

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA**

**ESCUELA DE POSGRADO**



**UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE  
CIENCIAS VETERINARIAS**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS**

**TESIS:**

**EFICACIA DE HONGOS SAPRÓFITOS EN EL CONTROL DE HUEVOS DE**

***Fasciola hepatica* IN VITRO**

Para optar el Grado Académico de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**MENCIÓN: SALUD ANIMAL**

Presentada por:

**Bachiller: GENARO ERNESTO PALOMINO LOZANO**

Asesor:

**Dr. TEÓFILO SEVERINO TORREL PAJARES**

**Cajamarca – Perú**

**2022**

COPYRIGHT @ 2022  
**GENARO ERNESTO PALOMINO LOZANO**  
Todos los derechos reservados

# **UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA**

## **ESCUELA DE POSGRADO**



### **UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

#### **PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS**

#### **TESIS APROBADA:**

#### **EFICACIA DE HONGOS SAPRÓFITOS EN EL CONTROL DE HUEVOS DE *Fasciola hepatica* IN VITRO**

Para optar el Grado Académico de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**MENCIÓN: SALUD ANIMAL**

Presentada por:

**Bachiller: GENARO ERNESTO PALOMINO LOZANO**

#### **JURADO EVALUADOR**

Dr. Teófilo Severino Torrel Pajares  
Asesor

Dr. Abel Melchor García Bazán  
Jurado Evaluador

Dr. Juan de Dios Rojas Moncada  
Jurado Evaluador

Dra. Cecilia Pajares Acosta  
Jurado Evaluador

**Cajamarca – Perú**

**2022**



**Universidad Nacional de Cajamarca**  
LICENCIADA CON RESOLUCIÓN DE CONSEJO DIRECTIVO N° 080-2018-SUNEDU/CD

**Escuela de Posgrado**  
CAJAMARCA - PERU



**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS**

**ACTA DE SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS**

Siendo las 4.p.m horas del día 18 de febrero de dos mil veintidós, reunidos a través de Gmeet [meet.google.com/wwwb-crvx-phx](https://meet.google.com/wwwb-crvx-phx) creado por la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Cajamarca, el Jurado Evaluador presidido por el **Dr. ABEL MELCHOR GARCÍA BAZÁN**, **Dr. JUAN DE DIOS ROJAS MONCADA**, **Dra. CECILIA PAJARES ACOSTA**, y en calidad de Asesor el **Dr. TEÓFILO SEVERINO TORREL PAJARES**. Actuando de conformidad con el Reglamento Interno de la Escuela de Posgrado y la Directiva para la Sustentación de Proyectos de Tesis, Seminarios de Tesis, Sustentación de Tesis y Actualización de Marco Teórico de los Programas de Maestría y Doctorado, se dio inicio a la Sustentación de la Tesis titulada: **EFICACIA DE HONGOS SAPRÓFITOS EN EL CONTROL DE HUEVOS DE *Fasciola hepatica* IN VITRO**; presentada por el **Bach. en Medicina Veterinaria GENARO ERNESTO PALOMINO LOZANO**.

Realizada la exposición de la Tesis y absueltas las preguntas formuladas por el Jurado Evaluador, y luego de la deliberación, se acordó APROBAR con la calificación de DIECIOCHO (18) la mencionada Tesis; en tal virtud, el **Bach. en Medicina Veterinaria GENARO ERNESTO PALOMINO LOZANO**, está apto para recibir en ceremonia especial el Diploma que lo acredita como **MAESTRO EN CIENCIAS**, de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias Veterinarias, con Mención en **SALUD ANIMAL**.

Siendo las 5.30 p.m. horas del mismo día, se dio por concluido el acto.

.....  
**Dr. Teófilo Severino Torrel Pajares**  
Asesor

.....  
**Dr. Abel Melchor García Bazán**  
Jurado Evaluador

.....  
**Dr. Juan De Dios Rojas Moncada**  
Jurado Evaluador

.....  
**Dra. Cecilia Pajares Acosta**  
Jurado Evaluador

A:

A Dios, por guiarme e iluminar mi camino todos los días

A mi padre Javier Ulises hasta el cielo, por sus consejos, por inculcarme valores como la honradez, puntualidad, honestidad y responsabilidad, por ser parte de mi inspiración para poder culminar mi tesis

A mi Madre Irma Nelsa, por estar siempre conmigo y apoyarme

A mi esposa Karin Janeth e hijos Sofía De Los Ángeles y Javier Adrian, por estar siempre a mi lado, apoyándome en todo

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Teófilo Severino Torrel Pajares, por su confianza y animarme a realizar mi maestría y por el apoyo en la realización del presente trabajo de investigación

Al Dr. Juan De Dios Rojas Moncada, por su amistad, por sus enseñanzas y compartir sus conocimientos

Al Médico Veterinario Róger Bueno Cabrera, por su apoyo incondicional e impartirme sus conocimientos para la realización de la presente tesis

Al Médico Veterinario Cristian Hobán Vergara por su apoyo en la parte de metodología y laboratorio en la presente tesis

Al Dr. Abel García Bazán, por su amistad, por el apoyo en la culminación del presente trabajo de Investigación

Al Dr. Rodrigo Bonilla (Colombia) por compartir materiales valiosos para la parte de antecedentes de la presente tesis

Al Dr. Adolfo Paz, por su apoyo en brindarme información y artículos científicos

A la Empresa Inversiones Veterinarias (INVETSA) por el apoyo como parte del financiamiento de la presente tesis

Al Sr. Alfredo Valera, por permitir realizar la toma de muestras en su fundo para el aislamiento e identificación de los hongos

Nada tiene tanto poder para ampliar la mente como la capacidad de investigar de forma sistemática y real todo lo que es susceptible de observación en la vida

- Marco Aurelio

## CONTENIDO

Ítem	Página
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
LISTA DE ILUSTRACIONES .....	x
LISTA DE ABREVIACIONES .....	xii
RESUMEN .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
CAPÍTULO I .....	1
INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Objetivos .....	3
CAPÍTULO II .....	4
MARCO TEÓRICO .....	4
2.1. Antecedentes .....	4
2.2. Bases teóricas .....	7
CAPÍTULO III .....	22
DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS .....	22
3.1. Hipótesis alternativa .....	22
3.2. Localización .....	22
3.3. Población .....	23
3.4. Tamaño muestral .....	23
3.5. Unidad de Análisis .....	23
3.6. Análisis estadístico .....	23
3.7. Metodología .....	24
3.8. Materiales .....	34
CAPÍTULO IV .....	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	37
4.1. De los huevos de <i>Fasciola hepatica</i> eclosionados al efecto del <i>Trichoderma spp</i> y <i>Mucor circinelloides</i> .....	37
4.2. De los huevos de <i>Fasciola hepatica</i> no embrionados al efecto de <i>Trichoderma</i> <i>spp</i> y <i>Muccor circinelloides</i> .....	41

4.3. De los huevos de <i>Fasciola hepatica</i> embrionados al efecto de <i>Trichoderma spp</i> y de <i>Muccor circinelloides</i> .....	43
CAPÍTULO V .....	47
CONCLUSIONES .....	47
RECOMENDACIONES .....	48
LISTA DE REFERENCIAS .....	49
ANEXOS .....	56

## LISTA DE ILUSTRACIONES

<b>Tablas</b>	<b>Página</b>
<b>Marco teórico</b>	
1. Porcentaje (%) de reducción de diferentes cantidades de huevos de <i>Calicophoron daubneyi</i> con <i>Mucor circinelloides</i> y <i>Trichoderma spp.</i>   .....	6
<b>Resultados y Discusión</b>	
2. Eficacia del <i>Trichoderma spp</i> y del <i>Mucor circinelloides</i> sobre los huevos de <i>Fasciola hepatica</i> in vitro, realizados a los 7, 14 y 21 días.....	37
3. Recuento de huevos de <i>Fasciola hepatica</i> eclosionados después de tratamiento con los hongos <i>Trichoderma spp</i> y del <i>Mucor circinelloides</i> in vitro.....	40
4. Recuento de huevos no embrionados después del tratamiento .....	42
5. Recuento de huevos embrionados después del tratamiento.....	44
<b>Anexos</b>	
6. Recuento de huevos sin embrionar, embrionados y eclosionados a los 7 días después de tratamiento.....	57
7. Recuento de huevos sin embrionar, embrionados y eclosionados a los 14 días después de tratamiento.....	57
8. Recuento de huevos sin embrionar, embrionados y eclosionados a los 21 días después de tratamiento.....	57
<b>Figuras</b>	
<b>Metodología</b>	
1. Preparación del medio de agar sabouraud para la siembra de ambos hongos .....	25
2. Colocación del agar Sabouraud en 2 frascos de vidrio para la siembra de ambos hongos.....	25
3. Crecimiento de hongos en el agar sabouraud .....	26
4. Crecimiento de <i>Mucor circinelloides</i> y <i>Trichoderma spp</i> .....	26
5. Crecimiento de hongos de <i>Mucor circinelloides</i> en el agar sabouraud .....	27
6. Identificación morfológica del <i>Mucor circinelloides</i> .....	28

7. Identificación de esporas de <i>Mucor circinelloides</i> .....	29
8. Identificación de conidias (izquierda) y crecimiento micelar de <i>Trichoderma spp</i> (derecha) .....	30
9. Esquema de la observación de células en la cámara de Nuebauer .....	31
10. Microtubos eppendorf de 1ml con dilución de huevos de <i>Fasciola hepatica</i> y esporas de hongo.....	33

## Resultados y Discusión

11. Número de huevos de <i>Fasciola hepatica</i> eclosionados después de tratamiento con los hongos de <i>Trichoderma spp</i> y del <i>Muccor circinelloides</i> a los 7, 14 y 21 días .....	41
12. Número de huevos de <i>Fasciola hepatica</i> no embrionados después de tratamiento con los hongos de <i>Trichodema spp</i> y del <i>Muccor circinelloides</i> a los 7, 14 y 21 día .....	42
13. Número de huevos de <i>Fasciola hepatica</i> embrionados eclosionados después de tratamiento con los hongos de <i>Trichodema spp</i> y del <i>Muccor circinelloides</i> a los 7, 14 y 21 días .....	44
14. Huevo con células germinadas y crecimiento de formas fúngicas. (Flechas rojas crecimiento de hongo, Flecha azul células embrionarias) .....	45
15. Huevos sin contenido, flecha roja crecimiento fúngico.....	45
16. Huevo embrionado con crecimiento fúngico a su alrededor (flecha roja).....	45
17. Huevo con crecimiento fúngico, en la parte superior se observa un esporangio ..	46
18. Huevos eclosionados (izquierda) y huevo sin embrionar (derecha) .....	46

## LISTA DE ABREVIACIONES

- HPG: Huevos por gramos de heces
- CB: Control Biológico
- BLC: Bolos de liberación controlada
- PDA: Agar papa dextrosa
- S/A: Sin Actividad
- IC: Intervalo de confianza
- mL: Mililitros
- $\mu$ L: microlitros
- DO: Densidad óptica
- nM: Nanómetro
- mm: Milímetro
- FD: Factor de dilución
- NaCl: Suero fisiológico
- °C: Grados centígrados
- %: Porcentaje

## RESUMEN

En este trabajo se evaluó la eficacia de hongos saprófitos en el control de huevos de *Fasciola hepatica* in vitro, debido a que existe resistencia comprobada a ciertos fasciolicidas y la exigencia de alimentos inocuos para consumo humano como leche y carne libre de residuos, sumado a esto las pérdidas económicas que se generan en la campaña de Cajamarca, es ahí que la industria farmacéutica avanza hacia preparados biológicos en los programas sanitarios de forma táctica con el empleo de hongos saprófitos se viene utilizando como parte de control integral de la *F. hepatica*. El objetivo fue determinar la eficacia de *Mucor circinelloides* y *Trichoderma spp* sobre los huevos de *F. hepatica* in vitro, para lo cual se utilizó huevos de *F. hepatica* procedentes de vesículas biliares de ovinos sacrificados en el Camal Municipal de Cajamarca, del mismo modo la colección de los hongos se llevó a cabo a partir de cortezas de árboles y plantas donde pastan los bovinos en el Fundo el Cortijo, distrito Cajamarca, y el aislamiento se realizó en Agar Papa. Se utilizaron dos tratamientos *M. circinelloides* y *Trichoderma spp* con una concentración de  $10^9$  esporas / mL y un grupo control, la lectura se realizó a los 7, 14 y 21 días y se consideraron de acuerdo a su integridad en huevos no embrionados, huevos embrionados y huevos eclosionados obteniendo una eficacia de  $48,26 \% \pm 5,65$  para *M. circinelloides* y de  $5,22 \% \pm 2,52$  para *Trichoderma spp*. *M. circinelloides* se puede usar como parte del control integral de *F. hepatica*.

**Palabras clave:** *Fasciola hepatica*, control biológico, hongos saprófitos, *Mucor circinelloides*, *Trichoderma spp*.

## ABSTRACT

In this research, the efficacy of saprophytic fungi in the control of *Fasciola hepatica* eggs in vitro was evaluated, due to the fact that there is proven resistance to certain fasciolicides and the demand for safe food for human consumption such as milk and meat free of residues, added to this, the economic losses that are generated in the Cajamarca, it is there that the pharmaceutical industry advances towards biological preparations in health programs in a tactical way with the use of saprophytic fungi, which has been used as part of the integral control of *F. hepatica*. The objective was to determine the efficacy of *Mucor circinelloides* and *Trichoderma spp.* on *F. hepatica* eggs in vitro, for which *F. hepatica* eggs from gallbladders of sheep slaughtered in the Camal Municipal de Cajamarca were used, in the same way the Fungi collection was carried out from the bark of trees and plants where cattle graze in the Fundo el Cortijo, Cajamarca district, and the isolation was carried out in Agar Papa. Two treatments were used *M. circinelloides* and *Trichoderma spp.* with a concentration of  $10^9$  spores / mL and a control group, the reading was made at 7, 14 and 21 days and they were considered according to their integrity in non-embryonated eggs, embryonated eggs and hatched eggs, obtaining an efficiency of  $48.26\% \pm 5.65$  for *M. circinelloides* and  $5.22\% \pm 2.52$  for *Trichoderma spp.* *M. circinelloides* can be used as part of the comprehensive control of *F. hepatica*.

