



**DESARROLLO DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO,
VIABILIDAD Y MANTENIMIENTO DE HONGOS NEMATÓFAGOS**

**LAURA PAOLA GUZMAN TORRES
LINA PAOLA GOMEZ MENDIVELSO
NICOLAS GARAY URBINA**

**ASESOR INTERNO:
LIGIA CONSUELO SÁNCHEZ, MSc
UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
PROYECTO DE INVESTIGACION
BOGOTÁ D.C., ENERO 2019**

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios por permitirnos culminar esta etapa de nuestras vidas.

Agradecemos a la Universidad Colegio mayor de Cundinamarca que nos brindó sus instalaciones para la elaboración de este proyecto, y a nuestra asesora la docente Ligia Consuelo Sánchez, por guiarnos en el proceso con sus amplios conocimientos y brindarnos la oportunidad de pertenecer al semillero CEPARIUM en el cual logramos desarrollar este proyecto.

Agradecemos al semillero de investigación de BIOTECNOLOGIA Y GENETICA de la docente Ruth Sánchez y a la Universidad de la Sabana quienes nos prestaron sus instalaciones y nos suministraron herramientas esenciales para este proyecto. Agradecemos a Lizeth González por su apoyo y dedicación durante el proceso experimental.

Agradecemos al cuerpo docente quienes nos aportaron los conocimientos necesarios durante nuestra formación profesional para poder asumir cada reto presentado durante la elaboración experimental y teórica de nuestro proyecto.

Agradecemos a nuestros padres y demás familiares quienes nos apoyaron con motivación, amor y paciencia en cada una de las etapas vividas durante nuestra formación profesional.

TABLA DE CONTENIDO

1. CONTENIDO

RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. ANTECEDENTES.....	5
4. OBJETIVOS.....	9
4.1 OBJETIVO GENERAL	9
4.2 OBJETIVO ESPECIFICO	9
5. MARCO TEORICO.....	10
5.1 Medios de cultivo	10
5.2 Hongos nematófagos	10
5.2.1.1 Hifas adhesivas:	12
5.2.1.2 Anillos no constrictores:	12
5.2.1.3 Anillos constrictores:	12
5.2.1.4 Ramas adhesivas:	12
5.2.1.5 Redes adhesivas	13
5.3 Nemátodos	14
5.3.2 <i>Caenorhabditis elegans</i> como modelo experimental	15
5.3.3 Alternativas no químicas de control de nemátodos gastrointestinales	16
• Estrategia inmunológica:	16
5.4 Control biológico	16
5.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS “SDS-PAGE”	17
6. DISEÑO METODOLOGICO	19
6.1 TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS:	20
7. RESULTADOS	25
8. Discusión	32
9. CONCLUSIONES	36
10. REFERENCIAS.....	37
11. ANEXOS	45
ANEXO 1 Composición medio NGM	45
ANEXO 2 Composición y preparación del buffer M9	45
ANEXO 3 Elaboración de la electroforesis SDS PAGE	46
ANEXO 4 Marcación de las muestras de Fosca	49
ANEXO 5 Marcación de las muestras de la Calera	50

ANEXO 6 Composición medio Sabouraud	50
ANEXO 7 Composición agar agua	50
ANEXO 8 Técnica de siembra de suelo por espolvoreado en placa	51
ANEXO 9 Técnica plug de agar.....	51
ANEXO 9.Tinción de azul de lactofenol.....	51

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Esquema con las principales estructuras de los hongos nematófagos.	10
Figura 2	Larvas de nematodos atrapadas por anillos constrictores.	11
Figura 3	Estructuras de <i>Arthrobotrys musiformis</i> .	12
Figura 4	Ciclo de vida del nemátodo <i>C. elegans</i> .	15
Figura 5	Preparación medio NGM (autores).	19
Figura 6	Electroforesis SDS-PAGE (autores).	20
Figura 7	DIAGRAMA DE TOMA DE MUESTRA Muestreo sistemático en X (autores).	21
Figura 8	Siembra del hongo en los medios de cultivo con el extracto (autores).	23
Figura 9	Extracto de proteínas (autores).	24
Figura 10	Corrido electroforesis SDS-PAGE (autores).	24
Figura 11	Siembra de las dos muestras de suelo de Fosca agar agua (autores).	24
Figura 12	Siembra de las dos muestras de suelo de Fosca agar Sabouraud (autores).	24
Figura 13	A. preparación B y C. Hongo estéril (autores).	25
Figura 14	Muestra 1 calera (autores).	25
Figura 15	Muestra 2 calera (autores).	25
Figura 16	Muestra 3 calera (autores).	26
Figura 17	Muestra 4 calera (autores).	26
Figura 18	Muestra 5 calera (autores).	26
Figura 19	Anillos constrictores observados a los 15 días post (autores).	27
Figura 20	Anillos constrictores observados a los 15 días post (autores).	27
Figura 21	Acción nematófaga de las estructuras constrictoras sobre el nemátodo (autores).	27
Figura 22	Morfología hongo nematófago <i>Arthrobotrys musiformis</i> en azul de lactofenol (autores).	25

Figura 23 Crecimiento en el agar con extracto del modelo experimental C. <i>elegans</i> en la dilución 1:5 (autores).....	28
Figura 24 Crecimiento en el agar con extracto del modelo experimental C. <i>elegans</i> en la dilución 1:10 (autores).....	29
Figura 25 Crecimiento en el agar con extracto del modelo experimental C. <i>elegans</i> en la dilución 1:20 (autores).....	29
Figura 26 Control negativo (autores).....	29

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Arthrobotrys</i>	11
Tabla 2. Clasificación taxonómica de los nemátodos.....	11
Tabla 3. Variables e indicadores.....	15
Tabla 4. Crecimiento muestras Fosca.....	24
Tabla 5. Descripción del crecimiento en el agar agua de las 5 muestras obtenidas en la finca de La Calera.....	25
Tabla 6. Crecimiento con dilucio inicial 1/5 y diluciones seriadas 1/10 1/20 del extracto de proteínas (Autores).....	28

INDICE DE GRAFICAS

GRAFICA 1: Número de anillos constrictores observado en 100 campos con objetivo 40x a las 0h, 12h, 24h y 48h después de la siembra en el agar con las diluciones 1:5, 1:10 y 1:20 del extracto de proteínas del modelo animal *C. elegans*..... 30

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1	Composición medio NGM.....	41
ANEXO 2	Composición y preparación del buffer M9.....	41
ANEXO 3	Elaboración de la electroforesis SDS PAGE.....	42
ANEXO 4	Marcación de las muestras de Fosca.....	46
ANEXO 5	Marcación de las muestras de la Calera	46
ANEXO 6	Composición medio Sabouraud.....	46
ANEXO 7	Composición agar agua.....	47
ANEXO 8	Técnica de siembra de suelo por espolvoreo.....	47
ANEXO 9	Técnica Plug de agar.....	47
ANEXO 10	Tinción de azul de lactofenol.....	50



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA.

**DESARROLLO DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO,
VIABILIDAD Y MANTENIMIENTO DE HONGOS NEMATÓFAGOS**

RESUMEN

El tratamiento para control de parásitos en animales se ha realizado tradicionalmente con productos químicos, aunque algunos investigadores están utilizando alternativas biológicas, con hongos nematófagos. Su acción se produce solamente cuando el hongo entra en contacto con el nemátodo, pero el tiempo para activar su acción nematófaga es relativamente largo, lo cual es un problema para su aplicación. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un medio de cultivo con el fin de aislar hongos nematófagos, mejorando los tiempos de mantenimiento y viabilidad en su actividad nematófaga. La metodología incluyó, ensayos previos y obtención del hongo nematófago, preparación de los diferentes medios de cultivo para aislar e identificar el hongo, producción del extracto de nematodos del modelo animal *Caenorhabditis elegans*, determinación de la viabilidad del medio, la acción antagónica y diseño del protocolo. Se logró obtener el extracto de proteínas del modelo experimental *Caenorhabditis elegans*; se verificó la acción antagónica de los hongos nematófagos aislados y se diseñó un protocolo que incluye la preparación del medio de cultivo y la forma de usarlo para que los hongos conserven su actividad nematófaga. Se pudo concluir que el medio de cultivo desarrollado con el extracto de *Caenorhabditis elegans* puede ser utilizado para el crecimiento de hongos nematófagos. A futuro se espera que se realicen pruebas haciendo escalamientos para lograr una biomasa que pueda llevarse a uso comercial ya sea aplicando en pasturas o para alimento animal.

Palabras claves: Hongos nematófagos, control biológico, extracción de proteínas, *Caenorhabditis elegans*.

Estudiantes: Nicolás Garay; Lina P. Gómez; Laura P. Guzmán.

Docente: Ligia C. Sánchez MSc

Fecha: 17/08/2018

Institución: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

2. INTRODUCCIÓN

En trabajos realizados por la FAO a solicitud de la Organización Mundial de Sanidad Animal, se muestra que el 55% de los países miembros de dicha organización (77 de 151 países) tiene problemas de resistencia en especies de endoparásitos y ectoparásitos de importancia económica. El 22% de estos países presentan dos o más especies con resistencia¹. Adicionalmente, produce efectos importantes de los antiparasitarios químicos como la residualidad en productos de consumo humano y el posible impacto negativo en organismos no blanco.

Por otra parte, los nemátodos son organismos de vida libre y se alimentan de hongos, bacterias, protozoarios u otros nemátodos y forman parte importante de las cadenas tróficas del suelo². Sin embargo, por su acción parasítica, los nemátodos son considerados, un problema para la salud humana y particularmente para la agricultura y la ganadería.

A consecuencia del uso indiscriminado de agroquímicos y en consecuencia de la resistencia que ocasionan, hay una búsqueda permanente de alternativas amigables con el ambiente, apareciendo el manejo biológico con el fin de disminuir de alguna manera las tasas de resistencia. La aplicación de los productos biológicos, implica, generar biomasa del ser vivo que se está utilizando como controlador de la plaga para su comercialización y que el producto obtenido conserve su acción biológica. Un ejemplo son los hongos nematófagos que son utilizados como enemigos naturales, por lo tanto, al llevarlos a su comercialización implica que se mantengan las características de viabilidad y acción antagónica.

