizando agujas entomológicas (Fig. 2). La confrontación se llevó a cabo durante 15 días; las microparcels se regaron cada tercer día con un atomizador conteniendo agua corriente. Se tomaron diariamente datos de la temperatura ambiente, utilizando un equipo “HOBO data logger-temp/HR”. La recuperación de larvas L3 a partir de las microparcels se realizó empleando la técnica de Baermann como se muestra en la figura 2.



Figura 2. Fotografía mostrando la aplicación de larvas L₃ de *H. contortus* y el ácaro *Caloglyphus micophagus* en microparcels. Finalmente se muestra el proceso de la técnica de Baermann para la recuperación de nematodos.

La cuantificación de los nematodos se realizó tomando diez alícuotas de 5 μL de volumen cada una y se colocaron en un portaobjetos de vidrio para observarse en un microscopio óptico (10 X) y para realizar la lectura. El porcentaje de reducción de la población de nematodos por la acción de *C. mycophagus* fue estimado utilizando la siguiente fórmula (García-Ortiz *et al.*, 2015):

$$\% \text{ Reducción de nematodos} = \frac{\bar{x}_{\text{testigo}} - \bar{x}_{\text{tratado}}}{\bar{x}_{\text{testigo}}} \times 100$$

Dónde:

Grupo testigo = Media de grupo control de nematodos recuperados;

Grupo tratado = Media del grupo tratado de nematodos recuperados;

Análisis estadístico. Los datos fueron analizados mediante una prueba de “t” de student considerando los promedios de nematodos recuperados en cada serie como la variable dependiente. Para homogeneizar las varianzas, los datos se transformaron logarítmicamente utilizando la fórmula $\sqrt{x} + 0.5$ para comparar las medias de cada tratamiento se utilizó la prueba de Tukey, el programa utilizado fue el Statistical Analysis System (SAS) (SAS Institute, 1998). El análisis consideró un valor de significancia estadística $\alpha = 0.05$ (García-Ortiz *et al.*, 2015).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La reducción de larvas infectantes del nematodo parásito *H. contortus* en microparcelas atribuidas a la actividad depredadora del ácaro *C. mycophagus* fue del 62.07 % bajo condiciones controladas donde la temperatura promedio osciló en un rango de 21.09 °C a 24.73 °C y una humedad relativa del 55 %. Los promedios, desviación estándar, coeficiente de variación y el porcentaje de reducción del grupo testigo y tratado se presentan en el cuadro 1.

Cuadro 1. Promedios, desviación estándar, coeficiente de variación y el porcentaje de reducción *in vitro* de L3 de *Haemonchus contortus* en microparcelas por *Caloglyphus mycophagus*.

Series	Grupos	Promedios/DE	% Reducción de nematodos
1	Testigo (L3 de <i>H. contortus</i>)	2,436±515.51 C.V. = 21.16%	-----
2	Tratado (L3 de <i>H. contortus</i> y <i>C. mycophagus</i>)	924±445.60 C. V. = 48.22%	62.07%

n = 10; DE = Desviación estándar; C. V. = coeficiente de variación; Temperatura = 21.09 -24.73 °C; Humedad relativa = 55 %; $P < 0.05$.

Los nematodos gastrointestinales han sido combatidos durante décadas con diferentes tratamientos químicos (antihelmínticos), el uso frecuente e irracional de estos, así como la aparición de nematodos resistentes han disminuido la efectividad de los antihelmínticos por lo que es necesario y urgente la búsqueda de nuevas estrategias para el control de estos nematodos parásitos (González *et al.*, 2011). Durante las últimas décadas se ha intensificado el estudio de alternativas sostenibles como es el uso de ácaros nematófagos contra nematodos parásitos del ganado (Aguilar-Marcelino *et al.*, 2014).

El ácaro nematófago *C. mycophagus* podría ser considerado como un agente potencial de control biológico de nematodos parásitos de animales y plantas ya que posee diversas características como su distribución cosmopolita, ciclo de vida relativamente corto de nueve a 15 días y una alta tasa de reproducción *in vitro* ya que su oviposición es de 198 huevos por cada hembra (Hernández-Bacao *et al.*, 2015).

Los datos de la reducción *in vitro* del 62.07 % de larvas infectantes del nematodo parásito en ovinos *H. contortus* en microparcelas atribuidas a la actividad depredadora del ácaro *C. mycophagus* difiere del reportado por Aguilar-Marcelino *et al.* (2015) quienes determinaron el porcentaje de reducción larvaria de L3 de *H. contortus* en una evaluación *in vitro* utilizando cajas

de Petri de tipo relojero conteniendo medio agua-agar al 5 % el resultado obtenido fue de 81 %. En otro estudio realizado por Gaspar-Cruz en (2013) notifica un porcentaje de reducción del 66.1 % de larvas infectantes de *H. contortus* por el ácaro *Lasioseius penicilliger* utilizando cajas de Petri conteniendo heces de ovino estéril.