**Keywords:** *Fasciola hepatica*, biological control, saprophytic fungi, *Mucor circinelloides*, *Trichoderma spp.*

## CAPÍTULO I

### INTRODUCCIÓN

La fasciolosis hepática también conocida como distomatosis es una enfermedad parasitaria causada por la presencia y acción de *Fasciola hepatica* ubicada en el parénquima hepático y conductos biliares, afecta a animales de producción, animales silvestres incluyendo al hombre (Carrada-bravo, 2007). Es considerada como un problema sanitario para la actividad ganadera; causando pérdidas económicas por decomisos y eliminación de hígados de 136 mil dólares anuales (Rojas y Palacios, 2009).

En la actualidad el control de la fasciolosis se realiza principalmente con fasciolicidas, sin embargo el uso inadecuado de estos fasciolicidas antihelmínticos ha generado resistencia, y sumado a esto es la gran cantidad de residuos que dejan estos fármacos que pueden ser perjudiciales para los humanos (Sagüés *et al.*, 2011), por eso se busca otros métodos como parte del control integral de las parasitosis, y a estos métodos se incluye al control biológico (CB), definido como “método o mecanismo donde el hombre hace uso de organismos antagonistas de otro organismo para el control de la población de este”, utilizando antagonistas naturales para disminuir las poblaciones parasitarias y que no sean perjudiciales para el hospedador y evitar sus efectos nocivos (Larsen, 1999). Entre los antagonistas naturales frente a trematodos y nematodos se encuentran: hongos ovicidas, hongos nematófagos, nematodos depredadores de otros nematodos, bacterias, ácaros entre otros (Randy y Anwar, 2004).

Los parásitos que infectan a los animales, en su fase externa de su ciclo biológico que son eliminados con las heces y éstos encuentran el medio favorable para que puedan desarrollarse, luego los animales ingieren durante el consumo de alimento (forraje) y agua a las formas infectivas y es ahí donde estos hongos saprófitos tienen efecto sobre los huevos o formas larvarias. Los hongos saprófitos más comunes son *Pochonia*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Trichoderma* y *Verticillium*, que se alimentan de los huevos y formas larvarias, ocupando la superficie de huevos de los parásitos, luego destruyen los embriones al ingresar dentro de ellos, tienen eficacia frente a larvas que no salen de los huevos cuando están en el suelo de trematodos como *F. hepatica* y Paramphistomidos (Silva, 2018).

La exigencia de alimentos inocuos para consumo humano (leche, carne) libre de residuos de antiparasitarios metabolizados por los animales está teniendo mucha importancia (Silva, 2018). Desde el punto de vista comercial, la industria farmacéutica avanza hacia preparados biológicos en los programas sanitarios de forma táctica, es por eso que es muy necesario que el material biológico proceda de los propios ecosistemas para evitar desequilibrios (García, 2011), por tal motivo y debido al problema que genera la fasciolosis en pérdidas económicas y la resistencia dado a la insuficiente eficacia de los antihelmínticos de uso más común en la región de Cajamarca (Rojas *et al.*, 2013) que existe a muchos fármacos en la campiña de Cajamarca, se busca un método como parte del control integral de la *F. hepatica*, y dentro de las nuevas alternativas está el control biológico, este conocimiento generado será de mucha utilidad para profesionales de campo e investigadores, que lo utilizarán como una herramienta para reducir la carga parasitaria en el medio.

## **1.1. Objetivos.**

### **Objetivo general.**

Determinar la eficacia ovicida de *Mucor circinelloides* y *Trichoderma spp* sobre los huevos de *Fasciola hepatica* in vitro.

### **Objetivos específicos.**

Determinar la eficacia ovicida del *Mucor circinelloides* sobre huevos de *Fasciola hepatica* in vitro en una concentración de  $10^9$  esporas.

Determinar la eficacia ovicida de *Trichoderma spp* sobre huevos de *Fasciola hepatica* in vitro en una concentración de  $10^9$  esporas.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Antecedentes.

En otro estudio, en Brazil, Universidad de Federal de Viçosa se emplearon cuatro hongos nematófagos *D. flagrans* (AC001), *Monacrosporium sinense* (SF53) y *P. chlamydosporia* (VC1 y VC4), se evaluaron frente a huevos de *F. hepatica*. “Los huevos se clasificaron de por morfología: efecto tipo 1, efecto lítico sin daño morfológico a las cáscaras de huevo; tipo 2, efecto lítico con cambios morfológicos en cáscaras de huevo y embriones; y tipo 3, efecto lítico con cambios morfológicos en embriones y cáscaras de huevo, con penetración de hifas y colonización interna de huevos”. *P. chlamydosporia* mostró mayor actividad ovicida tanto (VC1) como (VCA) a los 21 días de estudio con un 20,1 % y 21,5 % respectivamente el efecto tipo 3, *D. flagrans* (AC001) y *M. sinense* solo mostraron efecto tipo 1, con 66,5 % y 7,4 % a los 21 días con mayor efecto respectivamente, sin diferencias significativas entre ellos (Braga *et al.*, 2008).

En España, Lugo, en 2 explotaciones de ganado vacuno en pastoreo, localizada en Monforte de Lemos y Guntín. Se recogieron heces directamente del recto de 20 animales por cada explotación, que se analizaron mediante flotación, sedimentación y migración larvaria. se determinó el efecto de la mezcla de *M. circinelloide* y *Arthrobotrys flagrans* en el control biológico de huevos de *C.*

*daubneyi*, se obtuvo un porcentaje de reducción de huevos del trematodo, con un Hpg inicial de < 200 (n=8) se obtuvo una reducción del 86 %, con un Hpg de 200 – 500 (n=7) se obtuvo una reducción de 65 % y con un Hpg de > 500 (n=5) se obtuvo una reducción de 66 % (Arias *et al.*, 2013).

En Brasil, en la Universidad Federal de Viçosa, se realizó un estudio para evaluar el efecto del hongo *Pochonia chlamydosporia* (aislado VC1) enfrentado en huevos de *F. hepatica*, se administró 1 g de sedimento en matriz de aglinato de sodio por 10 kg de peso vivo que contenía 25 % de micelio fúngico del aislado VC1 por animal. Se utilizaron dos grupos de animales, tratados y no tratados como control. Se recogieron muestras de heces de ambos grupos, a las 12, 18, 24, 48, 72 y 96 horas después de la administración de los gránulos. se colocaron 2 g heces en una placa de Petri de 9 cm de diámetro, que contenía un 2 % de agua-agar y 1,000 huevos de *F. hepatica*. Se demostró que el hongo fue eficaz para cazar los huevos en las muestras recuperadas en todos los programas a partir de las 12 h, en este trabajo se obtuvo una eficacia del 67 % (Dias *et al.*, 2013).

En España, la Universidad de Santiago de Compostela, un grupo de investigadores realizaron algunos trabajos para medir la actividad de *M. circinelloides* y *Trichoderma spp.*, frente a huevos *C. daubneyi* en heces de bovinos infectados, y se demostró una reducción notable de huevos de *C. daubneyi* frente a ambos hongos ovicidas como se muestra en la siguiente tabla.

**Tabla 1:** Porcentaje (%) de reducción de diferentes cantidades de huevos de *C. daubneyi* con *M. circinelloides* y *Trichoderma spp.*

<b>Eliminación inicial de huevos de <i>C. daubneyi</i></b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>150</b>	<b>200</b>
<b>% Reducción con <i>M. circinelloides</i></b>	88	89	88	94
<b>% Reducción con <i>Trichoderma spp</i></b>	54	57	62	74

Lo interesante de este trabajo es que dos hongos mostraron una actividad dénsito-dependiente, que significa que desarrollan la capacidad de adaptarse a la carga parasitaria en las heces, es decir a mayor presencia de huevos/larvas mayor es el estímulo para el desarrollo de los hongos (Malagón *et al.*, 2015).

En Colombia, departamentos de Cundinamarca, Antioquia y Meta, Colombia; se determinó la acción ovicida de *M. circinelloides* a una concentración de  $10^7$  esporas, las que tuvieron un efecto notable sobre la viabilidad de los huevos de *Calicophoron daubneyi*, el efecto fue de un 59 % al día 14 de interacción con el hongo, y al día 29 en un 69 % ( $P < 0,05$ ) en relación con el grupo testigo. Estos datos confirman la actividad precoz del hongo sobre los huevos de *C. daubneyi*, que a los 14 días resulta en la alteración irreversible de un porcentaje significativamente superior al observado en el grupo Testigo. En este trabajo se pudo observar la actividad precoz de *M. circinelloides* sobre los huevos de *C. daubneyi*, de forma que a los 14 días ya se han alterado irreversiblemente más de la mitad. Asimismo, se confirma este efecto antagonista a los 29 días del estudio, puesto que el porcentaje de miracidios que se desarrollan se reduce de forma significativa en relación con el grupo Testigo (Bonilla, 2016).

En Irán, provincia de Teherán, en una investigación determinaron la actividad del hongo *Paecilomyces lilacinus* sobre huevos de *F. hepatica*, in vitro. Demostrándose tres efectos: tipo 1 (hifas adheridas a la cáscara de huevos sin alteraciones morfológicas), tipo 2 (alteración morfológica de la cáscara del huevo y el embrión sin penetración de las hifas) y tipo 3 (penetración de las hifas y alteraciones morfológicas en la cáscara del huevo y el embrión). Y se encontró al día 7 efecto de tipo 1, tipo 2 y tipo 3 en un 40,6 %, 30,8 % y 22,2 % respectivamente, a día 14, el efecto tipo 1, tipo 2 y tipo 3 fueron 32,6 %, 35,3 % y 22,3 % respectivamente, y al día 21 los efectos tipo 1, tipo 2 y tipo 3 fueron de 30,0 %, 38,3 % y 24,6 % respectivamente (Najafi *et al.*, 2017).

## **2.2. Bases teóricas.**

### **2.2.1. Fasciolosis.**

Es una enfermedad parasitaria en el parénquima y conductos biliares de los bovinos y otros animales incluyendo el hombre. La forma infectante es la metacercaria (Medina, 2007), es de distribución mundial y es considerada un problema en la salud de los animales causando pérdidas económicas debido a la disminución de la producción, decomiso de vísceras en los centros de beneficio, se presenta en forma crónica, subagudo o agudo (Mehmood *et al.*, 2017).

#### **2.2.1.1. Etiología.**

Enfermedad producida por un trematodo, perteneciente al “Phylum Platyhelminthes, Clase Trematoda, Sub clase Digenea, Familia Fasciolidae, Género *Fasciola*, Especie *hepatica*” (Leguia, 1991).

#### **2.2.1.2. Nombre Común.**

Es conocida vulgarmente como "alicuya", "gusano del hígado", "duela de hígado", "jallo jallo", "ccallutaca", "distoma", "saguaype", "palomilla del hígado", "babosa" y "lenguasa" (Olaechea, 2004).

#### **2.2.1.3. Morfología.**

La *F. hepatica* adulta mide de 18-50 mm x 4-14 mm de ancho, tiene forma plana y foliácea (Quiroz, 1995). Tiene ventosas muy próximas y un proceso cónico en el lado anterior de la boca, tanto su aparato digestivo como reproductivo son ramificados, es hermafrodita, los testículos están en la parte media, el ovario y el útero se encuentran por delante de los testículos (Cordero *et al.*, 1999).

#### **2.2.1.4. Ciclo biológico.**

La *F. hepatica* necesita dos hospedadores para completar su ciclo biológico, un hospedero definitivo (animales domésticos, silvestres y el hombre) y un intermediario, el caracol de la especie *Lymnaea* (Olaechea, 2010). La producción de huevos por cada parásito adulto puede llegar a ser de 20,000 a 50,000 por día

quienes son eliminados a través de las heces al medio ambiente, necesitan una temperatura de 22 °C para que los huevos eclosionen y se divida el embrión para dar lugar al miracidio que libremente nada para introducirse en el huésped intermediario o caracol (Carrada-Bravo, 2007), dentro del caracol se desarrolla en otra fase conocida como cercaria que se moviliza a través de una cola completando su desarrollo entre uno a dos meses (Nyindo y Lukambagire, 2015).

Una vez terminado su desarrollo dentro del huésped intermediario abandona y nada para poder enquistarse en las plantas perdiendo su cola por medio de un sistema enzimático para transformarse en metacercaria que es la forma infectiva (González *et al.*, 2013), después que los animales consumen el forraje con las metacercarias, éstas en el sistema digestivo se desenquistan al entrar en contacto con el jugo gástrico quedando libre la Fasciola joven, luego atraviesa el intestino hacia la cavidad abdominal, seguido del peritoneo y terminar en la cápsula de Glisson y de ahí introducirse en el hígado y migra por el parénquima hepático por cinco a seis semanas y luego se aloja en los conductos biliares (Iturbe y Muñiz, 2014).

El parásito adulto se aloja dentro de los conductos biliares, causando patologías como esclerosis y dilatación, e incluso a veces obstrucción aguda del colédoco y síndrome de obstrucción biliar icterico, esto transcurre aproximadamente 3

meses para llegar a su estado adulto para iniciar con la ovoposición y luego son eliminados nuevamente juntos con las heces al medio ambiente y continuar nuevamente con su ciclo (Carrada-Bravo, 2007; Cañete *et al.*, 2014).

#### **2.2.1.5. Patogenia.**

La enfermedad de forma aguda se presenta alrededor de seis semanas luego del consumo de metacercarias y de la diseminación al hígado, provocando daño en el parénquima pudiendo causar una insuficiencia hepática aguda. En la forma crónica el desarrollo de la enfermedad es lentamente como consecuencia de las fasciolas adulta en los conductos biliares, causando colangitis, obstrucción, destrucción del tejido hepático, fibrosis y anemia, esta última reduce el crecimiento y desarrollo de los animales jóvenes, afecta la conversión de los alimentos, en la necropsia el tejido hepático se vuelve muy friable acompañado de una hepatomegalia (Gálvez *et al.*, 2012).

Los trastornos nutricionales están relacionados con problemas en los conductos biliares de forma crónica en los vacunos por la obstrucción e hiperplasia del hígado (Paucar *et al.*, 2011), cuando es grave la enfermedad, los animales mueren y esto va a depender de la cantidad de fasciolas que lo infectan (González *et al.*, 2013). La gran cantidad de lesiones hallados en los hígados de los vacunos son de forma aguda y crónica ocasionando fibrosis, calcificación y aumento de tamaño de los ductos biliares (Alpízar *et al.*, 2013).