El problema con estos hongos es que debe conservar su acción y hasta el momento no se ha encontrado un medio de cultivo que garantice la capacidad de ser nematófagos, de acuerdo con estudios previos, solamente hasta que el hongo entra en contacto con el nemátodo, se ejerce la acción. Teniendo en cuenta, el ambiente y las condiciones nutricionales necesarias para su desarrollo. Los hongos nematófagos son capaces de mantenerse durante un largo periodo de tiempo, según Jaime Flores et al en 1999, pero dejaron abierta

la incógnita, de la alteración de su capacidad nematófaga en ese transcurso de tiempo y si presentaba la misma eficacia al enfrentarse a un nuevo nemátodo.¹¹

Estos estudios llevaron a otros investigadores a buscar alternativas de favorecer el mantenimiento de la acción nematófaga, tal como, lo realizó Maria Sol Arias et al en el 2013, donde adicionaron nemátodos vivos, extracto de nemátodos y nemátodos muertos al agar harina de maíz, con el fin de obtener crecimiento de *Arthrobotrys flagrans*.¹⁵

Por esta razón, el objetivo de este trabajo fue elaborar un medio de cultivo utilizando un modelo de nemátodo experimental con *C. elegans* que pueda proporcionar al hongo los nutrientes necesarios para que active y conserve su acción nematófaga.

3. ANTECEDENTES

Una de las principales razones que ha incrementado el uso de productos biológicos ha sido contrarrestar el uso indiscriminado de plaguicidas, por cuanto, cada vez es más común que aparezcan especies y formas especiales de organismos con mayor potencial de resistencia a los insumos sintéticos.

La investigación, en este sentido, se ha dirigido a buscar en la naturaleza, enemigos naturales que realicen acciones similares a los químicos pero que sean amigables con el ambiente. Desde la Microbiología, la principal estrategia para el desarrollo de este potencial, es encontrar medios de cultivo en los que estos organismos vivos puedan ser utilizados a nivel comercial. Un primer estudio realizado en 1881, por el micólogo Brefeld, reporta que utilizó gelatina para el crecimiento de los hongos³. En este trabajo, se elaboró el primer medio de cultivo para hongos con el propósito de aislar, identificar y generar biomasa y de esta manera poder realizar estudios con el fin de realizar un aporte a la ciencia y a la evolución. El intento de realizar el aislamiento de hongos y generar biomasa ocurrió hace más de 130 años y este punto de partida ha permitido trabajar para dar respuesta a problemas como el que se plantea en la presente investigación, que es encontrar un medio de cultivo adecuado donde hongos nematófagos se desarrollen y realicen su actividad nematófaga frente a nemátodos gastrointestinales.

En 1888, Luis López describió por primera vez un hongo con capacidad depredadora de nemátodos⁴. Solo hasta 1962 Coscarelli et al establecieron que la fuente de nutrición más importante para el crecimiento de los hongos nematófagos era la biotina, tiamina y el zinc⁵.

Posteriormente, estudios realizados en 1987, David Gorantl, determinó que el control biológico por parte de los hongos nematófagos no solo se puede implementar en animales, sino también en plantas⁶. A partir de estos estudios en este mismo año, Grovold et al realizaron un estudio de campo en Dinamarca para evaluar el efecto de la adición de conidios de *Arthrobotrys oligospora* en heces de vaca, sobre la reducción de larvas de *Cooperia oncophora* y

observaron una reducción de hasta 10 veces el número de larvas de este nemátodo, comparados con una parcela testigo a la que no se le adicionaron conidios de este hongo⁷.

Gracias a este aporte científico, en 1979, Barron describe que el *Arthrobotrys flagrans* era capaz de formar las clamidosporas, después de la ruptura de la pared de la hifa primaria, mediante la expansión de la pared interna que luego produce incrustaciones verrugosas sobre su superficie, las cuales van a interactuar con el nemátodo en la acción nematofaga⁸.

En 1983, Delia Bucaro realizó una investigación sobre hongos nematófagos en el Salvador, donde se aislaron 18 especies de hongos nematófagos⁹. Teniendo toda esta información sobre la efectividad y la nueva implementación del método de control biológico con hongos nematófagos, en 1995, se realizó la primera Conferencia sobre Nuevos Enfoques para el Control de Helminthos Parásitos de Ganado en Armidale, Australia¹⁰, lo que permitió una evolución en la implementación mundial de este control biológico, principalmente en el área ganadera y equina.

Durante estos estudios, aparecieron diversas incógnitas sobre la viabilidad, mantenimiento y eficiencia de la acción nematófaga *in vitro* de estos hongos, pero gracias a un estudio realizado en 1999 por Jaime Flores et al, describieron que *Duddingtonia flagrans* es capaz de mantenerse durante un año a temperatura ambiente¹¹, resolviendo así la duda frente al mantenimiento, pero no quedando claro, si se alteró su capacidad nematófaga y su eficiencia a la hora de entrar en contacto de nuevo con el nemátodo.

En el 2005, Roberto González et al, resuelven la incógnita de por qué el hongo ataca los nemátodos *in vitro*, manifestando que esta necesidad predatora se da en el medio en el que crece el hongo, que es el agar agua; este medio, es un medio pobre en nutrientes, lo cual hace que el hongo requiera de las fuentes de carbono que le suministrara el nemátodo al entrar en contacto y caer en sus trampas predatoras¹².

En el 2009, Martha Orozco et al, hicieron un estudio con 16 cepas de hongos nematófagos determinando que la actividad predadora de cada hongo está influenciada por la especie y procedencia de los hongos, pero también la especie de larvas a la que se los enfrenta¹³. Esto demuestra que la eficiencia del hongo se limita a diversas variables.

Para el 2011, Armando Aguilar et al buscaron implementar una nueva técnica de control biológico que interactuara directamente con el animal. Crearon pellets a los cuales le implementaron el hongo nematófago. No hubo buenos resultados porque al parecer los ácidos presentes no fueron resistidos por el hongo.¹⁴

En el 2013, María Sol Arias et al, realizaron un estudio en donde buscaban probar el crecimiento de *A. flagrans* en agar harina de maíz, utilizando los nemátodos vivos, extracto de nemátodos y nemátodos muertos. En esta investigación, se demostró que no es necesario tener al nemátodo vivo para que pueda ser estimulada la producción de clamidiosporas¹⁵.

En 2015, Juan Li et al, estimaron que las características carnívoras de hongos que atrapan el nemátodo probablemente aparecieron aproximadamente 400 años atrás, resultados filogenéticos basados en los ARN ribosomales (ARNr) y genes codificantes de proteínas, sugirieron que las estructuras de captura podrían servir como indicadores robustos para la delimitación genérica entre estos hongos.¹⁶

Posteriormente, en 2017 Yen Ping et al, demostraron que *A. oligospora* puede superar el problema de que los nemátodos se escapen, mientras el hongo realiza la formación de la trampa por completo. El hongo logra atraer a los nemátodos para que se queden cerca, al producir varios compuestos volátiles.¹⁷

Por otro lado, Maria Belen en el 2018, demostró que los hongos nematófagos cultivados en medios líquidos, presenta actividad nematicida y

nemostática, debido a la exotoxinas que secreta en el medio, mostrando un nuevo enfoque al cultivo de los hongos nematófagos¹⁸

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- Desarrollar un medio de cultivo para el crecimiento y mantenimiento de la acción nematófaga en hongos aislados del suelo, verificando su acción antagónica, utilizando como modelo el nemátodo experimental *Caenorhabditis elegans*.

4.2 OBJETIVO ESPECIFICO

- Obtener un extracto de proteínas del modelo experimental *Caenorhabditis elegans* para incorporar al medio de cultivo como estímulo al desarrollo de hongos nematófagos.
- Desarrollar el medio de cultivo para el crecimiento y mantenimiento del hongo nematófago
- Verificar la acción antagónica de los hongos nematófagos en el medio de cultivo desarrollado.

5. MARCO TEORICO

5.1 Medios de cultivo

Un medio de cultivo es un sustrato o una solución de nutrientes que permite el desarrollo de microorganismos ¹⁹. Los medios de cultivo se pueden clasificar de diferentes maneras dependiendo de su origen, consistencia y composición.

En la clasificación según su origen, se pueden encontrar los medios naturales, que son de origen animal o vegetal como extractos de tejidos o infusiones sin interacción de componentes químicos. Sintéticos, son los medios que contienen una composición química definida cualitativamente y cuantitativamente y los semisintéticos, que son los medios sintéticos con una adición de factores de crecimiento bajo ¹⁹.

Por otro lado también se clasifican según consistencia, entre estos se encuentran los medios líquidos, también denominado caldo el cual contiene los nutrientes en una solución acuosa, los sólidos que son obtenidos mediante un medio líquido más la agregación de agar la cual es una sustancia inerte polisacárido que se extrae de las algas la cual ayuda a dar consistencia al medio y no influye en el crecimiento del microorganismo y el medio semisólido también está constituido por un medio líquido con una mínima concentración de agar- agar¹⁹.

Por último, están los medios clasificados por composición, se determinan por el requerimiento de componentes que necesite el microorganismo que se desea obtener, esto hace que el medio se convierta en un medio común o básico, diferencial o de enriquecimiento y selectivo. En estos medios es fundamental tener en cuenta factores como, pH, temperatura, alteraciones osmóticas, nivel de oxígeno, antibióticos, inhibidores, factores de crecimiento, entre otros¹⁹.

5.2 Hongos nematófagos

Los hongos nematófagos pertenecen a una familia de hongos que habitan principalmente en el suelo, y son antagonistas de los nemátodos más estudiados, porque tienen las siguientes ventajas:

- 1) Alto potencial como agentes biocontroladores.
- 2) Presentan adaptaciones morfológicas y alta capacidad para capturar nemátodos²⁰.

Los hongos nematófagos se agrupan en su mayoría dentro de los hongos anamórficos son habitantes naturales del suelo y pueden aislarse de heces de animales, suelo y material vegetal en descomposición²¹.

Estos microorganismos tienen la propiedad de capturar y de depredar las larvas en las heces antes de que se trasladen a las pasturas, evitando así su ingestión por los animales en pastoreo. Tienen la habilidad de usar los nemátodos como un recurso nutritivo adicional, de tal manera que al pasar a estado parasítico cambian su morfología y desarrollan las trampas de captura²⁰.