Por otro lado García-Ortiz *et al.* (2015) realizaron un estudio donde evaluaron el porcentaje de depredación del ácaro *L. penicilliger* sobre tres especies de nematodos: *Teladorsagia circumcincta* (L3), *Meloidogyne* sp., y *Caenorhabditis elegans* obteniendo resultados de 95.1, 80.5 y 79.2 % respectivamente.

La información generada del presente estudio nos podría servir a futuro para proponer un modelo de control biológico de la hemoncosis ovina, además de tomar decisiones en el número de ácaros que se requieren en las heces para obtener los resultados alentadores en el control de larvas infectantes de nematodos en las heces y en el pasto.

CONCLUSIÓN

El ácaro *C. mycophagus* puede desempeñar una función importante en el control parasitario, ya que posee un alto potencial depredador sobre la fase infectante L3 del parásito *H. contortus* en microparcels.

Agradecimientos

Los autores de la presente investigación agradecen al Dr. Sergio Ramírez Rojas del CEZACA-ZACATEPEC, INIFAP por la asesoría y préstamo del equipo Dataloger para la medición de la temperatura y humedad relativa.

Literatura Citada

- Aguilar-Marcelino, L., Quintero-Martínez, M. T., Mendoza-de-Gives, P., Bautista-Garfias, C. R., López-Arellano, M. E. y D. E. Reyes-Guerrero. 2015. Hábitos de alimentación de *Sancassania mycophaga* (= *Caloglyphus mycophagus*) (Acari: Acaridae) sobre los nematodos *Haemonchus contortus* (L3) y *Panagrellus redivivus*. *Entomología mexicana* 1: 200–205.
- Aguilar-Marcelino, L., Quintero-Martínez, M. T., Mendoza de-Gives, P., López-Arellano, M. E., Liébano-Hernández, E., Torres-Hernández, G., González-Camacho, J. M and I. V. Cid-del-Prado. 2014. Evaluation of predation of the mite *Lasioseius penicilliger* (Arachnida: Mesostigmata) on *Haemonchus contortus* and bacterial feeding nematodes. *Journal of Helminthology*, 88: 20–23.
- Angulo-Cubillán, F. J., García-Coiradas, L., Concepción de la Fuente, M. C. and M. J. Alunda. 2007. *Haemonchus contortus*-sheep relationship: a review. *Revista científica fcv-luz/* 12(6): 577–587.
- De Lara, R., Castro, T., Castro, J. y G. Castro. 2007. Cultivo del nematodo *Panagrellus redivivus* (Goodey, 1945) en un medio de avena enriquecida con *Espirulina* sp. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 42(1): 29–36.
- García-Ortiz, N., Aguilar-Marcelino, L., Mendoza-de-Gives, P., López-Arellano, M. A., Bautista-Garfias, C. R. y R. González-Garduño. 2015. Actividad depredadora in vitro de *Lasioseius penicilliger* (Arachnida: Mesostigmata) contra tres especies de nemátodos: *Teladorsagia circumcincta*, *Meloidogyne* sp., y *Caenorhabditis elegans*. *Veterinaria México OA*, 2(1): 1–9.
- Gaspar-Cruz, A. 2013. Evaluación de la actividad depredadora in vitro de *Duddingtonia flagrans* (Fungi: Orbiliales); *Butlerius* sp. (Nematoda: Diplogasteridae) y *Lasioseius penicilliger* (Acari: Podocinidae) en contra de larvas infectantes de *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae). Universidad Autónoma “Benito Juárez” de Oaxaca.
- González-Garduño, R., Cordova, P. C., Torres, H. G., Mendoza de Gives, P. y Arece, G. J. 2011. Prevalencia de parásitos gastrointestinales en ovinos sacrificados en un rastro de Tabasco, México. *Veterinaria México*. 42(2): 125–135.

- Hernández-Bacao, D. I., Aguilar-Marcelino, L., Quintero-Martínez, M. T., Reyes-Guerrero, D. E., Mendoza-de-Gives, P. y M. E. López-Arellano. 2015. Aislamiento y caracterización morfológica y molecular del ácaro nematófago *Sancassania mycophaga* (= *Caloglyphus mycophagus*) (Acari: Acaridae). *Entomología mexicana*, 2: 193–199.
- Liébano, E. F., López-Arellano, M. E., Mendoza de Gives, P., Aguilar, L. M. 2011. *Manual de diagnóstico para la identificación de larvas de nematodos gastrointestinales en rumiantes*. Publicación Especial No. 2. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias INIFAP. Morelos, México. 44 p.
- Orihuela, A. y V. Vázquez-Prats. 2009. Estrategias conductuales en la relación parásito-hospedero. *Técnica Pecuaria en México*, 46: 259–285.
- SAS, Institute. 1998. Language guide for personal computer release. 6.03 Edition. *SAS Institute. Cary. North Carolina, USA*. 1028.