El aumento de la cantidad de fasciolas adultas en los conductos biliares se relaciona con la fibrosis hepática, se agrupa en tres fases; la primera presenta una afectación de la zona portal con daños generadas a partir del parásito, sin generar daño o lesión en el parénquima hepático, en la segunda fase hay daño del parénquima hepático y en la tercera fase se puede hallar una marcada división de los septos que forman el tejido conectivo distribuyéndose en todo el parénquima hepático (Marcos *et al.*, 2007).

#### **2.2.1.6. Diagnóstico.**

Se puede realizar a través de los síntomas clínicos de la enfermedad y los hallazgos en la necropsia, también mediante el uso de técnicas coproparasitoscópicas, pruebas inmunológicas, pruebas moleculares y mediante técnicas de biopatología (Cordero *et al.*, 1999); uno de los métodos más utilizados es la prueba de sedimentación natural a través de recuento de huevos en las heces, los resultados obtenidos serán expresados en forma cuantitativa, se dice cuándo se encuentra entre 100 a 200 hpg (huevos por gramo de heces en vacuno) estaríamos sospechando de una infección patógena, requiriendo de tratamiento específico (Cordero *et al.*, 1999; Kassai, 2002).

#### **2.2.1.7. Tratamiento.**

El tratamiento debe estar dirigido con el fin recuperar la función hepática causado por las formas adultas que se

encuentran en los conductos biliares e inmaduras que están migrando por el parénquima hepático, y reducir la eliminación de huevos y evitar o disminuir la contaminación de los pastos (Cordero *et al.*, 1999). La utilización fármacos como Triclabendazol, Albendazol, Rafoxanide, Nitroxinil y Clorsulon son los más empleados, donde se espera que después de la terapia debería desaparecer los huevos en las heces y así prevenir la infección de los caracoles (Olaechea, 2010).

#### **2.2.1.8. Prevención.**

Los métodos de prevención son más eficaces que los tratamientos con antiparasitarios en aquellos animales con fasciolas, es evitar el contagio a aquellos animales sanos, por eso uno de los métodos principales de prevención es necesario mantener limpias los lugares donde consumen pastos, no tener aguas estancadas y disminuir la cantidad de parásitos que causen la enfermedad y de esa manera se evitará el contagio a aquellos animales más susceptibles (Godoy *et al.*, 2010; Chavez *et al.*, 2012; Flores *et al.*, 2014).

#### **2.2.2. Hongos saprófitos.**

Existen varias formas o procedimientos del control biológico de *F. hepatica* de bovinos al pastoreo, que se fundamenta principalmente en el manejo de los bovinos y los pastos, siendo uno de ellos la rotación de las pasturas, dejando descansar por un tiempo de tal manera se destruyan huevos y larvas, otra forma común que se hace es el arado de los potreros,

otro procedimiento como parte del control biológico, es a través de la utilización de hongos saprófitos, que se alimentan de materia orgánica que se encuentra en el suelo, estos se transforman en depredadores cuando detectan parásitos en estadios de huevos o larva, dentro de las especies más conocidas son “*M. circinelloides*, *Trichoderma spp*, *D. flagrans*, *A. flagrans*, *Monacrosporium spp.*, *P. chlamydosporia*, *Verticillium spp* y *Paecilomyces spp*” (Bonilla, 2016; Silva, 2018).

Una de las ventajas del uso de éstos hongos es su actividad y eficacia sin generar resistencia frente a los parásitos, se han hecho varios estudios para encontrar la forma o medios apropiados que garanticen la viabilidad de los hongos para su administración a los animales, como por ejemplo los bloques nutricionales, bloques energéticos, bolos de liberación controlada, alimentos balanceados, de tal manera que después de ser consumidos, puedan reproducirse y atrapar larvas de nematodos gastrointestinales que son eliminados en las heces del ganado. (Sagüés *et al.*, 2011).

#### **2.2.2.1. Hongos ovicidas.**

Cuando hablamos de hongos ovicidas son aquellos que tienen efecto sobre huevos de nemátodos y trematodos como parte del control biológico, en su mayoría son saprófitos, los estudios realizados se han enfocado en la colonización sobre huevos de nemátodos (García-corredor y Pulido-medellín, 2016).

#### **2.2.2.2. Mecanismo de acción de los hongos ovidas.**

Existen varias formas del mecanismo de acción, una de ellas es a través de la liberación de muchas enzimas hidrolítica como proteasas séricas, quitinasas y colagenasas, digiriendo así la cutícula de la fase larvaria de los parásitos y a través de órganos de captura realizando una fuerza (Paz-Silva *et al.*, 2011).

El mecanismo de acción sobre los huevos de los parásitos lo realizan en cuatro fases: a) Contacto, este contacto lo realizan cuando detectan los huevos, donde se desarrollan hifas a partir de las esporas, algunas de estas hifas laterales realizan modificaciones cortas dando lugar a órganos de fijación denominado apresorio con el que llegan adherirse en la cubierta; b) Adhesión, sólo aquellas hifas que logran adherirse en posición más perpendicular a la cubierta penetran al interior del huevo; c) Penetración, muchas de las hifas que penetraron en el interior de los huevos siguen creciendo, luego el hongo y d) Deliberación, dentro del huevo, el hongo comienza a ramificarse rápidamente y destruye de forma gradual el contenido, incluyendo el embrión en desarrollo. Esta ramificación sucede primero en el espacio entre la cubierta y la superficie del embrión, pero en seguida rodea al embrión mediante redes densas de hifas y finalmente lo destruye (Andrea, 1985).

Existen otros tres mecanismos de acción para expresar su nematofagia: afectando indirectamente a las larvas o embriones

contenidos en los huevos o dañando directamente los huevos mediante procesos de penetración e infección. Se cree que estos procesos ocurren de la siguiente manera: a) contacto inicial entre la hifa y la superficie del huevo; b) formación de un bulbo en el sitio de contacto; c) cambios en la permeabilidad de la cáscara para facilitar la penetración en virtud de acciones enzimáticas que deterioran el complejo proteína-quitina de la cubierta del huevo (Nordbring-Hertz *et al.*, 2006).

### **2.2.2.3. Factores que limitan el control biológico de parásitos en bovinos.**

Se dividen en 3 grupos: eficacia, distribución y aspectos legales. Con respecto a la eficacia existe mucha información sobre trabajos realizados con *Duddingtonia* y *Pochonia*, pero pocos estudios con *Trichoderma* o *Mucor*, e incluso de *Verticillium*, sin embargo, se necesita realizar más estudios sobre eficacia, por otro lado, la distribución de los hongos es un factor que limita su aplicación práctica. Gran parte de los datos acerca de la eficacia parasiticida se han obtenido en estudios *in vitro*; en los ensayos de campo con animales la administración de esporas de los hongos se ha realizado en soluciones acuosas, o en pellets elaborados de forma manual. Recientemente algunos estudios han demostrado la posibilidad de fabricar concentrados comerciales con esporas de hongos, lo que sin duda facilitaría la distribución de los hongos sin añadir un trabajo extra a los

cuidadores de animales. Otra posibilidad pasaría por incluir las esporas en bloques minerales, o en el agua de bebida.

Por último, quizás el último escollo en la actualidad está representado por las trabas legales que impiden el empleo de esporas de hongos en animales de producción, en la mayoría de los países. Es preciso destacar que algunos de los hongos mencionados se han aislado de las heces de animales domésticos y salvajes, e incluso de muestras de pastos donde se mantienen estos animales, lo que corrobora por un lado su inocuidad, y por otro, pone de manifiesto que pueden ser ingeridos de forma natural.(Silva, 2018).

#### **2.2.2.4. Formas de administración de hongos saprofitos.**

Existen varias formas de administración es a través de bloques minerales, donde se añadieron *D. flagrans* y se suplementaron a ovinos. Antes de la administración del bloque mineral fue almacenado a una temperatura de 4 °C por un periodo de 18 semanas y poder evaluar el tiempo de vida de las esporas y determinar una posible germinación por la humedad (Bogús *et al.*, 2005). Las ventajas de clamidosporas de *D. flagrans* en los bloques minerales, que no solo sirve como suplemento nutricional, sino también la disminución costo. Por otro lado el inconveniente sería, que los animales no consumen la misma cantidad del bloque y que es muy importante el almacenamiento

a 4 °C para así evitar la germinación de las clamidosporas y la humedad que pudieran afectar su eficacia (Beynon, 2012).

Estudios demuestran que los Bolos de Liberación Controlada (BLC), es otra forma de administración de los hongos y se pueden utilizar como dispositivos intrarruminales, lo cual demostraron que pueden sobrevivir las presiones de elaboración al ser añadidos durante el proceso de fabricación y permanecieron viables por nueve meses a una temperatura de 4 °C. En años siguientes se podrían usar los BLC si la contaminación de larvas infectivas en el medio ambiente fuera riesgosa, y la administración de esta forma de (BLC) sería efectiva para reducir la cantidad de larvas en los pastos que consumen los animales (Baloyi *et al.*, 2012).

También se suelen utilizar hongos nematófagos, en granos de cereales los cuales tienen un sustrato propicio para el desarrollo y producción de gran cantidad de esporas, en estudios realizados la aplicación 5 g/día de cebada con  $3 \times 10^6$  clamidosporas por cinco días, hubo una disminución en la cantidad de larvas en las heces, siendo la misma que fue sembrada en agar-agua. Esta técnica se puede utilizar en diferentes formas de crianza estabulada de los animales (Ketzi *et al.*, 2006). Otra forma de administración sería en momentos críticos de los animales, como el destete y durante el parto, momento en que los

parásitos eliminan gran cantidad de huevos en las heces (Carvalho *et al.*, 2011).

○ ***Mucor circinelloides*.**

▪ **Características generales.**

Es de distribución mundial, es capaz de crecer en una amplia gama de sustratos como por ejemplo se puede encontrar en el suelo y sobre estiércol donde pastan los animales. Se incluye en el orden Mucorales porque las esporas vegetativas que produce se desarrollan de forma endógena en unas estructuras conocidas como esporangios, y en la familia Mucoraceae porque el esporangio aparece separado del resto del esporangióforo por un septo llamado columela. El género *Mucor*, que da nombre a la familia y al orden, presenta esporangióforos ramificados en forma de racimos o cimas y esporangios globosos. Posee la capacidad de múltiples modos de crecimiento y tiene el potencial de aplicación industrial para la producción de enzimas degradativas y metabolitos primarios. Las capacidades de crecimiento del organismo facilitan su atractivo como caballo de batalla industrial. Sin embargo, las etapas de desarrollo poco conocidas de su ciclo de vida complican su posible aplicación en fermentaciones a gran escala. Al igual que con otros organismos de crecimiento filamentoso, los procesos de crecimiento, ramificación y

diferenciación deben entenderse bien para diseñar procesos de fermentación óptimos. Del mismo modo, también es necesario comprender los procesos de gemación en la forma de levadura del organismo (Lübbehüsen *et al.*, 2003; Alvarez *et al.*, 2009).

*M. circinelloides* presenta dos ciclos de vida. Un ciclo asexual o vegetativo, que permite una rápida dispersión del organismo. El cual comienza con la germinación de una espora vegetativa o esporangiospora, que puede ser multinucleada, estas esporas maduran en el esporangio, situado en el extremo del esporangióforo. Al germinar, las esporas se hinchan y producen uno o varios tubos germinativos, que dan lugar a las hifas que crecen por el ápice y se ramifican abundantemente para formar el micelio. Las hifas jamás se anastomosan y, normalmente, carecen de tabiques transversales, por lo que el micelio es cenocítico. En un momento dado, las hifas que crecen ramificándose sobre el sustrato se hacen aéreas, originando los esporangióforos. Al estudiar el ciclo de vida de *M. circinelloides*, ha sido posible ampliar los conocimientos disponibles sobre el crecimiento de formas particulares y los procesos de transición necesarios para completar el ciclo de vida. Esta información es fundamental para comprender la fisiología del organismo además de brindar información valiosa para aquellos interesados en la

aplicación de *M. circinelloides* en la industria (Lübbehüsen *et al.*, 2003).

- ***Trichoderma spp.***

- **Características generales.**

*Trichoderma spp.*, es un hongo aerobio facultativo y no patógeno de plantas, que se encuentra de manera natural en diferentes suelos agrícolas y pastizales, especialmente en aquellos que contienen materia orgánica como heces y desechos vegetales en descomposición. Su desarrollo es favorecido por la presencia de altas densidades de raíces, las cuales son colonizadas rápidamente (Salazar *et al.*, 2012). Se utilizan para el control de patógenos, dada su versatilidad, adaptabilidad y fácil manipulación. En la acción biocontroladora de *Trichoderma spp.*, se han descrito diferentes mecanismos de acción, entre los principales encontramos la competencia por espacio y nutrientes, mico parasitismo y la antibiosis (Infante *et al.*, 2009).

El género *Trichoderma* en su estado vegetativo presenta micelio con septos simples. Las especies son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucano. Se reproducen asexualmente por conidios. Presentan conidióforos hialinos ramificados, fiálides simples o en grupos, conidios de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro, generalmente ovalados, unicelulares, coloreados (usualmente verdes); de

rápido desarrollo en medios sintéticos. Tiene la capacidad de producir clamidosporas en sustratos naturales que, son unicelulares, pero pueden unirse entre dos o más. Estas estructuras son de vital importancia para la sobrevivencia del género en el suelo bajo condiciones adversas. El organismo crece y se ramifica desarrollando típicas hifas, de 5 a 10  $\mu\text{m}$  de ancho (Harman, 2001).

## CAPÍTULO III

### DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS

#### 3.1. Hipótesis alternativa.

Los hongos saprófitos son eficaces en el control de los huevos de *Fasciola hepatica* in vitro.

#### 3.2. Localización.

El presente estudio se realizó en el distrito de Cajamarca, en el año 2019, perteneciente a la provincia y departamento de Cajamarca, con las siguientes características geográficas y meteorológicas (\*):

Densidad: 43.7 habitantes/Km.

Altitud: 2750 m.s.n.m.

Temperatura máxima promedio: 22.1 °C.