Existen estudios en los que se ha encontrado que los hongos nematófagos como resultado de su metabolismo, producen una serie de compuestos con actividades diversas, dentro de las que destacan enzimas con actividad proteolítica, nematicida e inclusive contra células cancerígenas; llegando a tener un importante impacto; no solo en el control de plagas de importancia agrícola y pecuaria; sino que inclusive podrían llegar a tener un uso potencial en salud pública²².

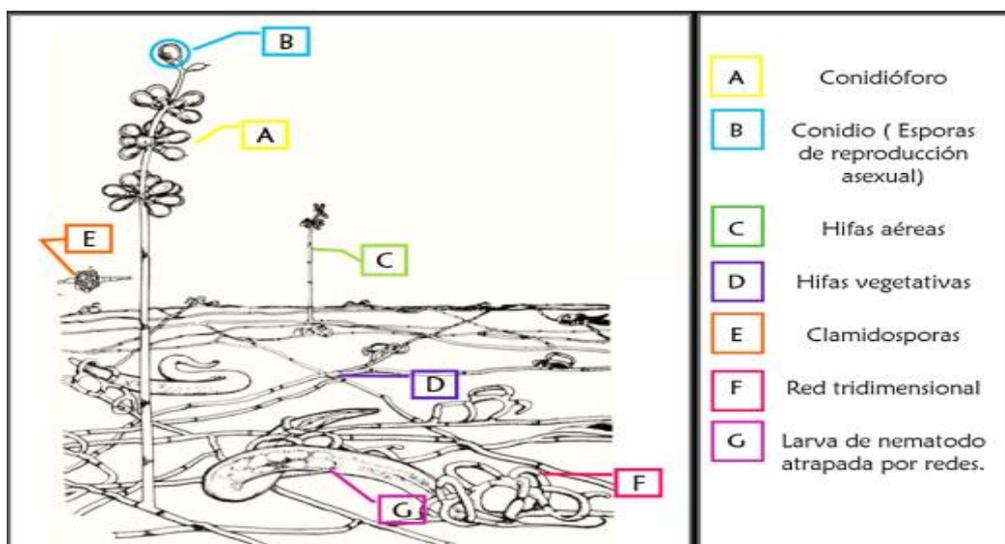


Figura 1. Esquema con las principales estructuras de los hongos nematófagos²⁰.

5.2.1 Estructuras de atrapamiento de los hongos nematófagos.

5.2.1.1 Hifas adhesivas: El material adhesivo es producido sobre la superficie de la hifa y un nematodo puede ser capturado en cualquier punto²⁰. Este método de atrapamiento se encuentra en los hongos Zygomycetos.

5.2.1.2 Anillos no constrictores: Son producidos por ramas que se forman a partir de una hifa postrada; la rama crece y se curva hasta llegar a su punto de partida formando un anillo de 20 – 30 micrones de diámetro²³. Los nematodos son capturados cuando se mueven en el interior del anillo formado por tres células. Estos anillos ocurren solamente en los Deuteromycetes.

5.2.1.3 Anillos constrictores: Se forman de la misma manera que los no constrictores sólo que el tallo es más corto y más grueso. Cuando un nematodo entra en un anillo acciona una respuesta en el hongo que consiste en el ensanchamiento de las tres células hacia adentro con una fuerza y una presión que constriñe el cuerpo del nematodo sin posibilidad de escape²⁰, esta forma de atrapamiento es comúnmente encontrada en los Deuteromycetes



Figura 2. Larvas de nematodos atrapadas por anillos constrictores²⁰.

5.2.1.4 Ramas adhesivas: Son prolongaciones miceliales que también producen una sustancia adhesiva donde quedan atrapados los

nematodos; estas estructuras se encuentran en pocas especies de los Deuteromicetos. Una rama está cubierta en toda su superficie de una sustancia adhesiva, los nematodos son capturados cuando quedan adheridos a estas estructuras²³.

5.2.1.5 Redes adhesivas: Los nematodos son capturados porque se adhieren a redes bidimensionales o tridimensionales que están cubiertas con una sustancia adhesiva²⁰. Las redes son la forma más común de atrapamiento y se encuentra solo en los Deuteromycetes.

5.2.2 *Arthrobotrys musiformis*

Tabla 1. Clasificación taxonómica *Arthrobotrys*

Reino	Hongos	
Filum	Ascomicota	
Clase	Orbiliomicetos	
Orden	Orbiliales	
Familia	Orbiliaceae	
Genero	<i>Arthrobotrys</i>	

Hongo nematófago caracterizado por tener conidióforos erectos con 7 a 12 conidios y un sistema de candelabros como ramificaciones cada una con un único conidio terminal. Los conidios son alargados, ovoidales, rectos o ligeramente curvos, con un septo medial.

Filogénicamente *A. musiformis* forma redes adhesivas tridimensionales y anillos simples en presencia de nematodos. Una de las ventajas que exhibe este hongo frente a *A. oligospora* es el desarrollo de estructuras de reproducción en cantidades considerables, denominadas clamidosporas, las cuales facilitan el rápido desarrollo de colonias puras en laboratorio y por otro lado resisten los

los
esta
biológico.²⁰

procesos digestivos de
animales tratados con
estrategia de control

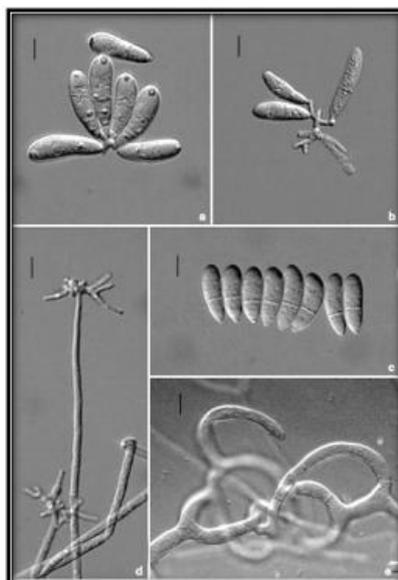


Figura 3. Estructuras de *Arthrobotrys musiformis*²⁰

5.3 Nemátodos

Los nemátodos son gusanos cilíndricos y alargados que pueden medir de 0.1 a 150 cm, con extremos normalmente puntiagudos, son organismos tribásicos con una cutícula externa semirrígida que les impide crecer, por lo que se ven obligados a mudar; por debajo de esta, se encuentra la hipodermis y más internamente la capa muscular²⁴.

Estos organismos constituyen el grupo más abundante de animales multicelulares en la tierra, en la que ocupan la mayoría de los hábitats. Son parásitos de animales y plantas; pueden alimentarse de bacterias, hongos y hasta de otros nemátodos. Su forma es de hilo o similar a una anguila, viéndose redondos al corte transversal, su cuerpo es liso, nunca segmentado, carece de patas u otros apéndices; su movilidad depende de los músculos longitudinales divididos en cuatro cordones.²⁵

En su mayoría, se reproducen de forma bisexual, algunas especies presentan reproducción partenogenética, el ciclo de vida es simple y directo y se divide en seis estadios: huevo, cuatro estados larvarios y el adulto²⁶

5.3.1 Clasificación taxonómica de los nemátodos

Tabla 2. Clasificación taxonómica de los nemátodos.

Reino	Animalia
Filum	Nematoda

Clase	Secernentea
Orden	Rhabditida
Suborden	Strongylida
Familia	Strongyloidea, Tichostrongyloidea, Rhabditidae
Genero	<i>Haemonchus, Cooperia, Nematodirus, Trichostrongylus, Strongyloides, , Trichuris, Caenorhbditis.</i>

5.3.2 *Caenorhabditis elegans* como modelo experimental

El nemátodo *C. elegans* es fácil de manipular en el laboratorio, tiene un genoma pequeño, una anatomía simple y esto lo convierte en un organismo modelo muy atractivo para estudiar los mecanismos de acción de sus genes, su funcionamiento y regulación. Actualmente, se conoce que el genoma de este nemátodo está conformado por alrededor de 19.000 genes ²⁷. Este organismo ayuda a definir las razones del envejecimiento humano, funcionamiento neuronal y diferenciación celular ²⁸.

En el ciclo de vida de este nemátodo se puede determinar cada una de las fases de su ciclo de vida mediante la observación, cada adulto hermafrodita es capaz de colocar entre 200 y 300 huevos, al eclosionar, la nueva generación paso por cuatro estados larvarios antes de llegar a la etapa adulta. Durante su segundo estado larvario, y en caso de sobrepoblación o ausencia de alimento, la larva puede entrar a un estado larvario alternativo, entrando a una especie de hibernación, siendo resistente al medio y al envejecimiento, a partir del cuarto estado larvario, los hermafroditas son capaces de producir espermatozoos y en el estado adulto pueden generar asimismo huevos; Los machos pueden inseminar a los hermafroditas lo que incrementa la variabilidad de sus descendientes. El tiempo promedio de este proceso es de apenas dos o tres días, y la vida promedio del adulto en el laboratorio, a una temperatura constante de 20 °C es de dos a tres semanas Fig. (4)

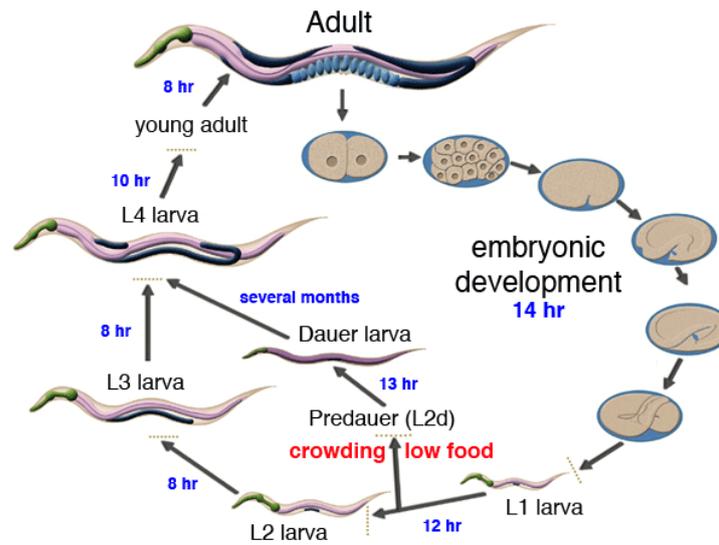


Figura 4 Ciclo de vida del nemátodo *C. elegans*

5.3.3 Alternativas no químicas de control de nemátodos gastrointestinales

Las principales alternativas al control convencional de nemátodos gastrointestinales que se encuentran en fase de desarrollo son:

- **Estrategia inmunológica:**

La vacunación contra los nemátodos gastrointestinales constituye la opción más atractiva para reducir el uso de antihelmínticos, aún sin que se haya establecido la resistencia antihelmíntica en las fincas²⁰. Un ejemplo es el antígeno H-11 que se ha utilizado para la producción de vacunas contra *H. contortus*, pero no existen suficientes estudios que demuestren la efectividad de estas vacunas, es por esto que se requiere una mayor investigación en este campo²⁹.

5.4 Control biológico

El suelo es un hábitat que aloja a una gran variedad de microorganismos de distintas poblaciones en las que se establecen asociaciones biológicas diversas que luchan por alimento y espacio³⁰. Así que, los nemátodos del suelo poseen una amplia gama de enemigos naturales que de alguna manera

actúan como agentes bio-reguladores de las poblaciones de estos en el suelo, entre ellos, se han identificado diversos organismos como micro-artrópodos, protozoos, nemátodos predadores, virus, bacterias y hongos, que utilizan como alimento a nemátodos de vida libre; así como a otro tipo de nemátodos parásitos de plantas y animales².

El control biológico se define como la identificación y el empleo de enemigos naturales para el control de las formas de vida libre de los nemátodos gastrointestinales en las pasturas y suelo, entre los cuales se encuentran los hongos nematófagos³¹. Las estrategias no químicas se encuentran en el mismo nivel de desarrollo, sin embargo, se considera que la estrategia de control biológico es quizás, hoy, la estrategia más promisoría en tanto se ha demostrado que es segura y eficiente para controlar los nemátodos gastrointestinales en las pasturas²⁰.

5.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS “SDS-PAGE”.

La electroforesis es un método analítico – semipreparativo, en el que se separan biomoléculas, teniendo en cuenta factores como su carga, desplazándose al electrodo de carga contraria y a mayor velocidad cuanto mayor es la carga de la molécula³².

Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización del monómero acrilamida y del monómero entrecruzador bisacrilamida. La polimerización se inicia con la formación de radicales libres del monómero, que se producen por radicales libres de oxígeno, por la acción de iones persulfato³³. El (TEMED) se emplean como catalizadores de esta reacción, porque causan la formación de radicales libres del persulfato. Esta reacción es fuertemente inhibida por altos niveles de oxígeno por lo que la solución debe ser desgasificada para lograr una formación de gel reproducible³⁴.

El dodecil sulfato de sodio (SDS) conocido también como lauril sulfato, es un detergente aniónico capaz de romper las interacciones no covalentes, el cual se agrega en la preparación de la muestra con un agente reductor, el

mercaptoetanol es utilizado para reducir los puentes disulfuro con el fin de desnaturalizar la proteína, uniéndose al SDS cargándose negativamente, siendo en general, la cantidad de SDS unido proporcional al peso molecular del polipéptido, pudiéndose separar estas por su masa molecular (y no por su densidad de carga) por acción de los poros del gel³⁵. Así, los complejos SDS-proteína formados se someten a electroforesis sobre gel de poliacrilamida. La dirección de la corrida es vertical descendente. Las bandas se visualizan cuando se tiñen con colorante Azul de Coomasie³³.

6. DISEÑO METODOLOGICO

Tipo de estudio: Cuantitativo, Descriptivo, Experimental

Universo: Medios de cultivo

Población: Medios de cultivo enriquecidos

Muestra: Medios de cultivo enriquecidos con extracto del modelo animal *C. elegans*

Hipótesis:

El desarrollo y mantenimiento de la actividad nematófaga de hongos nematófagos puede lograrse en un medio enriquecido con extracto de proteínas del modelo experimental *C.elegans*.

Variables:

Tabla 3. Variables e indicadores (Autores)

OBJETIVO	VARIABLE	INDICADORES
Obtener un extracto de proteínas del modelo experimental con <i>C. elegans</i> para estimular el crecimiento del hongo nematófago en el medio a desarrollar	Composición del medio de cultivo	Hongos que demuestren crecimiento con acción nematófaga
Verificar la acción antagónica de los hongos nematófagos en el medio de cultivo diseñado.	Nemátodos Temperatura Viabilidad	
Diseñar un protocolo para la elaboración de un medio de cultivo de enriquecimiento que permita el desarrollo de hongos nematófagos	Extracto de proteínas	

6.1 TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS:

Fase 1: OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE PROTEÍNAS

Preparación de medios de cultivo para reproducción y mantenimiento del nemátodo *C. elegans*

Inicialmente, se procedió a elaborar el medio NGM (Nematode growth media) con la cepa *E.coli* OP50 (Anexo 1) para *Caenorhabditis elegans*; la siembra de los nemátodos, se realizó por medio de la técnica de Plug agar (Anexo 9), que consistió en tomar el asa redonda previamente esterilizada y del cultivo primario sacar una pequeña parte del agar, que contenga nemátodos, para luego ser sembrada al medio NGM que se elaboró como se indica en la fig (5); transcurrida una semana, se obtuvo una población (n= 100 - 150) del nemátodo *C.elegans* que fue utilizada para la estimulación del hongo.



Figura 5. Preparación medio NGM (autores)

Extracción de proteínas

Se procedió a realizar 3 cultivos de nemátodos con el fin de tener un pool, en el cual por cada una de las placas de Petri se obtuvieron (n= 100 – 150) nemátodos en distintos estados larvarios.

Posteriormente, se lavó las cajas de Petri 3 veces con solución M9 con el fin de obtener (n=400 - 500) larvas del modelo experimental *C. elegans* (Anexo 2). Luego se agregó 100 µl de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.2 mM DTT, 1% Triton X-100 ,v/v; 10% glicerol, v/v) suplementado con un inhibidor de proteinasa (PMSF 1 mM), se aplicó vortex y

se dejó en hielo 10 min. Se repitió este último paso 3 veces, hasta completar en total 300 µl de buffer de lisis.

Posteriormente, la muestra se pasó por un método de ultrasonido, con el equipo *2L Jewellery Lab Digital Ultrasonic Cleaner Machine* para la lisis de las membranas del pool de nemátodos, a una temperatura de 4°C, con el fin de mantener la cadena de frío y evitar que las proteinasas se activen. El tiempo de este procedimiento fue de 2 minutos y medio (Especificaciones del procedimiento: 15sg ON; 4sg OFF hasta completar el tiempo especificado). El procedimiento se repitió dos veces. Posteriormente, se centrifugó a 11.000 x g a 4 °C durante 10 min y se separó el sobrenadante que contenía el extracto de proteínas

Una vez obtenido el extracto de proteínas, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico SDS-PAGE (Anexo 3), que permite la separación de moléculas cargadas por migración en un campo eléctrico fig. (6), con el fin de demostrar la presencia de proteínas³³.



Figura 6. Electroforesis SDS-PAGE (autores)

La electroforesis se realizó en gel de SDS-poliacrilamida 12.5% a 120 V, el gel polimerizado se colocó en una cámara de electroforesis BIORAD mini PROTEAN III y se cubrió con buffer de corrido 1X (0,25M Tris, 0,2M Glicina, 0,1% SDS pH 8,3). La muestra fue diluida con el buffer de carga Laemli, se utilizó un marcador de peso molecular de 0-100 kD y El gel fue coloreado con azul de Coomasie.

Fase 2: DESARROLLO DEL MEDIO DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO DEL HONGO NEMATÓFAGO

Toma de muestras de suelos

La muestra se recolectó realizando la técnica de muestreo sistemático en X, tomando 5 puntos diferentes del terreno en forma simétrica ³⁶ como se observa en la Fig. (7), se eliminó la cobertura vegetal y se tomó el suelo a 5 cm de profundidad, la muestra se envasó en bolsa de plástico resistente para ser identificada correctamente.

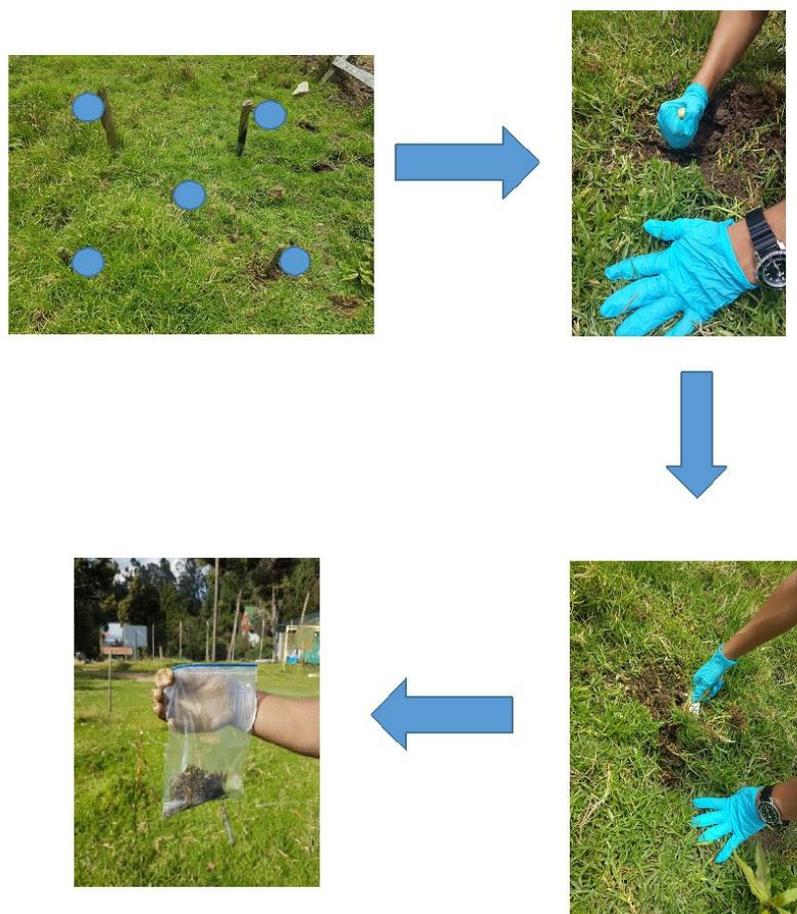


Figura 7 DIAGRAMA DE TOMA DE MUESTRA Muestreo sistemático en x (autores)

La muestra fue marcada con los datos demográficos correspondientes a los formatos correspondientes (anexo 4 y anexo 5) y su transporte se realizó en las siguientes condiciones: temperatura ambiente, libre de humedad e identificación de la muestra.