Temperatura media anual: 14.9 °C.

Temperatura mínimo promedio: 8.2 °C.

Precipitación pluvial: 537 mm.

Humedad relativa media anual: 64.5 %.

Humedad mínima promedio: 36.7 %.

Humedad máxima promedio: 87.7 %.

---

(\*) Fuente. Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología (SENAMHI) 2019.

### **3.3. Población.**

La población se conformó con huevos de *F. hepatica* procedentes de vesículas biliares de ovinos sacrificados en el Camal Municipal de Cajamarca.

### **3.4. Tamaño muestral.**

La muestra de estudio estuvo conformada por 2700 huevos de *F. hepatica*, divididos en tres tratamientos de 9 tubos cada uno, conteniendo 100 huevos de *F. hepatica* cada tubo.

### **3.5. Unidad de Análisis.**

Se analizaron huevos de *F. hepatica* procedentes de vesículas biliares de ovinos sacrificados en el Camal Municipal de Cajamarca, que se llevaron al Laboratorio de Parasitología de La Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Cajamarca.

### **3.6. Análisis estadístico**

La eficacia, expresada como en porcentaje, se estimó para cada tratamiento utilizando la siguiente fórmula, citado por Ceballos *et al.*, (2019).

$$\text{Eficacia (\%)} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

Donde:

A = Número de huevos en el control

B = Número de huevos eclosionados después de la inoculación de hongos

Para comparar el número de huevos eclosionados, no embrionados y embrionados, se realizó un factorial de 3 por 3 a la significancia en la interacción se utilizó la prueba de Fisher y Regresión Polinomial, se llevó a cabo utilizando

el software InStat 3.0 (GraphPad Software, CA, EE. UU.). Se consideró que un valor de  $P < 0.05$  era estadísticamente significativo.

### **3.7. Metodología.**

#### **3.7.1. Colección y aislamiento de hongos.**

La colección se llevó a cabo a partir de cortezas de árboles donde pastan los bovinos en el Fundo el Cortijo y de una naranja con presencia de moho, distrito Cajamarca, y el aislamiento se realizó en Agar Papa Dextrosa, según lo descrito por Najafi *et al.*, (2017).

#### **3.7.2. Preparación de medios.**

Esterilización de material a calor seco o en horno (placas Petri, tubos de ensayo y frascos de vidrio) a 170 °C por 1 hora.

#### **3.7.3. Preparación de AGAR Sabouraud.**

Para la preparación del medio se procedió de acuerdo a las indicaciones técnicas del producto, el cual consistió en pesar 6.4 g de medio en 100 mL de agua destilada, seguidamente se llevó a esterilizar en autoclave por 30 minutos.



**Figura 1:** Preparación del medio de agar Sabouraud para la siembra de ambos hongos.

Concluido el proceso se dejó enfriar a temperatura ambiente a un promedio de temperatura de 18 - 25 °C. Finalmente se sirve en las placas esterilizadas 20 mL con un grosor de 4 mm y frascos de vidrio de 500ml en posición horizontal hasta solidificarse, luego se almacenó en forma invertida para evitar el ingreso del agua al medio, producto de la evaporación o la contaminación de la misma.



**Figura 2:** Colocación del agar Sabouraud en 2 frascos de vidrio para la siembra de ambos hongos.

Seguidamente se dejó secar y se colocó a la refrigeradora a 2 °C hasta ser utilizado (con un tiempo no máximo de 1 semana por el envejecimiento del medio).



**Figura 3:** Crecimiento de hogos en el agar sabouraud.

#### 3.7.4. Aislamiento de *M. circinelloides* y *Trichoderma spp.*

Identificar la placa con el código asignado de muestra a trabajar con tinta indeleble. Con la ayuda de un asa de siembra se procedió a tomar una muestra de la naranja con crecimiento de moho y se realizó la siembra dejando una pequeña muestra sobre la superficie de la placa.



**Figura 4:** Crecimiento de *M. circinelloides* (izquierda) y *Trichoderma spp* (derecha).

Del mismo modo se realiza con el moho obtenido de la corteza del árbol. A continuación, se procedió a incubar a 25 °C por 9 días en oscuridad, las placas fueron cubiertas con papel, luego fueron descubiertas y mantenidas sin papel hasta completar los 15 días, de esta manera se asegura la formación de micelio para posteriormente realizar el aislamiento en frascos de vidrio.

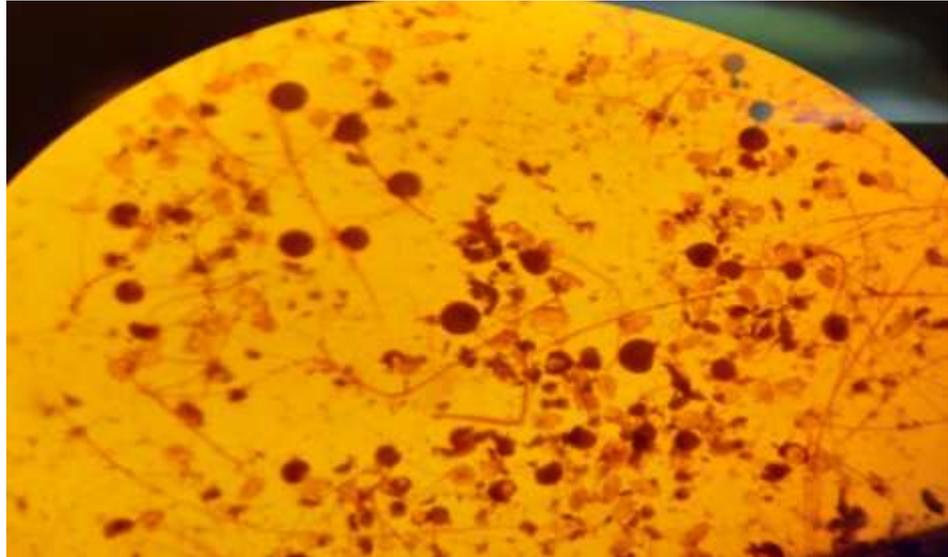
Todo este proceso se realizó con la ayuda de un mechero para evitar la contaminación.

### **3.7.5. Identificación de *M. circinelloides* y *Trichoderma spp.***

A partir de los crecimientos puros en frascos de vidrio se tomaron pequeñas muestras y se colocaron en una lámina portaobjeto, seguidamente se le agregó una gota de agua destilada y sobre esta una lámina cubre objeto.



**Figura 5:** Crecimiento de hongos de *M. circinelloides* en el agar sabouraud.



**Figura 6:** Identificación morfológica del *M. circinelloides*.

Se lleva a continuación al microscopio con el objetivo de 10X y se identifica por su morfología.

El cultivo de *M. circinelloides* fue aislado en una nueva placa Petri conteniendo Agar PDA (Agar papa dextrosa) y al cabo de cinco días se tomó una muestra la cual fue teñida con Azul de lactofenol, a continuación, se observó bajo microscopio óptico para la identificación de su forma y número de conidias, fialides, y conidióforos, para lo cual se utilizó la guía de identificación de Barnett y Hunter (1973), este mismo procedimiento se realice para *Trichoderma spp* (Arias *et al.*, 2013).

- ***Mucor circinelloides*.**

Las colonias que desarrollan rápidamente abarcando la totalidad de la placa Petri, su textura es algodonosa y de color blanco y con el tiempo cambiante a un color marron. Microscopicamente sus características son: hifas aseptadas y gruesas, presencia de esporangióforos, esporangios. No presentan apófisis, estolón y rizoides, las columnelas son hialinas, siendo

visibles si el esporangio se encuentra intacto. Los esporangios son esféricos o redondos (50–300  $\mu\text{m}$  de diámetro) y de color gris a negro, estando llenos de esporas. (Barnett y Hunter, 1973).



**Figura 7:** Identificación de esporas de *M. circinelloides*.

- *Trichoderm spp.*

Esta identificación se basa en las características típicas de este género, las cuales son el rápido crecimiento, la pigmentación de las conidias a verde o blanco y las ramificaciones repetidas, además de conidióforos con ramificaciones escasas y en pares, fiálides rectos y Conidias subglobosas con unas verrugas levemente perceptibles (Barnett y Hunter, 1973)



**Figura 8:** Identificación de conidias (izquierda) y crecimiento micelar de *Trichoderma spp* (derecha).

### **3.7.6. Procedimiento para Cuantificación de esporas y preparación de inóculos.**

Se cuantificaron el número de esporas de cada suspensión midiendo la (DO) densidad óptica (turbidez) y realizando una cuenta directa al espectrofotómetro.

### **3.7.7. Turbidimetría.**

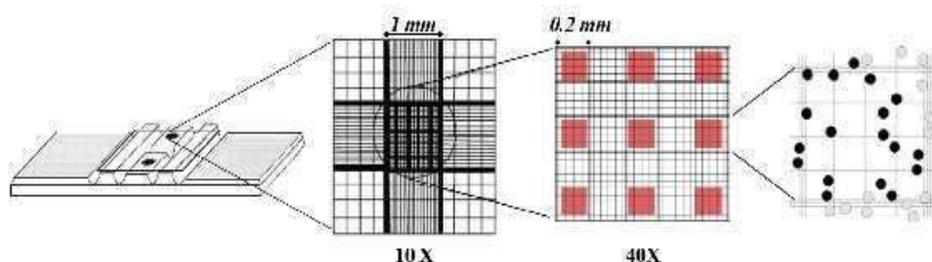
Se procedió a homogenizar la muestra (esporas) en vórtex, seguidamente se procedió a leer la densidad óptica (DO) de la suspensión a 560 nm. Se calibró el equipo con agua destilada. Si la DO es mayor a 0.8, deben hacerse diluciones con agua destilada. La dilución debe considerarse al registrar el dato de la concentración total de células/mL teniendo en cuenta la siguiente fórmula:

$$FD = \text{Volumen total de líquido (agua + muestra)} \times \text{Volumen muestra}$$

$$FD = 500$$

### 3.7.8. Cuenta directa al microscopio.

Se homogenizó la muestra en vórtex, luego se tomó un pequeño volumen de 10  $\mu\text{L}$  con micropipeta y se colocó cuidadosamente en la cámara de Neubauer, debajo del cubreobjetos.



**Figura 9:** Esquema de la observación de células en la cámara de Neubauer.

Limpiamos cuidadosamente los objetivos y el ocular del microscopio con papel seda y realizamos iluminación Kohler.

Colocamos la cámara de Neubauer en la platina del microscopio y ubicamos la cuadrícula con el objetivo 40X. Al observar el cuadro central en el objetivo, éste se encuentra dividido en una cuadrícula de 5X5 cuadros más pequeños.

Las células se cuantificaron en el objetivo de 40X, contando en diagonal las células de 9 cuadros, a su vez divididos en 16 cuadros más pequeños, para ello se realizó una dilución 1:10 (1 en 10). El factor de dilución (FD) debe considerarse para cada dilución realizada:

El número promedio de células en contradas fue de 40.

Para calcular el número de células/mL se utiliza la siguiente ecuación:

$$\text{Células/mL} = \text{Número promedio de células} \times 25 \text{ cuadros} \times 10^4 \times \text{FD}$$

El número promedio de células por cuadro (de 0,2 mm) se multiplica x 25 para obtener el número total de células en un volumen de 0,1 mm<sup>3</sup> (volumen de la cámara = 1 mm por lado x 0,1 mm de profundidad). Este valor debe multiplicarse por 10<sup>4</sup> para obtener el número de células/mL.

$$\text{Células/mL} = 40 \times 25 \times 10^4 \times 500 = 5000000000$$

$$10^9 = 1000000000$$

$$1 \mu\text{L} \text{ ----- } 5000000000$$

$$X \text{ ----- } 1000000000$$

$$X = 0.2 \text{ mL} = 200 \mu\text{L}$$

### 3.7.9. Incubación de huevos e inoculación con hongo

Los huevos de *F. hepatica* se incubaron a 26 °C. En un microtubo de plástico estéril se colocaron 100 huevos de *F. hepatica* y se le agregó un volumen total de agua destilada hasta completar 1.5 mL, a continuación, se agregó el inóculo de esporas de hongos (*M. circinelloides* o *Trichoderma spp.*) a razón de 10<sup>9</sup> esporas y se completó con agua destilada hasta los 2 mL.



**Figura 10:** Microtubos estériles de 2 mL con dilución de huevos de *F. hepatica* y esporas de hongo.

Los microtubos estériles de 2 mL se llevaron a incubar y se realizó lectura a los 7, 14 y 21 días pos-exposición.

Un grupo de microtubos sirvió de Grupos control, a estos se les realizó similar procedimiento sin agregar el inóculo de hongos.

#### **3.7.10. Lectura de enfrentamientos.**

En cada momento de lectura se contaron cien (100) huevos, de los cuales se valoraron los huevos embrionados, huevos no embrionados y huevos eclosionados, también se consideró el crecimiento de la espora en el interior del huevo, además se realizó el recuento en los grupos control donde solo se tenían huevos de *F. hepatica*.

#### **3.7.11. Ensayos para determinar el efecto ovicida de los hongos saprófitos.**

**Control:** 9 tubos con agua destilada estéril conteniendo 100 huevos de *F. hepatica* que se mantuvieron sin tratamiento.

**Tratamiento 01:** 9 tubos con agua destilada estéril conteniendo 100 huevos de *F. hepatica* a los que se añadirán 200 µL de una solución que contenían 10<sup>9</sup> esporas de *M. circinelloides* /mL.

**Tratamiento 02:** 9 tubos con agua destilada estéril conteniendo 100 huevos de *F. hepatica* a los que se añadieron 200 µL de una solución que contenían 10<sup>9</sup> esporas de *Trichoderma spp* /mL.

Durante 21 días, los microtubos estériles se mantuvieron en incubación a una temperatura de 26 °C, con este motivo, se realizó la lectura a los 7, 14 y 21 días. En los días 7, 14, 21, del estudio, se tomaron alícuotas de 50 µL de microtubos estéril de 2 ml de cada grupo, que se dispusieron en un portaobjetos de vidrio y después de colocar encima un cubreobjetos y se observó al microscopio óptico (40X). En cada caso, se visualizaron al menos 100 por repetición de cada grupo, que se clasificaron de acuerdo con su integridad en huevos viables y no viables. En concreto, se consideraron huevos embrionados, sin embrionar y eclosionados (Najafi *et al.*, 2017).