Los sitios de la toma de las muestras de suelo fueron:

1. Municipio de Fosca Cundinamarca (2 muestras de suelo en una finca a las afueras de la cabecera municipal).
2. Municipio de La Calera, Cundinamarca (5 muestras de suelo en la misma finca, que presentaba material en descomposición: (1) Materia fecal de perro, (2) Materia fecal seca de vaca, (3) Materia fecal fresca de vaca, (4) Materia fecal fresca de caballo, (5) Compost de materia fecal de caballo). En el caso de estas muestras, se levantó el estiércol y se tomó el suelo.

Preparación de los medios de cultivo para recuperar los hongos nematófagos y pruebas preliminares

Se prepararon dos medios de cultivo: agar Sabouraud (Anexo 6) medio rico en nutrientes que favorece el crecimiento del hongo, y Agar agua (Anexo 7) el cual ha sido utilizado para generar un estado de estrés al hongo por la falta de nutrientes.

Posteriormente, se sembraron las muestras recolectadas por duplicado en agar Agua 5% y en agar Sabouraud, usando el método de espolvoreo como lo realizó Barrón en 1977²¹. (Anexo 8) Los medios se incubaron a temperatura ambiente durante 8 días.

Se realizó la tinción de azul de lactofenol para la identificación del hongo mediante clave dicótoma descrita por R. C. COOKE y B. E. S. GODFREY³⁷

Posterior a la incubación del medio de cultivo, se adicionó a cada uno, aproximadamente 15 a 20 nemátodos de *C. elegans*. A los 9 días se adicionaron 30 a 40 nemátodos de *C. elegans* y se les realizó seguimiento en microscopio invertido todos los días, por 15 días, hasta observar la presencia de acción nematófaga y de las estructuras fagocitarias generadas por el micelio del hongo nematófago.

Fase 3: VERIFICACIÓN DE LA ACCIÓN ANTAGÓNICA DE LOS HONGOS NEMATÓFAGOS EN EL MEDIO DE CULTIVO DESARROLLADO

Elaboración del medio de cultivo con extracto de proteínas del modelo animal *C.elegans* y siembra del hongo *Arthrobotrys musiformis*

Se preparó el medio de cultivo agar agua al 5%, y sobre la superficie del medio se suspendió 400 ul del extracto de proteínas en diferentes concentraciones, establecidas por una concentración inicial 1/5 y dos diluciones seriadas 1/10 y 1/20 tomando como concentración inicial el extracto de proteínas obtenido de n: 200 - 500 larvas.

Posteriormente, se realizó la siembra del hongo *Arthrobotrys musiformis* por duplicado, Fig (8) mediante la técnica de Plug agar sobre el medio de cultivo. Se realizó montaje del control negativo:

Control negativo, medio de cultivo sin el extracto de proteínas, con la siembra del hongo mediante la técnica de Plug agar. Se observó a las 24 y 48 horas en el microscopio óptico en objetivo 40X, directo del medio de cultivo

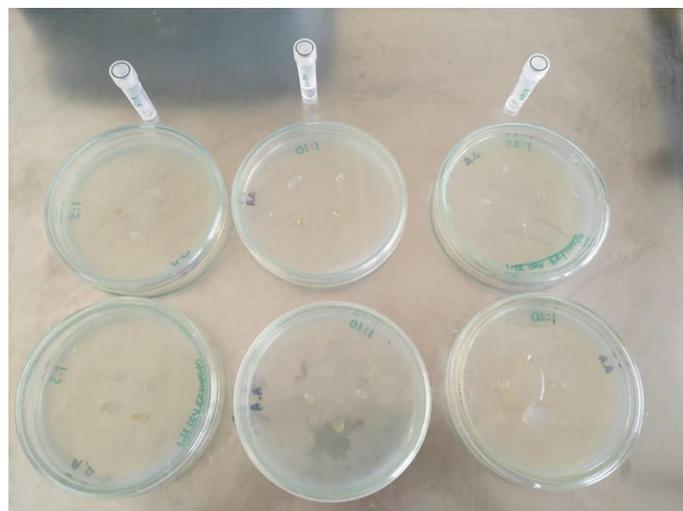


Figura 8 Siembra del hongo en los medios de cultivo con el extracto (autores)

7. RESULTADOS

Fase 1: OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE PROTEÍNAS

Realizada la ultrasonificación, se obtuvo el sobrenadante que contenía el extracto de proteínas. Fig. (9)

Posteriormente, se realizó la electroforesis utilizando gel de poliacrilamida al 12% sembrando por duplicado. Fig (10). Para ambas muestras se observan bandas de corrido entre los pesos moleculares 45-70 kDa.

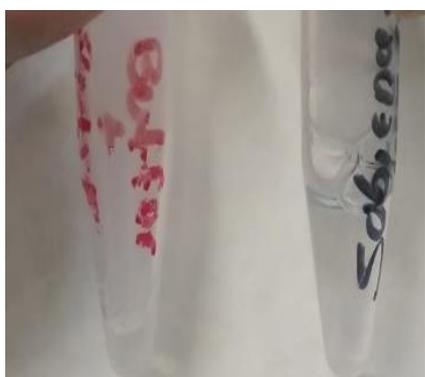


Figura 9. Extracto de proteínas (autores)



Figura 10. Corrido electroforesis SDS-PAGE (autores)

Fase

e 2: DESARROLLO DEL MEDIO DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO DEL HONGO NEMATÓFAGO.

Pruebas preliminares.

A continuación, se observan los resultados con las muestras de Fosca:

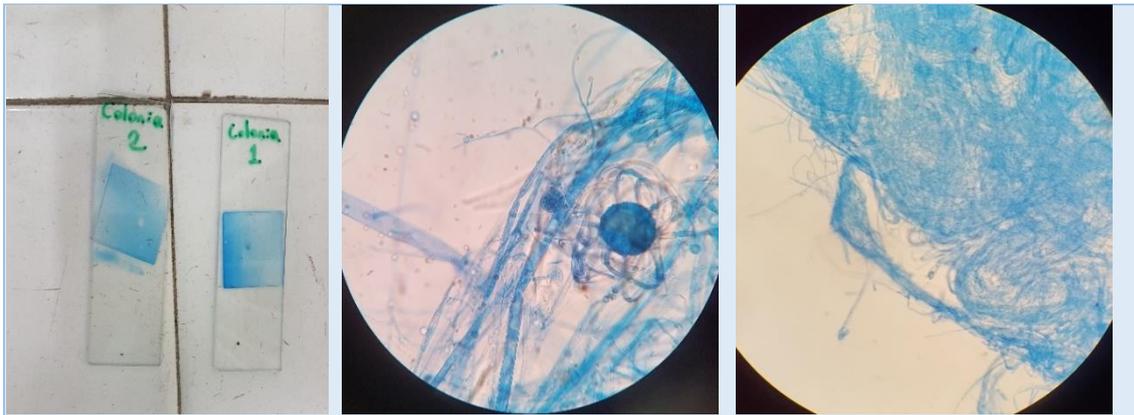
Tabla 4. Crecimiento muestras Fosca (Autores)



Figura 11 (autores) Siembra de las dos muestras de suelo de Fosca, Cundinamarca, en agar agua, en los cuales no se obtuvo crecimiento de ningún tipo de hongo



Figura 12 (autores) Se observa el crecimiento obtenido en el agar Sabouraud, a los cuales se les realizó azul de lactofenol para su identificación morfológica por medio de la clave dicótoma



A

B

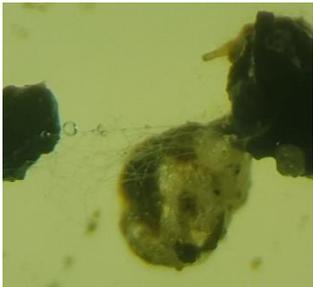
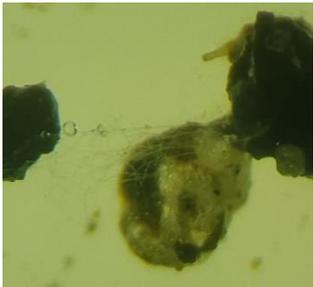
C

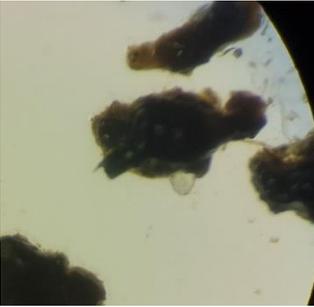
Figura (13) A. preparación B y C. Hongo estéril (Autores)

Se determinó que los hongos recuperados del agar Sabouraud no presentan características morfológicas compatibles con hongos nematófagos según clave dicotoma descrita por Cooke y Godfrey³⁸, por lo tanto, se descartan las muestras de suelo.