### **3.8. Materiales.**

#### **3.8.1. Materiales biológicos**

- Naranja con crecimiento de moho.
- Corteza de árbol con crecimiento de moho.

#### **3.8.2. Materiales de campo**

- Frascos estériles para recolección de vesícula biliar.

- Guantes.
- Mameluco.
- Botas.
- Lapicero indeleble.
- Cuaderno de apuntes.
- Caja de tecknopor.

### **3.8.3. Materiales de Laboratorio**

- 3 pipetas Pasteur.
- 1 cámara de Neubauer 5 cubreobjetos.
- 1 gradilla.
- 3 tubos de ensaye con tapón de rosca de 25 mL 3 tubos de ensayo de 25 mL.
- 2 pipetas de 10 mL.
- 3 pipetas de 1 mL.
- 2 propipetas de 1 y 10 mL.
- 2 mecheros Fisher.
- 1 espectrofotómetro.
- 2 celdas para espectrofotómetro 1 vórtex.
- 2 microscopios ópticos.
- 1 piseta con alcohol etílico al 70 %.
- 2 autoclaves con base, canastilla y válvula.
- 2 pares de guantes de asbesto.
- Bolsas de plástico para esterilizar.
- 1 piseta con agua destilada.

- Refrigeradora.
- Incubadora.
- Baño maría.
- Autoclave.
- Micropipetas eppendorf x 1 mL.
- Asa de siembra.
- Vasos de precipitación.
- Suero fisiológico (NaCl) al 0.9 %.
- Estufa.
- Agua destilada.
- Algodón.
- Papel toalla.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Tabla 2:** Eficacia ovicida del *Trichoderma spp* y del *M. circinelloides* sobre los huevos de *F. hepatica* in vitro, realizados a los 7, 14 y 21 días.

Días	Eficacia %	
	<i>Trichoderma spp</i> 10 <sup>9</sup> esporas	<i>M. circinelloides</i> 10 <sup>9</sup> esporas
7	S/A	S/A
14	67,77±5,29	40,75±5,56
21	5,22±2,52	48,26±5,65

S/A: SIN ACTIVIDAD, IC: INTERVALO DE CONFIANZA (95 %)

La eficacia ovicida del *Trichoderma spp* sobre los huevos de *F. hepatica* medidos en los 14 y 21 días fueron diferentes, siendo mayor a los 14 días (67,77 %) que a los 21 días (5,22 %); la mayor eficacia obtenida en el día 14 no se debe a un efecto ovicida de *Trichoderma spp*, sino a un retraso en el proceso de eclosión con respecto al grupo control, en los días siguientes la eclosión se incrementa de tal manera que en el día 21 es muy similar a la del grupo control, es por eso que la eficacia solamente alcanza al 5,22 %.

La eficacia ovicida del *M. circinelloides* sobre los huevos de *F. hepatica* medidos a los 14 días fue de 40,75 % y a los 21 días de 48,26 %, el incremento de la eficacia a los 21 días con respecto a los 14 días se incrementa y es altamente

significativa con respecto a la eficacia ovicida de *Trichoderma spp*, esto se debe al efecto ovicida *M. circinelloides*.

Nordbring-Hertz *et al.*, (2006) señalan que los hongos ovicidas dañan directamente los huevos mediante procesos de penetración e infección los cuales ocurren de la siguiente manera: a) contacto inicial entre la hifa y la superficie del huevo; b) formación de un bulbo en el sitio de contacto; c) cambios en la permeabilidad de la cáscara para facilitar la penetración en virtud de acciones enzimáticas que deterioran el complejo proteína-quitina de la cubierta del huevo.

No existen trabajos sobre eficacia de hongos saprófitos como *Trichoderma spp* y *M. circinelloides* sobre huevos de *F. hepatica*, sin embargo Najafi *et al.*, (2017) realizaron un trabajo para determinar el efecto ovicida de *P. lilacinus* sobre huevos de *F. hepatica* in vitro encontrando una eficacia de 24,6 % a los 21 días, la acción del hongo en este tiempo fue la penetración de hifas, alteraciones morfológicas en la cáscara y embrión del huevo, haciendo imposible su eclosión; este resultado es diferente a los obtenidos en nuestro trabajo de 5,22 % de eficacia ovicida para *Trichoderma spp* y 48,26 % para *M. circinelloides*, estas diferencias se deben probablemente a la diferente capacidad patógena de los hongos estudiados.

En un estudio realizado por Bonilla, (2016) en Colombia, se determinó la eficacia ovicida de las esporas de *M. circinelloides*, las que tuvieron un efecto notable sobre la viabilidad de los huevos de *C. daubneyi*, la eficacia fue de 59 % al día 14 y de 69 % al día 29 ( $P < 0,05$ ) en relación con el grupo testigo. Estos datos confirman el efecto precoz del *M. circinelloides* sobre los huevos de *C. daubneyi*, que a los 14 días resulta en la alteración irreversible de un porcentaje significativamente superior al

observado en el grupo testigo; en nuestro trabajo la eficacia ovicida de *M. circinelloides* frente a huevos de *F. hepatica* a los 21 días fue de 48,26 %, porcentaje inferior a los encontrados por Bonilla para *C. daubneyi*, esto se puede deber a que se trata de huevos de trematodos distintos, pero es evidente que existe un efecto ovicida de *M. circinelloides* frente a huevos de *F. hepatica*. Al parecer los huevos *C. daubneyi* son más sensibles al poder ovicida de *M. circinelloides* esto se ve reflejado en la eficacia que encuentra Bonilla al utilizar una concentración de  $10^7$  esporas de *M. circinelloides*, en nuestro trabajo se utilizó una concentración de  $10^9$  esporas de *M. circinelloides* por tratamiento, obteniendo una eficacia menor a la encontrada por Bonilla.

La eficacia ovicida encontrada de 48,26 % de *M. circinelloides* con respecto a la eficacia ovicida del 5,22 % obtenida de *Trichoderma spp* es muy superior y altamente significativa, estos datos concuerdan con los obtenidos por Malagón y colaboradores en el año 2015, estos investigadores encontraron una eficacia del 89 % para *M. circinelloides* y 57 % para *Trichoderma spp* sobre una muestra de 100 huevos de *C. daubneyi* es decir el efecto ovicida es mayor de *M. circinelloides* frente a *Trichoderma spp* tanto en huevos de *C. daubneyi* y huevos de *F. hepatica*.

#### **4.1. De los huevos de *F. hepatica* eclosionados al efecto del *Trichoderma spp* y *M. circinelloides*.**

Para determinar cuál de los dos tratamientos de los hongos fue mejor en el recuento de huevos eclosionados de *F. hepatica* en los diferentes tiempos (7, 14 y 21 días), en la tabla 2, figura 1 y anexos 1, 2, 3 y 4, se observa efecto en la interacción de tiempo por tratamiento ( $p < 0,01$ ), donde a los 7 días no hay presencia de huevos de *F. hepatica* eclosionados, a partir de los 14 días en el

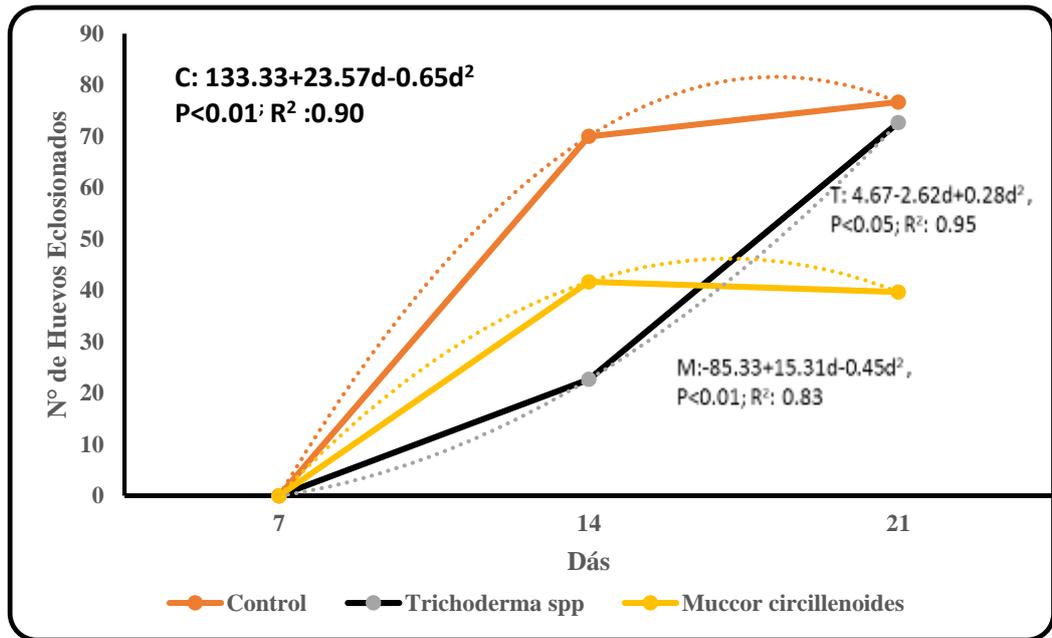
grupo de *Trichoderma spp* existe menor número de huevos de *F. hepatica* eclosionados (22,67), seguido del grupo tratado con *M. circinelloides* (41,67) y por último el grupo control (70,00) siendo diferentes ( $P < 0,05$ ). En cambio, a los 21 días el comportamiento fue diferente observándose que el número de huevos eclosionados de *F. hepatica* del grupo *M. circinelloides* (39,67) es menor comparado con los otros dos grupos ( $p < 0,05$ ). Siendo los coeficientes de determinación elevados en las regresiones, lo que demuestra la confiabilidad del modelo.

El número de huevos eclosionados de *F. hepatica* en el grupo del *M. circinelloides* y control a los 14 y 21 días son similares ( $p > 0,05$ ) no sucediendo lo mismo con el grupo de *Trichoderma spp* que incrementa a los 21 días ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 3:** Recuento de huevos de *F. hepatica* eclosionados después de tratamiento con los hongos *Trichoderma spp* y del *M. circinelloides* in vitro.

Días	Control	<i>Trichoderma spp</i> 10 <sup>9</sup> esporas	<i>M. circinelloides</i> 10 <sup>9</sup> esporas
7	0,00 a	0,00 a	0,00 a
14	70,33 d	22,67 b	41,67 c
21	76,67 d	72,67 d	39,67 c

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$  prueba de Fisher).



**Figura 11:** Número de huevos de *F. hepatica* ecllosionados después de tratamiento con los hongos de *Trichoderma spp* y del *M. circinelloides* a los 7, 14 y 21 días.

#### 4.2. De los huevos de *F. hepatica* no embrionados al efecto de *Trichoderma spp* y *M. circinelloides*.

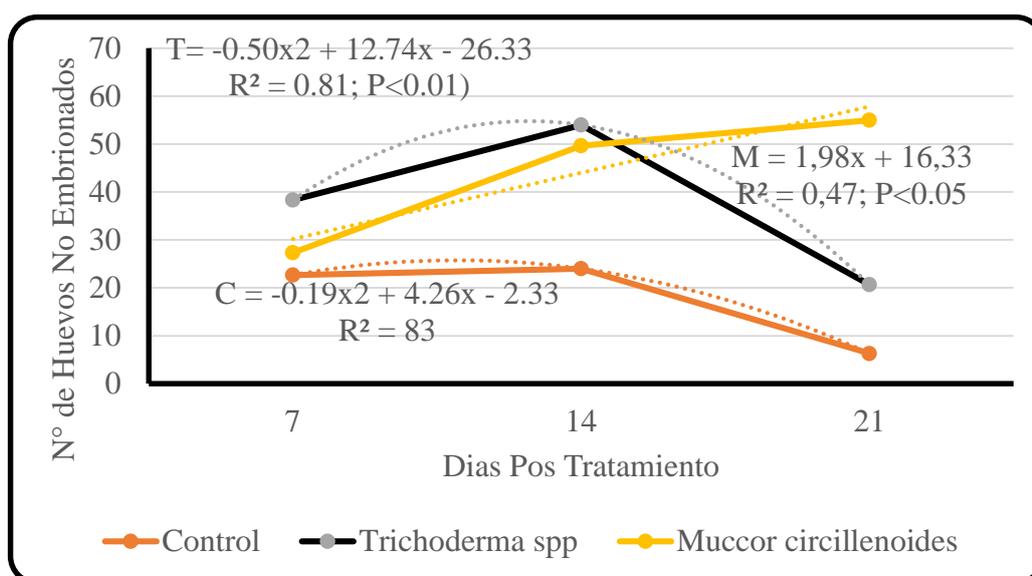
Para determinar cuál de los dos tratamientos de los hongos fue mejor en el recuento de huevos no embrionados de *F. hepatica* en los diferentes tiempos (7, 14 y 21 días), en la tabla 3, figura 2 y anexo 5, 6, 7 y 8, se observa efecto en la interacción de tiempo por tratamiento ( $P < 0,01$ ), donde a los 7 días el promedio del número de huevos no embrionados es estadísticamente similar en los tres grupos ( $P > 0,05$ ), a partir de los 14 días en el grupo control presenta el menor número de huevos no embrionados (24,33) en comparación a los huevos no embrionados de los grupos de *Trichoderma spp* (54,00) y *M. circinelloides* (49,67) siendo estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Los dos últimos son similares entre sí. A los 21 días el comportamiento fue diferente observándose que el grupo del *M. circinelloides* (55,00) mayor comparado con los otros dos grupos ( $p < 0,05$ ).

El número de huevos no embrionados de los grupos control y *Trichoderma spp* se mantienen a los 7 y 14 días, disminuyendo a los 21 días, En el grupo *M. circinelloides* a medida que se incrementa el tiempo o los días el número de huevos no embrionados se va incrementando.

**Tabla 4:** Recuento de huevos no embrionados después del tratamiento.

Días	Control	<i>Trichoderma spp</i> 10 <sup>9</sup> esporas	<i>M. circinelloides</i> 10 <sup>9</sup> esporas
7	22,67 cde	38,33 bc	27,33 cd
14	24,00 cd	54,00 ab	49,67 ab
21	6,33 e	20,67 de	55,00 a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$  prueba de Fisher).



**Figura 12:** Número de huevos de *F. hepatica* no embrionados después de tratamiento con los hongos de *Trichoderma spp* y del *M. circinelloides* a los 7, 14 y 21 días.

#### 4.3. De los huevos de *F. hepatica* embrionados al efecto de *Trichoderma spp* y de *M. circinelloides*.

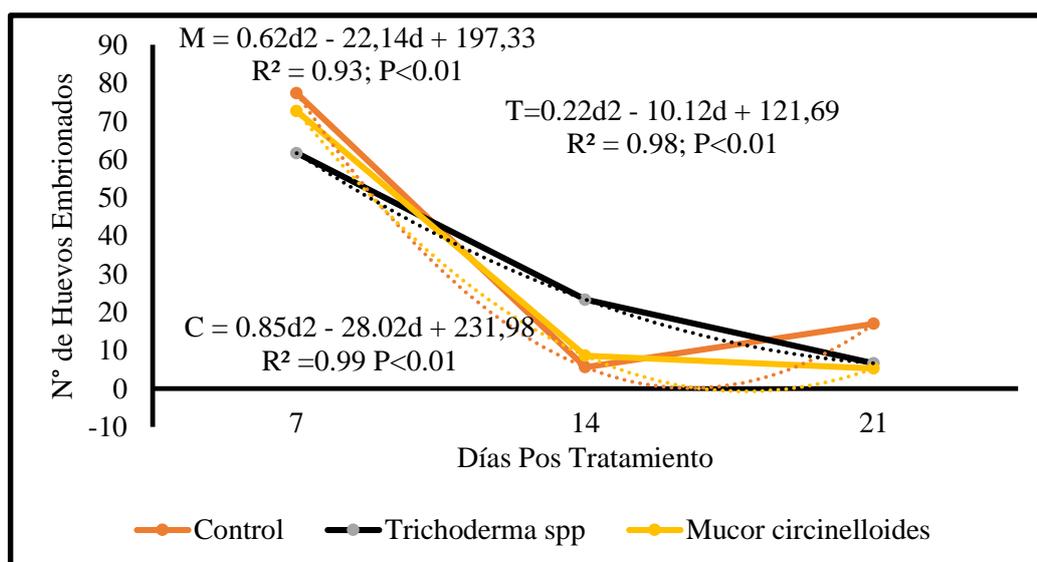
Para determinar cuál de los dos tratamientos de los hongos fue mejor en el recuento de huevos embrionados de *F. hepatica* en los diferentes tiempos (7, 14 y 21 días), en la tabla 4, figura 3 y anexo 9, 10, 11 y 12, se observa efecto en la interacción de tiempo por tratamiento ( $P < 0,01$ ), donde a los 7 días el promedio del número de huevos embrionados el grupo control (77,33) fue mayor al número de huevos embrionados del grupo *Trichoderma spp* ( $P < 0,05$ ) a partir de los 14 días los grupos que presentan el menor número de huevos embrionados son el control (5,67) y el *M. circinelloides* (8,67) en comparación a los huevos embrionados de los grupos de *Trichoderma spp* (23,33). A los 21 días el comportamiento fue diferente observándose que el número promedio de huevos embrionados fue similar en los tres grupos ( $P > 0,05$ ).

El número de huevos embrionados de los grupos control y *M. circinelloides* es mayor a los 7 días, para luego disminuir y mantenerse a los 14 y 21 días siendo estos dos últimos valores diferentes ( $P < 0,05$ ) al primero. En el grupo de *Trichoderma spp* son diferentes ( $p < 0,05$ ) a los 7, 14 y 21 días, y a medida que transcurren los días el número de huevos embrionados va disminuyendo.

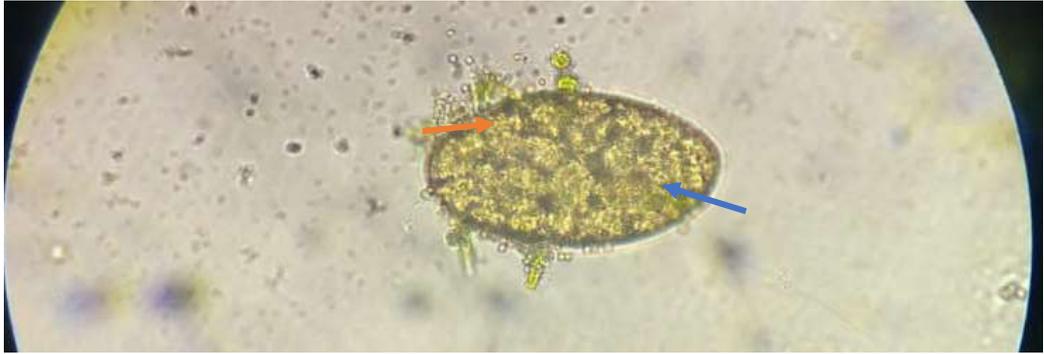
**Tabla 5:** Recuento de huevos embrionados después del tratamiento.

Días	Control	<i>Trichoderma spp</i> 10 <sup>9</sup> esporas	<i>M. circinelloides</i> 10 <sup>9</sup> esporas
7	77,33 a	61,67 b	72,67 ab
14	5,67d	23,33 c	8,67 d
21	17,00 c d	6,67 d	5,33 d

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ , prueba de Fisher).



**Figura 13:** Número de huevos de *F. hepatica* embrionados eclosionados después de tratamiento con los hongos de *Trichoderma spp* y del *M. circinelloides* a los 7, 14 y 21 días.



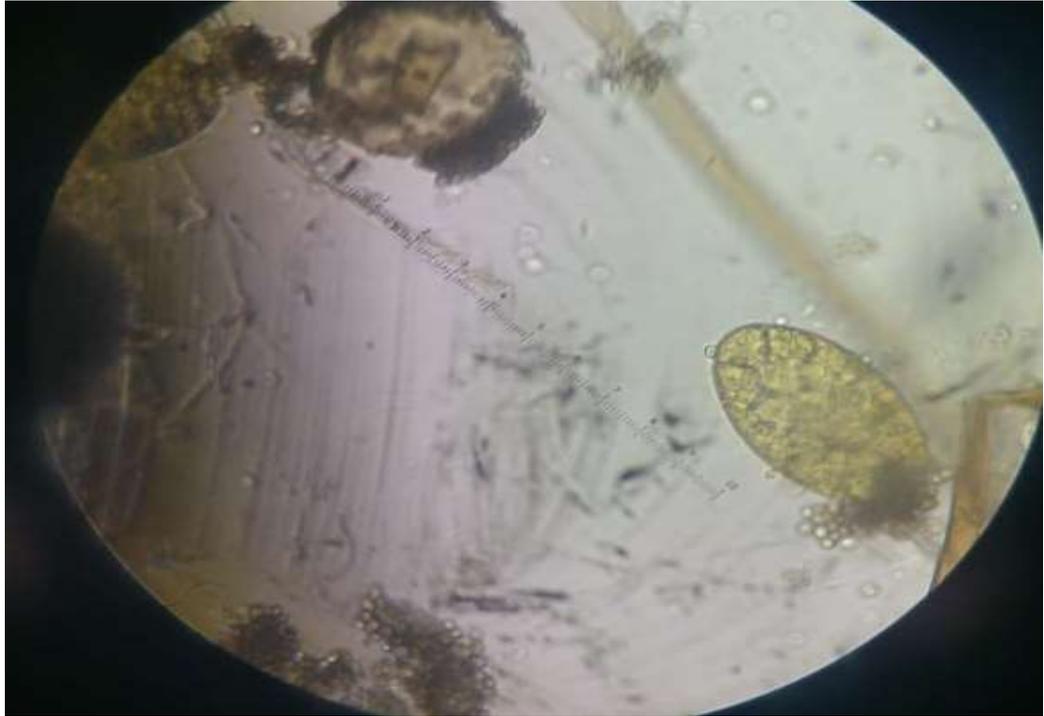
**Figura 14:** Huevo con células germinadas y crecimiento de formas fúngicas. (Flecha roja) crecimiento de hongo, (Flecha azul) células embrionarias.



**Figura 15:** Huevos sin contenido, flecha roja crecimiento fúngico.



**Figura 16:** Huevo embrionado con crecimiento fúngico a su alrededor (flecha roja).



**Figura 17:** Huevo con crecimiento fúngico, en la parte superior se observa un esporangio.



**Figura 18:** Huevo eclosionados (izquierda) y huevo sin embrionar (derecha).

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES

La eficacia ovicida del *Mucor circinelloides* sobre huevos de *Fasciola hepatica* in vitro en una concentración de  $10^9$  esporas es de  $48,26 \pm 5,65$  %.

La eficacia ovicida de *Trichoderma spp* sobre huevos de *Fasciola hepatica* in vitro en una concentración de  $10^9$  esporas es de  $5,22 \pm 2,52$  %.

La eficacia ovicida de *Mucor circinelloides* es significativamente mayor frente a la eficacia ovicida de *Trichoderma spp*, sobre huevos de *Fasciola hepatica*, por lo que se puede usar como parte de su control integral.

## RECOMENDACIONES

Realizar trabajos de eficacia con mayor cantidad de huevos de *F. hepatica* y mayor concentración de esporas de *Mucor circinelloides* y *Trichoderma spp.*

Usar *Mucor circinelloides* como parte del control integrado de *Fasciola hepatica*.

Realizar trabajos de eficacia de *Mucor circinelloides* incorporados al alimento para el control de huevos de *F. hepatica*.

## LISTA DE REFERENCIAS

- Alpízar, C.E., Rica, M.D.E.C., Oliveira, J.B. De, Jiménez, A.E., 2013. Fasciola hepatica en ganado bovino de carne en Siquirres y lesiones anátomo-histopatológicas de hígados bovinos decomisados en mataderos de Costa Rica. *Agron. Costarric.* 37, 7–16.
- Alvarez, E., Sutton, D.A., Cano, J., Fothergill, A.W., Stchigel, A., Rinaldi, M.G., Guarro, J., 2009. Spectrum of Zygomycete Species Identified in Clinically Significant Specimens in the United States † 47, 1650–1656.
- Andrea Brunori, A.B., 1985. *Introduzione allo studio dei funghi, II Libro.* ed.
- Arias, M.S., Francisco, I., Cazapal-Monteiro, C., Hernández, J.A., Gómez, D., Fernández, M., Cortiñas, F.J., Suárez, J.L., Paz-Silva, A., 2013. Soluciones Sostenibles para la prevención de parásitos en ganado vacunos en régimen ecológico. *Aida, XV Jornadas sobre Prod. Anim. Tomo II*, 795–797.
- Arias, M.S., Cazapal-monteiro, C.F., Suárez, J., Miguélez, S., Arroyo, F.L., Suárez, J.L., Gives, P.M. De, 2013. Producción mixta de esporas fúngicas filamentosas para prevenir las zoonosis de helmintos transmitidas por el suelo : un análisis preliminar.
- Baloyi, M.A., Laing, M.D., Yobo, K.S., 2012. Veterinary Parasitology Use of mixed cultures of biocontrol agents to control sheep nematodes. *Vet. Parasitol.* 184, 367–370.
- Barnett, H.L., Hunter, B.B., 1973. *Illustrated Genera of Imperfect Funfi.*
- Beynon, S.A., 2012. Potential environmental consequences of administration of

- anthelmintics to sheep. *Vet. Parasitol.* 189, 113–124.
- Boguś, M.I., Czygier, M., Kędra, 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.
- Braga, F.R., Araújo, J. V., Campos, A.K., Araújo, J.M., Carvalho, R.O., Silva, A.R., Tavela, A.O., 2008. In vitro evaluation of the action of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on *Fasciola hepatica* eggs. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 1559–1564.
- Carrada-bravo, T., 2007. *Fasciola hepatica*:Ciclo biológico y potencial biótico. *Rev. Latinoam. Patol. Clínica y Med. Lab.* 54, 21–27.
- Carrada-Bravo, T., 2007. Fasciola Hepatica: Ciclo Biologico Y Potencial Biotico. *Rev Mex Patol Clin* 54, 21–27.
- Carvalho, R.O., Braga, F.R., Araújo, J.V., 2011. Veterinary Parasitology Viability and nematophagous activity of the freeze-dried fungus *Arthrobotrys robusta* against *Ancylostoma spp* . infective larvae in dogs 176, 236–239.
- Ceballos, L., Canton, C., Pruzzo, C., Sanabria, R., Moreno, L., Sanchis, J., Suarez, G., Ortiz, P., Fairweather, I., Lanusse, C., Alvarez, L., Valladares, M.M., 2019. The egg hatch test: A useful tool for albendazole resistance diagnosis in *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 271, 7–13.
- Chavez, A., Sanchez, L., Arana, C., Suarez, A., 2012. Resistance to anthelmintics and prevalence of bovine fasciolosis in dairy farms in Jauja, Peru. *Rev. Investig. Vet. del Peru* 23, 90–97.

- Cordero, M., Rojo, F., Martínez, A., Sánchez, M., Hernández, S., Navarrete, I., Dies, P., Quiroz, H., Carvalho, M., 1999. *Parasitología Veterinaria*, 1ra Edició. ed. Madrid - España.
- Dias, A.S., Araújo, J. V., Braga, F.R., Araujo, J.M., Puppín, A.C., Fernandes, F.M., Ramos, R.F., Bertoni, R.M., Da Silva, R.G., Perboni, W.R., 2012. Biological control of *Fasciola hepatica* eggs with the *Pochonia chlamydosporia* fungus after passing through the cattle gastrointestinal tract. *Parasitol. Res.* 110, 663–667.
- Dias, A.S., Araújo, J. V., Braga, F.R., Puppín, A.C., Perboni, W.R., 2013. *Pochonia chlamydosporia* in the biological control of *Fasciola hepatica* in cattle in Southeastern Brazil. *Parasitol. Res.* 112, 2131–2136.
- Flores, B., Pinedo, R. V., Suarez, F., Angelats, R., Chavez, A., 2014. Prevalency of fascioliasis in llamas and alpacas in two rural communities of Jauja, Peru. *Rev Inv Vet Peru* 25, 284–292.
- Gálvez, A., Duque, J., Velásquez, L., 2012. La enfermedad es otra: itinerario terapéutico de la fasciolosis bovina en Rionegro (Antioquia). *Rev. CES Med. Vet. y Zootec.* 7, 73–86.
- García-corredor, D.J., Pulido-medellín, M.O., 2016. Uso de hongos nematófagos en el control biológico de nematodos gastrointestinales en ovinos Use of nematophagous fungi in biological control of 7, 78–86.
- García, C., 2011. Tecnologías de control biológico de parásitos 28–30.
- Godoy, M.Y., Roque, L.E., Doménech, C.I., Rodríguez, F.R., 2010. Diagnóstico coproparasitológico de *Fasciola hepatica* EN. *Rev Inv Vet Perú* 21, 175–179.