En la Tabla 5 se observan los resultados de la siembra de las muestras de La Calera:

Tabla 5 Descripción del crecimiento en el agar agua de las 5 muestras obtenidas en la finca de la calera (Autores)

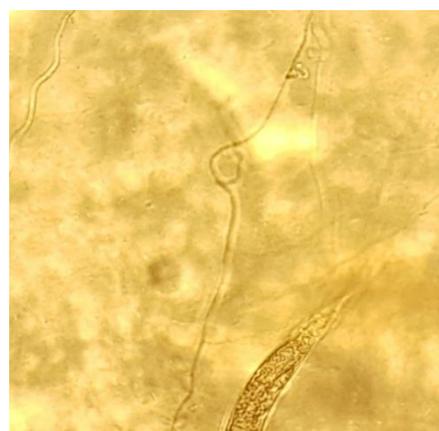
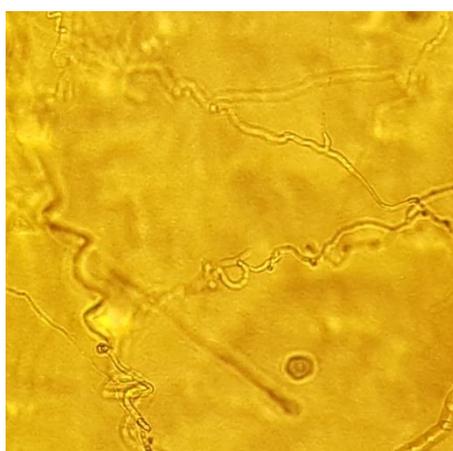
Nº muestra	Muestra	Resultado
1	 <p data-bbox="379 1630 928 1671">Figura (14) Muestra 1 calera (autores)</p>	<p data-bbox="1018 1352 1305 1429">Suelo con materia fecal seca de perro</p> <p data-bbox="995 1429 1327 1572">No se obtuvo crecimiento en el agar agua a los 8 días de ser cultivada</p>
2	 <p data-bbox="379 1980 928 2020">Figura (15) Muestra 2 calera (autores)</p>	<p data-bbox="995 1706 1321 1774">Suelo con materia fecal seca de vaca</p> <p data-bbox="995 1774 1327 1975">Se obtuvo un crecimiento mínimo el cual fue observado con la ayuda de estereoscopio, en donde se puede observar la presencia de hifas.</p>

3	Figura (16) Muestra 3 calera (autores)	<p>Suelo con materia fecal fresca de vaca Se obtuvo un mayor crecimiento del mismo hongo observado en la muestra número 2</p>
4	 <p>Figura (17) Muestra 4 calera (autores)</p>	<p>Suelos con materia fecal fresca de caballo No se obtuvo crecimiento</p>
5	Figura (18) Muestra 5 calera (autores)	<p>Compost de materia fecal de caballo Se evidencio crecimiento de hongo acompañado de contaminación por parte de estadios larvarios de la mosca</p>

Se seleccionaron las muestras de los suelos 2 y 3, debido a que presentaron crecimiento con características morfológicas y microscópicas compatibles con los hongos nematófagos, además presentaron un aislamiento puro. Las muestras 1, 4 y 5 se descartaron por contaminación y por no presentar crecimiento post incubación.

A los 15 días de incubación de las muestras seleccionadas, se observaron en el microscopio óptico, en donde hay estructuras de atrapamiento identificadas como anillos constrictores asociadas a actividad nematófaga, Ver fig. (19)

y



(20). Se evidencio que los nemátodos atrapados se encuentran con pérdida de movilidad y sin capacidad de forcejear ante la constricción que realizan las hifas. Fig. (21)

Figura 19

Figura 20

Figura (19 y 20). Anillos constrictores observados 15 días post incubacion (autores)



Figura (21). Acción nematófaga de las estructuras constrictoras sobre el nemátodo (autores)

Se le realizo tinción azul de lactofenol (Anexo 10) como se observa en la figura (22) para identificar su estructura y morfología.

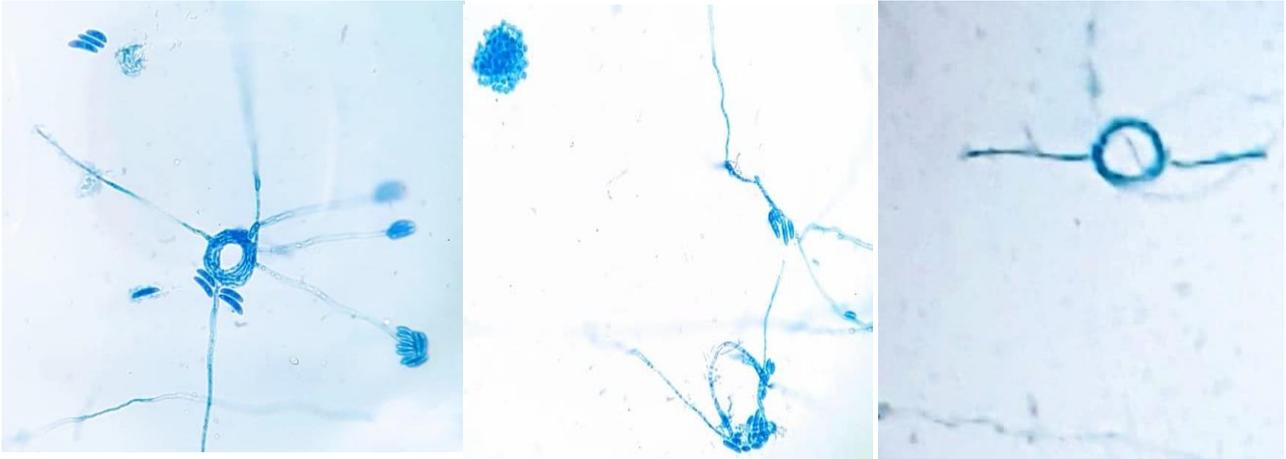


Figura (22). Morfología hongo nematófago *Arthrobotrys musiformis* en azul de lactofenol (autores)

Fase 3: VERIFICACIÓN DE LA ACCIÓN ANTAGONICA DE LOS HONGOS NEMATÓFAGOS EN EL MEDIO DE CULTIVO DESARROLLADO

Posterior a la siembra de la muestra seleccionada en el medio de cultivo desarrollado, se observó que a las 48 horas de incubación, se evidenció crecimiento de estructuras micóticas con formación de anillos constrictores compatibles con las estructuras del hongo nematófago previamente aislado.

Tabla 5. Crecimiento con dilución inicial 1/5 y diluciones seriadas 1/10 1/20 del extracto de proteínas (Autores)



Figura (23) Crecimiento en el agar con extracto del modelo experimental *C. elegans* en la dilución 1/5 (autores)

Dilución 1/5, se observó crecimiento de hifas, compatibles con el hongo aislado previamente evidenciando la formación de 2 a 3 anillos constrictores

por campo observado



Figura (24) Crecimiento en el agar con extracto del modelo experimental *C. elegans* en la dilución 1/10 (autores)

Dilucion 1/10, se observó crecimiento de hifas, compatibles con el hongo aislado previamente evidenciando la formación de 1 a 2 anillos constrictores por campo observado

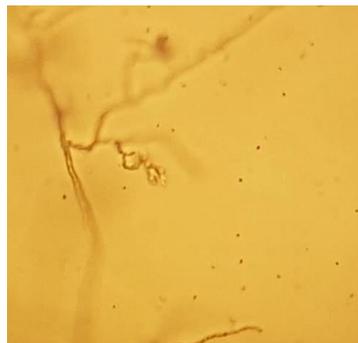


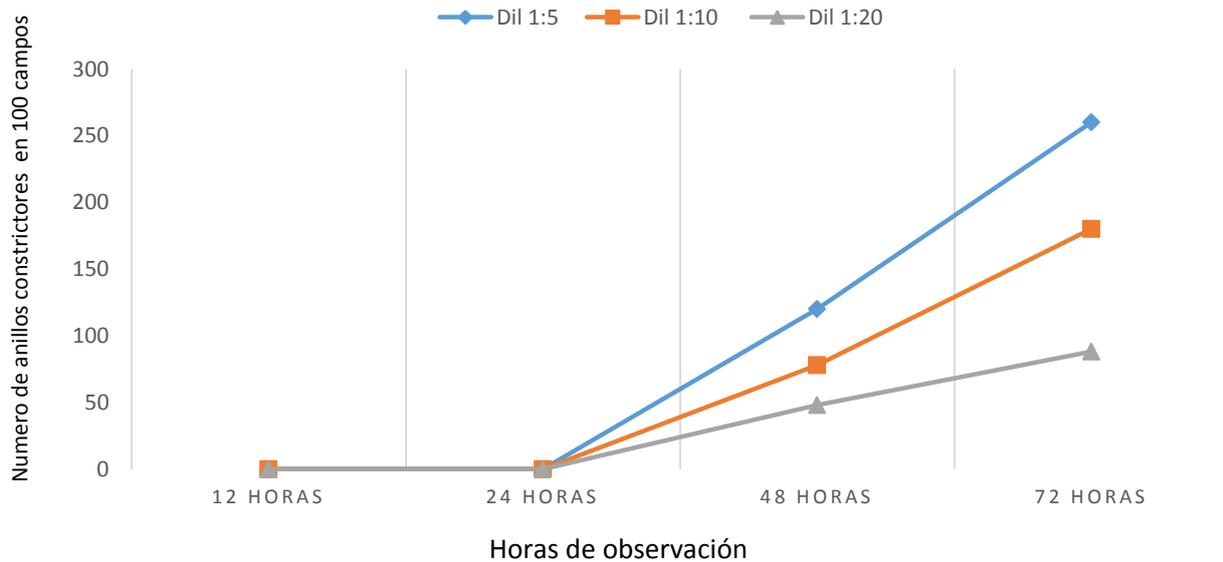
Figura (25) Crecimiento en el agar con extracto del modelo experimental *C. elegans* en la dilución 1/20 (autores)

Dilucion 1/20, se observó crecimiento de hifas, compatibles con el hongo aislado previamente evidenciando la formación de 0 a 1 anillo constrictor por campo observado

Control negativo

Figura (26) control negativo (autores).
Agar agua sin extracto de proteínas a las 48 horas de siembra (autores)

NUMERO DE ANILLOS CONSTRICTORES EN 100 CAMPOS OBSERVADOS



GRAFICA 1. Número de anillos constrictores observado en 100 campos, en objetivo 40x a las 12h, 24h y 48h y 72h después de la siembra en el agar con las diluciones 1:5, 1:10 y 1:20 del extracto de proteínas del modelo animal *C. elegans*. (Autores)

En esta grafica se indica la presencia de estructuras características de los hongos nematófagos como son los anillos constrictores, los cuales fueron observados en objetivo 40x a diferentes horas en cada una de las diluciones realizadas, de esta manera se determina que a las 12 y 24 horas aún no se podían evidenciar la presencia de anillos constrictores en ninguna de las diluciones, a las 48 horas de siembra se observa 120 anillos constrictores en la dilución 1/5, 78 en la dilución 1/10 y 48 en la dilución 1/20, a las 72 horas se observaron 260 anillos constrictores en la dilución 1/5, 180 en la dilución 1/10 y 88 en la dilución 1/20.