- González Morales, C., Sánchez, G.A., Castro Jiménez, C.C., Gómez Carmona, C., Molina Pérez, F., Velásquez Trujillo, L.E., 2013a. Guía para diseño de Sistemas de Tratamiento de Filtración en Múltiples etapas. Rev. EIA 10, 133–141.
- González Morales, C., Sánchez, G.A., Castro Jiménez, C.C., Gómez Carmona, C., Molina Pérez, F., Velásquez Trujillo, L.E., 2013b. Guía para diseño de Sistemas de Tratamiento de Filtración en Múltiples etapas. Rev. EIA 10, 133–141.
- Harman, G., 2001. *Trichoderma* spp., including *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* and other sp. Deuteromycetes, Moniliales. Cornell Univ. Geneva, NY 14456.
- Infante. Danay, Martínez. B, González. Noyma, R.Y., 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos 24, 14–21.
- Kassai, T., 2002. *Helmintología Veterinaria*, 1° Edición. ed. 1° Edición.
- Ketzis, J.K., Vercruyse, J., Stromberg, B.E., Larsen, M., Athanasiadou, S., Houdijk, J.G.M., 2006. Evaluation of efficacy expectations for novel and non-chemical helminth control strategies in ruminants. *Vet. Parasitol.* 139, 321–335.
- Larsen, M., 1999. Biological control of helminths. *Int. J. Parasitol.* 29, 139–146.
- Leguia, G., 1991. *Distomatosis hepática en el Perú epidemiología y control.*, 2 Edición. ed. Lima Perú.
- Lübbehüsen. TL, Nielsen. J, M.M., 2003. Characterization of the *Mucor circinelloides* life cycle by on-line image analysis 1152–1160.
- Malagón, H., Quintero, B., Vázquez, A., 2015. Control biológico de parásitos en la ganadería . Hongos del suelo Biological control of parasites in livestock . Soil fungi

3–11.

Marcos L. A., L., Yi, P., Machicado, A., Andrade, R., Samalvides, F., Sánchez, J., Terashima, A., 2007. Hepatic fibrosis and *Fasciola hepatica* infection in cattle. *J. Helminthol.* 81, 381–386.

Medina, M., 2007. Fasciolosis Clínica De Los Bovinos I.

Mehmood, K., Zhang, H., Sabir, A.J., Abbas, R.Z., Ijaz, M., Durrani, A.Z., Saleem, M.H., Ur Rehman, M., Iqbal, M.K., Wang, Y., Ahmad, H.I., Abbas, T., Hussain, R., Ghori, M.T., Ali, S., Khan, A.U., Li, J., 2017. A review on epidemiology, global prevalence and economical losses of fasciolosis in ruminants. *Microb. Pathog.* 109, 253–262.

Najafi, F., Rezaie, S., Kia, E.B., Mahmoudi, M., Khodavaisy, S., Mohebali, M., Gharagozlou, M.J., Rokni, M.B., Mowlavi, G., 2017. In vitro assay of *Paecilomyces lilacinus* biocontrol effects on *Fasciola hepatica* eggs illustrated in scanning electron micrographs. *Iran. J. Parasitol.* 12, 22–28.

Nordbring-Hertz, B., Jansson, H.-B., Tunlid, A., 2006. Nematophagous Fungi. eLS 1–11.

Nyindo, M., Lukambagire, A.H., 2015. Fascioliasis: An Ongoing Zoonotic Trematode Infection. *Biomed Res. Int.* 2015.

Of, C., De, C., 2014. Galba Truncatula Inducida a Infección Con Miracidios De *Fasciola Hepatica*, Colectados En Huayllapampa, San Jerónimo, Cusco, Peru 8, 325–338.

Olaechea, F., 2010. Tremátodos y Céstodos 30.

- Olaechea, F. V, 2004. *Fasciola hepatica*. Red Helmintol. FAO para América Lat. y el Caribe 129, 1909–1910.
- Paucar S., Chávez V., A., Casas A., E., Suárez A., F., 2011. Prevalencia De Fascioliasis Y Paramfistomiasis En El Ganado Lechero De Oxapampa, Pasco. Rev. Investig. Vet. del Perú 21, 87–92.
- Paz-Silva, A., Francisco, I., Valero-Coss, R.O., Cortiñas, F.J., Sánchez, J.A., Francisco, R., Arias, M., Suárez, J.L., López-Arellano, M.E., Sánchez-Andrade, R., de Gives, P.M., 2011. Ability of the fungus *Duddingtonia flagrans* to adapt to the cyathostomin egg-output by spreading chlamydospores. Vet. Parasitol. 179, 277–282.
- Quintero, R.B., 2016. “ Diagnóstico Y Control De Trematodosis En Ganado Vacuno De Colombia : Fasciolosis Y Paramphistomidosis .” Univ. Lisboa.
- Quiroz, H., 1995. Impacto económico, epidemiología, control y prevención de *Fasciola hepatica* en la ganadería. XII Congreso Latino Americano de Parasitología, Santiago de Chile. 20.
- Randy Gaugler y Anwar L. Bilgrami, 2004. Nematode Behaviour, Cabi Publi. ed. CAB Intertanional 2004.
- Rojas, J. Palacios, S., 2009. Impacto económico por decomiso de hígados infectados con *Fasciola hepatica* en camales de la Región Cajamarca. Universidad Nacional de Cajamarca.
- Rojas, M.J., Palomino, L.G., Calderon, S.T., Terán, S.J., 2013. Diagnóstico de resistencia antihemíntica de *Fasciola hepatica* a lo bovinos de cuatro distritos de Cajamarca - Perú, 2009–2012.

- Sagüés, M.F., 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, 143–147.
- Salazar. Luis A, Aponte. Glenda Y, Alcano. María de J, Sanabria. Nelly H, G.J.J., 2012. Importancia de las especies de *Trichoderma* para el control de *Macrophomina phaseolina* en las áreas agrícolas del estado Aragua, Venezuela. *Agron. Trop.* vol.62 no.
- Silva, A.P., 2018. El control biológico de los parásitos en la ganadería bovina, fundamentos y posibilidades reales 1–4.

## **ANEXOS**

**Tabla 06:** Recuento de huevos sin embrionar, embrionados y eclosionados a los 7 días después de tratamiento.

		Repeticiones	Huevos sin embrionar	Huevos embrionados	Huevos eclosionados	Total
Control	7 días	1	27	73	0	100
		2	23	77	0	100
		3	18	82	0	100
<i>Trichoderma spp</i>	7 días	1	32	68	0	100
		2	44	56	0	100
		3	39	61	0	100
<i>Muccor circinelloides</i>	7 días	1	17	83	0	100
		2	17	83	0	100
		3	48	52	0	100

**Tabla 07:** Recuento de huevos sin embrionar, embrionados y eclosionados a los 14 días después de tratamiento.

		Repeticiones	Huevos sin embrionar	Huevos embrionados	Huevos eclosionados	Total
Control	14 días	1	19	9	72	100
		2	24	5	71	100
		3	29	3	68	100
<i>Trichoderma spp</i>	14 días	1	43	24	33	100
		2	53	25	22	100
		3	66	21	13	100
<i>Muccor circinelloides</i>	14 días	1	43	9	48	100
		2	48	9	43	100
		3	58	8	34	100

**Tabla 08:** Recuento de huevos sin embrionar, embrionados y eclosionados a los 21 días después de tratamiento.

		Repeticiones	Huevos sin embrionar	Huevos embrionados	Huevos eclosionados	Total
Control	21 días	1	9	14	77	100
		2	2	16	82	100
		3	8	21	71	100
<i>Trichoderma spp</i>	21 días	1	26	10	64	100
		2	18	6	76	100
		3	18	4	78	100
<i>Muccor circinelloides</i>	21 días	1	46	8	46	100
		2	71	5	24	100
		3	48	3	49	100

**ANEXO 1: ANÁLISIS DE VARIANZA DE FACTORIAL DE 3 \*3 DE UN COMPLETAMENTE AL AZAR DEL NÚMERO DE HUEVOS ECLOSIONADOS.**

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R<sup>2</sup></u>	<u>R<sup>2</sup> Aj</u>	<u>CV</u>
Huevos eclosionados	27	0.97	0.95	19.19

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	24796.52	8	3099.56	65.23	<0.0001
Tratamiento	2366.52	2	1183.26	24.90	<0.0001
Días	18918.30	2	9459.15	199.06	<0.0001
Tratamiento*Días	3511.70	4	877.93	18.48	<0.0001
Error	855.33	18	47.52		
<u>Total</u>	<u>25651.85</u>	<u>26</u>			

**Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=6.82708**

*Error: 47.5185 gl: 18*

<u>Tratamiento</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>
<i>Muccor circinelloides</i>	27.11	9	2.30 A
<i>Trichoderma spp</i>	31.78	9	2.30 A
<u>Control</u>	<u>48.89</u>	<u>9</u>	<u>2.30 B</u>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

**Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=6.82708**

*Error: 47.5185 gl: 18*

<u>Dias</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>
-------------	---------------	----------	-------------

7 0.00 9 2.30 A  
 14 44.78 9 2.30 B  
21 63.00 9 2.30 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

**Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=11.82485**

*Error: 47.5185 gl: 18*

<u>Tratamiento</u>	<u>Dias</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
Control	7	0.00	3	3.98	A
<i>Muccor circinelloides</i>	7	0.00	3	3.98	A
<i>Trichoderma spp</i>	7	0.00	3	3.98	A
<i>Trichoderma spp</i>	14	22.67	3	3.98	B
<i>Muccor circinelloides</i>	21	39.67	3	3.98	C
<i>Muccor circinelloides</i>	14	41.67	3	3.98	C
Control	14	70.00	3	3.98	D
<i>Trichoderma spp</i>	21	72.67	3	3.98	D
<u>Control</u>	<u>21</u>	<u>76.67</u>	<u>3</u>	<u>3.98</u>	<u>D</u>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

**ANEXO 2: ANÁLISIS DE REGRESIÓN POLINÓMICA DEL NÚMERO DE HUEVOS ECLOSIONADOS, DEL GRUPO CONTROL**

<u>Tratamiento</u>	<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R<sup>2</sup></u>	<u>R<sup>2</sup> Aj</u>	<u>ECMP</u>	<u>AIC</u>	<u>BIC</u>
Control	Huevos eclosionados	9	0.99	0.99	25.00	51.56	52.35

**Coefficientes de regresión y estadísticos asociados**

<u>Coef</u>	<u>Est.</u>	<u>E.E.</u>	<u>LI(95%)</u>	<u>LS(95%)</u>	<u>T</u>	<u>p-valor</u>	<u>Cp</u>	<u>Mallows</u>	<u>VIF</u>
const	-133.33	8.39	-153.86	-112.81	-15.89	<0.0001			
Dias	23.57	1.36	20.24	26.90	17.32	<0.0001	301.03	49.00	
Dias <sup>2</sup>	-0.65	0.05	-0.76	-0.53	-13.44	<0.0001	181.50	49.00	

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)**

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	10822.22	2	5411.11	487.00	<0.0001
Dias	8816.67	1	8816.67	793.50	<0.0001
Dias <sup>2</sup>	2005.56	1	2005.56	180.50	<0.0001
Error	66.67	6	11.11		
<u>Total</u>	<u>10888.89</u>	<u>8</u>			

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	10822.22	2	5411.11	487.00	<0.0001
Dias	10822.22	2	5411.11	487.00	<0.0001
Error	66.67	6	11.11		
<u>Total</u>	<u>10888.89</u>	<u>8</u>			

**ANEXO 3: ANÁLISIS DE REGRESIÓN POLINÓMICA DEL NÚMERO DE HUEVOS ECLOSIONADOS DEL GRUPO *Muccor circinelloides*.**

Tratamiento	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	ECMP	AIC	BIC
<i>Muccor circinelloides</i>	Huevos eclosionados	9	0.88	0.83	177.50	69.20	69.99

**Coefficientes de regresión y estadísticos asociados**

Coef	Est.	E.E.	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor	Cp	Mallows	VIF
const	-85.33	22.35	-140.03	-30.64	-3.82	0.0088			
Dias	15.31	3.63	6.44	24.18	4.22	0.0055	18.83	49.00	
Dias <sup>2</sup>	-0.45	0.13	-0.76	-0.13	-3.48	0.0132	13.09	49.00	

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3313.56	2	1656.78	21.00	0.0020
Dias	2360.17	1	2360.17	29.92	0.0016
Dias <sup>2</sup>	953.39	1	953.39	12.09	0.0132
Error	473.33	6	78.89		
<u>Total</u>	<u>3786.89</u>	<u>8</u>			

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3313.56	2	1656.78	21.00	0.0020
Dias	3313.56	2	1656.78	21.00	0.0020
Error	473.33	6	78.89		
<u>Total</u>	<u>3786.89</u>	<u>8</u>			

**ANEXO 4: ANÁLISIS DE REGRESIÓN POLINÓMICA DEL NÚMERO DE HUEVOS ECLOSIONADOS, DEL GRUPO *Trichoderma spp.***

<u>Tratamiento</u>	<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R<sup>2</sup></u>	<u>R<sup>2</sup> Aj</u>	<u>ECMP</u>	<u>AIC</u>	<u>BIC</u>
<i>Trichoderma spp</i>	Huevos eclosionados	9	0.96	0.95	118.25	65.55	66.34

**Coefficientes de regresión y estadísticos asociados**

<u>Coef</u>	<u>Est.</u>	<u>E.E.</u>	<u>LI(95%)</u>	<u>LS(95%)</u>	<u>T</u>	<u>p-valor</u>	<u>Cp</u>	<u>Mallows</u>	<u>VIF</u>
const	4.67	18.24	-39.98	49.31	0.26	0.8067			
Días	-2.62	2.96	-9.86	4.62	-0.88	0.4103	1.78	49.00	
Días <sup>2</sup>	0.28	0.10	0.02	0.53	2.67	0.0372	8.11	49.00	

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)**

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	8294.22	2	4147.11	78.91	<0.0001
Días	7920.67	1	7920.67	150.71	<0.0001
Días <sup>2</sup>	373.56	1	373.56	7.11	0.0372
Error	315.33	6	52.56		
<u>Total</u>	<u>8609.56</u>	<u>8</u>			

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	8294.22	2	4147.11	78.91	<0.0001
Días	8294.22	2	4147.11	78.91	<0.0001
Error	315.33	6	52.56		
<u>Total</u>	<u>8609.56</u>	<u>8</u>			

**ANEXO 3: ANÁLISIS DE VARIANZA DE FACTORIAL DE 3 \*3 DE UN COMPLETAMENTE  
AL AZAR DEL NÚMERO DE HUEVOS SIN EMBRIONAR**

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R<sup>2</sup></u>	<u>R<sup>2</sup></u>	<u>Aj</u>	<u>CV</u>
Huevos sin embrionar	27	0.82	0.74	29.45	

**Análisis de la varianza**

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R<sup>2</sup></u>	<u>R<sup>2</sup></u>	<u>Aj</u>	<u>CV</u>
Huevos sin embrionar	27	0.81	0.72	28.86	

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	6942.67	8	867.83	9.50	<0.0001
Tratamiento	3400.67	2	1700.33	18.62	<0.0001
Dias	1224.22	2	612.11	6.70	0.0067
Tratamiento*Dias	2317.78	4	579.44	6.34	0.0023
Error	1644.00	18	91.33		
<u>Total</u>	<u>8586.67</u>	<u>26</u>			

**Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=9.46495**

*Error: 91.3333 gl: 18*

<u>Tratamiento</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>
<i>Muccor circinelloides</i>	44.00	9	3.19 A
<i>Trichoderma spp</i>	37.67	9	3.19 A
<u>Control</u>	<u>17.67</u>	<u>9</u>	<u>3.19 B</u>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

**Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=9.46495**

Error: 91.3333 gl: 18

Dias Medias n E.E.

14 42.56 9 3.19 A

7 29.44 9 3.19 B

21 27.33 9 3.19 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

**Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=16.39377**

Error: 91.3333 gl: 18

Tratamiento Dias Medias n E.E.

*Muccor circinelloides* 21 55.00 3 5.52 A

*Trichoderma spp* 14 54.00 3 5.52 A B

*Muccor circinelloides* 14 49.67 3 5.52 A B

*Trichoderma spp* 7 38.33 3 5.52 B C

*Muccor circinelloides* 7 27.33 3 5.52 C D

Control 14 24.00 3 5.52 C D

Control 7 22.67 3 5.52 C D E

*Trichoderma spp* 21 20.67 3 5.52 D E

Control 21 6.33 3 5.52 E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

**ANEXO 4: ANÁLISIS DE REGRESIÓN POLINÓMICA DEL NÚMERO DE HUEVOS SIN EMBRIONAR DEL GRUPO CONTROL**

<u>Tratamiento</u>	<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R<sup>2</sup></u>	<u>R<sup>2</sup> Aj</u>	<u>ECMP</u>	<u>AIC</u>	<u>BIC</u>
Control	Huevos sin embrionar	9	0.83	0.78	44.25	56.70	57.49

**Coefficientes de regresión y estadísticos asociados**

<u>Coef</u>	<u>Est.</u>	<u>E.E.</u>	<u>LI(95%)</u>	<u>LS(95%)</u>	<u>T</u>	<u>p-valor</u>	<u>CpMallows</u>	<u>VIF</u>
const	-0.67	11.16	-27.98	26.64	-0.06	0.9543		
Dias	4.45	1.81	0.02	8.88	2.46	0.0492	7.05	49.00
Dias <sup>2</sup>	-0.20	0.06	-0.36	-0.04	-3.14	0.0202	10.83	49.00

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)**

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	593.56	2	296.78	15.09	0.0046
Dias	400.17	1	400.17	20.35	0.0041
Dias <sup>2</sup>	193.39	1	193.39	9.83	0.0202
Error	118.00	6	19.67		
<u>Total</u>	<u>711.56</u>	<u>8</u>			

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	593.56	2	296.78	15.09	0.0046
Dias	593.56	2	296.78	15.09	0.0046
Error	118.00	6	19.67		
<u>Total</u>	<u>711.56</u>	<u>8</u>			

**ANEXO 7: ANÁLISIS DE REGRESIÓN POLINÓMICA DEL NÚMERO DE HUEVOS SIN EMBRIONAR DEL GRUPO *Muccor circinelloides*.**

<u>Tratamiento</u>	<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R<sup>2</sup></u>	<u>R<sup>2</sup> Aj</u>	<u>ECMP</u>	<u>AIC</u>	<u>BIC</u>
<i>Muccor circinelloides</i>	Huevos sin embrionar	9	0.55	0.40	395.00	76.40	77.19

**Coefficientes de regresión y estadísticos asociados**

<u>Coef</u>	<u>Est.</u>	<u>E.E.</u>	<u>LI(95%)</u>	<u>LS(95%)</u>	<u>T</u>	<u>p-valor</u>	<u>Cp</u>	<u>Mallows</u>	<u>VIF</u>
const	-14.00	33.34	-95.59	67.59	-0.42	0.6892			
Dias	6.83	5.41	-6.40	20.07	1.26	0.2534	2.60	49.00	
Dias <sup>2</sup>	-0.17	0.19	-0.64	0.29	-0.91	0.3992	1.82	49.00	

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)**

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	1292.67	2	646.33	3.68	0.0905
Dias	1148.17	1	1148.17	6.54	0.0431
Dias <sup>2</sup>	144.50	1	144.50	0.82	0.3992
Error	1053.33	6	175.56		
<u>Total</u>	<u>2346.00</u>	<u>8</u>			

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	1292.67	2	646.33	3.68	0.0905
Dias	1292.67	2	646.33	3.68	0.0905
Error	1053.33	6	175.56		
<u>Total</u>	<u>2346.00</u>	<u>8</u>			

**ANEXO 8: ANÁLISIS DE REGRESIÓN POLINÓMICA DEL NÚMERO DE HUEVOS SIN EMBRIONAR DEL GRUPO *Trichoderma spp.***

<u>Tratamiento</u>	<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R<sup>2</sup></u>	<u>R<sup>2</sup> Aj</u>	<u>ECMP</u>	<u>AIC</u>	<u>BIC</u>
<i>Trichoderma spp</i>	Huevos sin embrionar	9	0.83	0.77	128.75	66.31	67.10

**Coefficientes de regresión y estadísticos asociados**

<u>Coef</u>	<u>Est.</u>	<u>E.E.</u>	<u>LI(95%)</u>	<u>LS(95%)</u>	<u>T</u>	<u>p-valor</u>	<u>Cp</u>	<u>Mallows</u>	<u>VIF</u>
const	-28.33	19.04	-74.92	18.25	-1.49	0.1872			
Dias	12.74	3.09	5.18	20.29	4.12	0.0062	18.01	49.00	
Dias <sup>2</sup>	-0.50	0.11	-0.77	-0.23	-4.58	0.0038	21.98	49.00	

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)**

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	1668.67	2	834.33	14.58	0.0050
Dias	468.17	1	468.17	8.18	0.0288
Dias <sup>2</sup>	1200.50	1	1200.50	20.98	0.0038
Error	343.33	6	57.22		
<u>Total</u>	<u>2012.00</u>	<u>8</u>			

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	1668.67	2	834.33	14.58	0.0050
Dias	1668.67	2	834.33	14.58	0.0050
Error	343.33	6	57.22		
<u>Total</u>	<u>2012.00</u>	<u>8</u>			

**ANEXO 5: ANÁLISIS DE VARIANZA DE FACTORIAL DE 3 \*3 DE UN COMPLETAMENTE AL AZAR DEL NÚMERO DE HUEVOS EMBRIONADOS**

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R<sup>2</sup></u>	<u>R<sup>2</sup> Aj</u>	<u>CV</u>
Huevos embrionados	27	0.96	0.95	22.08

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	22408.52	8	2801.06	60.07	<0.0001
Tratamiento	90.74	2	45.37	0.97	0.3970
Dias	21239.41	2	10619.70	227.75	<0.0001
Tratamiento*Dias	1078.37	4	269.59	5.78	0.0036
Error	839.33	18	46.63		
<u>Total</u>	<u>23247.85</u>	<u>26</u>			

**Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=6.76293**

*Error: 46.6296 gl: 18*

<u>Tratamiento</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>
Control	33.33	9	2.28 A
<i>Trichoderma spp</i>	30.56	9	2.28 A
<i>Muccor circinelloides</i>	28.89	9	2.28 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

**Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=6.76293**

*Error: 46.6296 gl: 18*

<u>Dias</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>
7	70.56	9	2.28 A

14 12.56 9 2.28 B

21 9.67 9 2.28 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

**Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=11.71373**

Error: 46.6296 gl: 18

<u>Tratamiento</u>	<u>Dias</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
Control	7	77.33	3	3.94	A
<i>Muccor circinelloides</i>	7	72.67	3	3.94	A B
<i>Trichoderma spp</i>	7	61.67	3	3.94	B
<i>Trichoderma spp</i>	14	23.33	3	3.94	C
Control	21	17.00	3	3.94	C D
<i>Muccor circinelloides</i>	14	8.67	3	3.94	D
<i>Trichoderma spp</i>	21	6.67	3	3.94	D
Control	14	5.67	3	3.94	D
<u><i>Muccor circinelloides</i></u>	<u>21</u>	<u>5.33</u>	<u>3</u>	<u>3.94</u>	<u>D</u>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

**ANEXO 6: ANÁLISIS DE REGRESIÓN POLINÓMICA DEL NÚMERO DE HUEVOS  
EMBRIONADOS DEL GRUPO CONTROL**

<u>Tratamiento</u>	<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R<sup>2</sup></u>	<u>R<sup>2</sup> Aj</u>	<u>ECMP</u>	<u>AIC</u>	<u>BIC</u>
Control	Huevos embrionados	9	0.99	0.99	32.00	53.78	54.57

**Coefficientes de regresión y estadísticos asociados**

<u>Coef</u>	<u>Est.</u>	<u>E.E.</u>	<u>LI(95%)</u>	<u>LS(95%)</u>	<u>T</u>	<u>p-valor</u>	<u>Cp</u>	<u>Mallows</u>	<u>VIF</u>
const	232.00	9.49	208.78	255.22	24.44	<0.0001			
Dias	-28.02	1.54	-31.79	-24.26	-18.20	<0.0001	332.31	49.00	
Dias <sup>2</sup>	0.85	0.05	0.71	0.98	15.56	<0.0001	243.19	49.00	

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)**

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	8904.67	2	4452.33	313.05	<0.0001
Dias	5460.17	1	5460.17	383.92	<0.0001
Dias <sup>2</sup>	3444.50	1	3444.50	242.19	<0.0001
Error	85.33	6	14.22		
<u>Total</u>	<u>8990.00</u>	<u>8</u>			

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	8904.67	2	4452.33	313.05	<0.0001
Dias	8904.67	2	4452.33	313.05	<0.0001
Error	85.33	6	14.22		
<u>Total</u>	<u>8990.00</u>	<u>8</u>			

**ANEXO 11: ANÁLISIS DE REGRESIÓN POLINÓMICA CUADRÁTICA DEL NÚMERO DE HUEVOS EMBRIONADOS DEL GRUPO *Muccor circinelloides*.**

Tratamiento	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	ECMP	AIC	BIC
<i>Muccor circinelloides</i>	Huevos embrionados	9	0.93	0.91	245.25	72.11	72.90

**Coefficientes de regresión y estadísticos asociados**

Coef	Est.	E.E.	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor	Cp	Mallows	VIF
const	197.33	26.27	133.04	261.62	7.51	0.0003			
Días	-22.14	4.26	-32.57	-11.71	-5.20	0.0020	27.99	49.00	
Días <sup>2</sup>	0.62	0.15	0.25	0.99	4.11	0.0063	17.88	49.00	

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	8640.89	2	4320.44	39.64	0.0003
Días	6800.67	1	6800.67	62.39	0.0002
Días <sup>2</sup>	1840.22	1	1840.22	16.88	0.0063
Error	654.00	6	109.00		
<u>Total</u>	<u>9294.89</u>	<u>8</u>			

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	8640.89	2	4320.44	39.64	0.0003
Días	8640.89	2	4320.44	39.64	0.0003
Error	654.00	6	109.00		
<u>Total</u>	<u>9294.89</u>	<u>8</u>			

**ANEXO 12: ANÁLISIS DE REGRESIÓN POLINÓMICA DEL NÚMERO DE HUEVOS EMBRIONADOS DEL GRUPO *Trichoderma spp.***

<u>Tratamiento</u>	<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R<sup>2</sup></u>	<u>R<sup>2</sup> Aj</u>	<u>ECMP</u>	<u>AIC</u>	<u>BIC</u>
<i>Trichoderma spp</i>	Huevos embrionados	9	0.98	0.97	37.50	55.21	56.00

**Coefficientes de regresión y estadísticos asociados**

<u>Coef</u>	<u>Est.</u>	<u>E.E.</u>	<u>LI(95%)</u>	<u>LS(95%)</u>	<u>T</u>	<u>p-valor</u>	<u>Cp</u>	<u>Mallows</u>	<u>VIF</u>
const	121.67	10.27	96.53	146.81	11.84	<0.0001			
Dias	-10.12	1.67	-14.20	-6.04	-6.07	0.0009	37.86	49.00	
Dias <sup>2</sup>	0.22	0.06	0.08	0.37	3.75	0.0095	15.08	49.00	

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)**

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	4772.22	2	2386.11	143.17	<0.0001
Dias	4537.50	1	4537.50	272.25	<0.0001
Dias <sup>2</sup>	234.72	1	234.72	14.08	0.0095
Error	100.00	6	16.67		
<u>Total</u>	<u>4872.22</u>	<u>8</u>			

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	4772.22	2	2386.11	143.17	<0.0001
Dias	4772.22	2	2386.11	143.17	<0.0001
Error	100.00	6	16.67		
<u>Total</u>	<u>4872.22</u>	<u>8</u>			