8. DISCUSIÓN

Los hongos nematófagos son considerados una alternativa para el control biológico; pertenecen a los microorganismos que habitan en suelos donde hay presencia de materia orgánica en descomposición, tal como, lo describe Barrón en 1979, quien evidenció el crecimiento de hifas y micelios compatibles con hongos nematófagos tomados de muestras de suelo⁸.

La interacción hongo-nemátodo se debe a diferentes estímulos, tales como, los movimientos de los nemátodos, sustancias excretadas por los nemátodos y escasez de agua y nutrientes, descrito por Nordbring-Hertz B et al en el 2006, quienes colocaron el hongo *Arthrobotrys spp.* en contacto con el nemátodo y también obtuvieron la presencia de anillos constrictores³⁸. La problemática que presenta la captura, es que el hongo solamente desencadena la morfogénesis de las hifas en presencia del nemátodo. La formación de la trampa de captura puede durar más de 12 horas, tiempo en el cual los nemátodos pueden escapar antes que las trampas funcionales sean formadas por completo.³⁹

En la primera fase del presente estudio, teniendo en cuenta el problema con la captura, se decidió utilizar un extracto de proteínas de un modelo experimental del nemátodo *C.elegans*, caracterizado por tener la típica organización de los nemátodos, compuesto por un tubo exterior (pared del cuerpo) que se compone de la cutícula, hipodermis, sistema excretor, neuronas y músculos; y el tubo interior comprende la faringe, intestino; y en el adulto, las gónadas y el aparato ovopositor. Todos estos tejidos están bajo una presión hidrostática interna, regulada por un sistema osmorregulatorio⁴⁰.

En el lavado con medio M9 en las cajas de Petri con agar NGM como se realizó en esta investigación, se encontraron huevos y larvas en diferentes fases de desarrollo, por tal motivo, en la lisis de proteínas de *C. elegans* se pueden obtener diferentes tipos de proteínas, presentes tanto en el tubo exterior como en el tubo interno de los nemátodos y de la cutícula del huevo. Tal como lo describieron Schenck et al en 1980, donde reportaron la presencia de proteínas como, el colágeno entre cruzado (80%) y otras proteínas

insolubles, que se encuentra en el tubo exterior de la membrana del nemátodo; y la quitina, que se encuentra en las cascaras de huevo de los nemátodos ⁴¹.

Con relación a la recolección de suelos con potenciales hongos nematófagos, se evidencia que la recolección de muestras de suelo realizada en el municipio de Fosca Cundinamarca, se efectuó en un suelo libre de materia orgánica, ya que en este suelo no pastaba ninguna especie animal, ni se realizaba algún tipo de agricultura, lo que explica el hecho de que no se pudiera obtener el crecimiento de hongos nematófagos Jaffee *et al.* En 1998 luego de un estudio sobre la microbiota del suelo en dos parcelas, una orgánica y otra convencional demostró que el desarrollo de hongos con capacidad nematófaga fue mayor en la parcela orgánica que en la parcela convencional⁴².

Por esta razón en los suelos recolectados en el municipio de la Calera Cundinamarca, si se evidenció crecimiento de estructuras micóticas compatibles con hongos nematófagos, ya que en estos suelos si contaba con la presencia de materia orgánica en descomposición, debido a que en el terreno se encontraban pastando vacas, caballos y habían varios perros rondando por el terreno. Los suelos recolectados en el presente estudio fueron tomados por el muestreo sistemático en X, lo que determina realizar la toma de muestra a 5 cm de profundidad, aumentando la posibilidad de encontrar en estos suelos hongos nematófagos, así como lo describe Luis López *et al* que en los primeros 30 cm de suelos agrícolas y forestales se encuentran organismos ubicuos como los hongos nematófagos y nemátodos⁴³.

Al respecto, Márquez en el 2011 describe el estímulo que le proporcionan los nemátodos a los hongos, ayudando a su crecimiento cuando se encuentra en un estado de estrés generado por el agar agua, debido a que no cuenta con ningún tipo de nutriente, haciendo que el hongo exprese sus diferentes mecanismos de acción frente a los parasitos³⁹. Por tal razón, cuando se cultivó la muestra de suelo, requirió la adición de los nemátodos, y así, se logró observar crecimiento a los 15 días de incubación

Por otra parte, como ha sido descrito en la literatura, esta interacción esta mediada por una serie de etapas: reconocimiento, adherencia, penetración y digestión⁴⁴. El primer reconocimiento que tiene el hongo con el nemátodo, se

da mediante diferentes estímulos bioquímicos, donde las proteínas como la lectina que se encuentra presente en las hifas del hongo, permiten la adhesión entre el hongo y el nemátodo. Posteriormente, el hongo es capaz de penetrar el nemátodo rompiendo su cutícula con enzimas hidrolíticas, tales como, proteasas, quitinasas y colagenasas⁴⁵.

El extracto de proteínas se corrió mediante electroforesis y se evidenció la presencia de unas bandas de corrido, lo que demuestra que el lisado por ultrasonido logro extraer las proteínas del nemátodo, tal como lo describe Bhaskara Shilesh en el 2011⁴⁶, donde verificó la integridad de las proteínas y observaron que casi toda la proteína permanecía intacta después de la sonicación, en este estudio utilizaron el método de extracción por sonicación, a diferencia del presente trabajo, donde la extracción se realizó mediante un ultrasonido; sin embargo, la literatura describe que ambos métodos tienen el mismo principio en la energía de sonido, las ondas de baja y alta presión, y tienen la capacidad de romper el material fibroso y celulítico en partículas más finas y romper las paredes de las células, lo que libera más material intracelular.

Las bandas de corrido obtenidas en la presente investigación muestran la presencia de proteínas pertenecientes a la estructura tanto interna como externa del nemátodo, que se encuentran entre un peso molecular de 1-100 kDa. Así como lo describe estudios previos, James Kramer et al en 1988 describe un gen que codifica un colágeno de la membrana de *C. elegans*, en el cual la caracterización del colágeno identificado refiere un peso molecular de 32 kDa⁴⁷, y otros estudios afirman que porciones del colágeno de la membrana de *C. elegans*, poseen un peso molecular menor a 1000 kDa, tal como lo describe, George Cox et al en 2014, quienes realizaron una caracterización de las proteínas de colágeno extraídas de la cutícula, mediante SDS-Page determinan la variedad de fracciones de colágenos que se puede encontrar en la cuticula⁴⁸.

Por tal razón, se explica porque se obtuvo un mejor resultado en la dilución 1/5, debido a que presenta una mayor concentración de proteínas y por lo tanto va a generar un mayor estímulo en el hongo, logrando que forme anillos constrictores y adicionalmente, reduciendo el tiempo de crecimiento, sin

presencia del nemátodo vivo, lo que puede significar que no solamente es necesario los estímulos a nivel de la estructura del hongo sino también son de gran importancia los estímulos bioquímicos.

En este trabajo, el hongo que se logró aislar a partir de materia fecal fresca en descomposición, fue *Arthrobotrys musiformis*, el cual, en estudios previos ha sido reportado por Carlos Saumell en el 2000, quien dijo que este hongo tiene un alto potencial como agente de control biológico, por su capacidad de soportar el estrés que le genera el tracto gastrointestinal de los rumiantes y aun así lograr mantener sus cualidades nematofagas⁴⁹. Además, otros estudios describen filogénicamente *A. musiformis* formando redes adhesivas tridimensionales y anillos simples en presencia de nemátodos, con la capacidad de desarrollar estructuras de reproducción en cantidades considerables, denominadas clamidosporas, las cuales facilitan el rápido desarrollo de colonias puras en laboratorio y por otro lado resisten los procesos digestivos de los animales tratados con esta estrategia de control biológico²³. Lo que explica el hecho de que se haya observado crecimiento de hongos nematófagos en las muestras de suelo utilizadas en el presente estudio.

El aislamiento del hongo en el agar agua con extracto de proteínas obtenidas del modelo animal *C. elegans*. Permitió potencializar la formación de las estructuras nematófagas reduciendo el tiempo de incubación a 48 horas, en las que se pudo evidenciar la formación de los anillos constrictores, mostrando que entre mayor sea la dilución mejor será el resultado obtenido, debido a que al tener una mayor cantidad de extracto se va poder hacer una mejor estimulación del hongo tal como se pudo evidenciar en el presente trabajo.

Estos resultados pueden ser útiles para poder ser probado en el futuro como una manera de poder generar biomasa en tiempos más cortos, incluso podría ser una manera de poder llevarlo a campo, donde se podría estimular los hongos que se encuentran habitando de forma saprofita en el suelo con el fin de que en el momento que el ganado elimina los parásitos en sus heces el hongo ya se va a encontrar activo y puede interrumpir el ciclo de vida del parásito y así poder reducir la parasitemia en los ganados.

9. CONCLUSIONES

- Se pudo concluir que, el extracto de proteínas de *C. elegans*, libre en el medio mejora el mantenimiento y la viabilidad del hongo, ya que se pudo realizar una nueva siembra del aislamiento inicial del hongo nematófago obtenido en agar agua, a un segundo medio con extracto de proteínas, sin que se altere su morfología ni su acción nematófaga.
- El método de ultrasonido puede ser una alternativa para la extracción de proteínas de nemátodos, en caso de no poder acceder al método de sonicación, ya que los resultados obtenidos demostraron su presencia confirmada por electroforesis.
- El extracto de proteínas obtenido del modelo animal *C. elegans* en diluciones más altas, generan un mayor estímulo para la formación de las estructuras micóticas con características nematófagas, evidenciado la formación de anillos constrictores a las 48 horas de siembra.
- Se pudo determinar que uno de los factores que favorecen a la activación de la actividad nematófaga, es el estrés en el que entra el hongo por la falta de nutrientes, por esta razón el medio de cultivo base que se usó en el proyecto fue el agar agua.
- Se pudo establecer que al tener disponibles las proteínas libres en el medio, hay una mejor interacción entre las proteínas y el hongo, potencializando la activación de sus estructuras de atrapamiento como anillos constrictores en menor tiempo, reduciendo el tiempo de crecimiento del hongo con respecto a la técnica reportada en la literatura.

10. REFERENCIAS

1. Waller JP. Coles G.C. Baue C. Anthelmintic resistance. *Vet Parasitol* 1997 septiembre. 44(2) :35-44 [Internet]. Citado el 22 de Febrero 2017. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/>.
2. Piedra Naranjo, Ricardo. Manejo biológico de nemátodos fitoparásitos con hongos y bacterias. *Tecnología en Marcha*. 2008.21 (1):123-132 Enero-Marzo 2008. [Internet]; Citado el 22 de Febrero 2017, Disponible en: http://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/viewFile/1345/1247
3. French R. Eduardo, Hebert Theodore Teddy: Métodos de investigación fitopatológica, Editorial IICA. Instituto Interamericano de ciencias agrícolas, San José, Costa Rica, 1980. 11 (2):23-35 [Internet]. Citado el 6 Septiembre 2017 Disponible en: https://books.google.es/books?id=nR8PAQAIAAJ&lpq=PA34&ots=czF_j8LYjJ&dq=mic%C3%B3logo%20Brefeld&hl=es&pg=PR4#v=onepage&q&f=false
4. López L. Borje H. Biodiversidad del suelo: control biológico de nemátodos fitopatógenos por hongos nematófagos. *Cuadernos de Biodiversidad*. 2001.8(2) Pag53-68 [Internet]. Citado el 15 julio 2017. Disponible en : https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/1152/1/cuadbiod06_3.pdf
5. Coscarelli W, Pramer D. nutrition and growth of arthrobotrys conoides. *J. Bacteriol*. 1962; *J Bacteriol* 84 (1): 60-64 [Internet]. Citado el 20 Agosto 2017 Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13881530
6. Gorantl David. Biological control of nematodes using *Paecilomyces lilacinus* in the Philipines. *Phil.Phytopath*. 1987.23:18-21. [Internet]. Citado el 22 Agosto 2017] Disponible en: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19922324549>
7. Gronvold J, Wolstrup J, Henriksen SA, Nansen P. Field experiments on the ability of *Arthrobotrys oligospora* (Hyphomycetales) to reduce the number of larvae of *Cooperia oncophora* (Trichostrongilidae) in cow pats and surrounding grass. *J. Helminthology*.1987. 10(5):65-71.

- [Internet] Citado el 25 Agosto 2017 disponible en: <https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-helminthology/article/field-experiments-on-the-ability-of-arthrotrys-oligospora-hyphomycetales-to-reduce-the-number-of-larvae-of-cooperia-uncinaria-trichostrongylidae-in-cow-pats-and-surrounding-grass/40054C08CA09A791C3B9EB1780C4CC10>
8. Baron G. Observations on predatory fungi. Canadian Journal of Botany. 1979; 5(2): 187-193 [Internet]. Citado el 25 Agosto 2017 Disponible en: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/pdf/10.1139/b79-028>
 9. Bucaro R. Hongos nematófagos de el salvador. Biol. Trop.1983; 3 1(1): 25-28, [Internet]. Citado el 25 Agosto 2017] Disponible en: <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/rbt/article/view/25099/25349>
 10. Larsen M. Biological control of helminths. El silver; 1999 jun;29 (1): 139-146 [Internet]. Citado el 30 Agosto 2017 Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751998001854?via%3Dihub>
 11. Flores J, Herrera D, Vázquez V, Martínez C, Mendoza P. Capacidad nematófaga de dos cepas del hongo Duddingtonia flagrans desarrollada en harina de maíz-agar. Vet. Mex. 1999. 30(2):199-203, [Internet]. Citado el 25 Agosto 2017. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/vetmex/vm-1999/vm992k.pdf>
 12. González R, Mendoza P, Torres G, Becerril C, Ortega E, Hernández O. Estudio in vitro de la capacidad depredadora de Duddingtonia flagrans contra larvas de nemátodos gastrointestinales de ovinos de pelo. ODOS Téc Pecu Méx .Med vet.2005. 31: 47-55 [Internet]. Citado el 1 septiembre 2017. Disponible en: <http://www.redalyc.org/html/613/61343310/>
 13. Orozco M, Álvarez V, et al. In vitro assessment of nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes of ruminants. MVZ. 2009 Cordoba; 14(3): 56-61. [Internet] Citado el 3 septiembre 2017. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-02682009000300006

14. Aguilar-Caballero, A., Torres-Acosta, J., Cámara, Sarmiento R., Hoste, H., Sandoval-Castro C. Immunity against gastrointestinal nematode: the gat history. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 2008. 9, 73-82. [Internet]. Citado el 5 septiembre 2017. Disponible en: <https://www.researchgate.net>
15. Arias Maria, Filipa Cristiana, López Ivan, Pineiro Pablo. Trematodes enhance the development of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys (Duddingtonia) flagrans*. *Elsevier*. 2013; 117(7): 540-544. [Internet] [Citado el 9 septiembre 2017]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878614613000895>
16. Li Juan, Zou Chenggang, Xu Jianping, Ji Xinglai, Niu Xuemei, Yang Jinkui, Huang Xiaowei, and Zhang Ke-Qin, Molecular Mechanisms of Nematode-Nematophagous Microbe Interactions: Basis for Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes. 2015. 53: 67-95 [Citado el 8 agosto 2018]. Disponible en pdf: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-phyto-080614-120336>
17. Ping Hsueh Yen , Gronquist Matthew R, Schwarz Erich M, David Nath Ravi, Han Lee Ching, Gharib Shalha, Schroeder Frank C, W Sternberg Paul, Nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora* mimics olfactory cues of sex and food to lure its nematode prey. 2017. *elife*. 6: 12-15; . [Citado 8 Agosto 2018] Disponible en: <https://elifesciences.org/articles/20023>
18. Arteaga paredes maria belen. determinación del potencial nematicida y nematostático in vitro de *pleurotus ostreatus* (agaricales: pleurotaceae) sobre larvas j2 de *globodera pallida* (tylenchida: heteroderidae). Pontificia universidad católica del ecuador facultad de ciencias exactas y naturales escuela de ciencias biológicas. Quito 2018. [Citado 01 Agosto 2018] [Internet]. <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/14678/Tesis%20Bel%C3%A9n%20Arteaga.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
19. López Tévez, Leonor; Torres, Carola. MEDIOS DE CULTIVO Universidad Nacional del Nordeste. FACULTAD DE AGROINDUSTRIAS [Internet]. Microbiología General- Carrera

- Farmacia 2006. [Citado 23 octubre 2017] 2017 Disponible en:
<http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp4.pdf>
- 20.** Gonzales Osorio Elsa Victoria, Evaluacion In vitro de hongos nematófagos sobre larvas L3 de nemátodos gastrointestinales de bovinos, Enfasis Biotecnología agrícola e industrial, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de ciencias, Programa de posgrado, Maestría en ciencias biológicas, [Internet], Enero 2013, [Citado 23 octubre 2017]. Disponible en:
<https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/9802/GonzalezOsorioElsaVictoria2013.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- 21.** Barron GL. The nematode destroying fungi .Topics in Mycobiology No.1 Canadian Biological publications . 1977. P140. [Citado 15 Abril 2018] Disponible en:
<http://www.redalyc.org/pdf/4499/449945024013.pdf>
- 22.** Pedraza Walter.EVALUACIÓN IN VITRO DE HONGOS NEMATÓFAGOS EN ZONAS ARROCERAS DE COSTA RICA CONTRA EL NEMÁTODOS AGALLADOR.Agronomía Costarricense 38(2): 19-32.[Internet] 2014, [Citado 27 Abril 2018] Disponible en :
<http://www.redalyc.org/pdf/436/43632676002.pdf>
- 23.** Flórez Castañeda, Diana Catherine, Evaluación del potencial nematófago de los hongos *Arthrobotrys musiformis* Y *Arthrobotrys oligospora* en bovinos, UNIVERSIDAD DE LA SALLE Facultad de Ciencias Agropecuarias Programa de Medicina Veterinaria, 2015, [Citado 22 de Agosto 2018] Disponible en pdf:
<http://repository.lasalle.edu.co/handle/10185/18214>
- 24.** Vásquez Y, Morales G, Pino A, De Moreno L, De Combellas J. Cronobiología de la emisión de huevos de estrongilos digestivos en ovinos infectados en condiciones naturales. Zootec Trop 2001; 19(supl 1):279-287, [Citado 6 Junio 2018]
- 25.** Morales Adilio. prospección de nemátodos fitoparásitos de cebolla y su relación con *fusarium oxysporum* f. sp cepae en el valle de asunción mita, jutiapa. facultad de ciencias ambientales y agrícolas. universidad rafael landívar.2017 11:279-287. [Internet] [Citado 10 enero 2018] Disponible

- <http://recursosbiblio.url.edu.gt/tesisjcem/2017/06/03/Morales-Adilio.pdf>
26. Sijmons C. Peter, Plant-nematode interactions, Plant Molecular Biology 199323: 917-931. [Internet] [Citado 2 febrero 2018] Disponible en: <https://www.semanticscholar.org/paper/Plant-nematode-interactions-Sijmons/d3f1b0bda539faabea2c6bae5614c12211455e4c>
 27. Estela, González Rosa, Navarro Herrera, Flores Rosas, Riveros Peinado, Sosa Contreras, Vázquez Bioquímico, EL NEMÁTODO *Caenorhabditis elegans* COMO MODELO DE ESTUDIO DEL DESARROLLO. 2003 [Citado 17 febrero 2018]
 28. COLLEGE OF BIOLOGICAL SCIENCES. [Internet]. Missouri: Universidad de Minnesota;1992. 7(2):15-27. [Citado 28 Abril 2018] Disponible en: <https://cbs.umn.edu/cgc/home>
 29. barettino ana. estudio en *C. elegans* del papel de los genes de la vía de apoptosis como mediadores de longevidad. universidad politecnica de valencia. 2014. 3(1):5-9. [Internet] [Citado 7 junio 2018] Disponible en: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/53253/BARETTINO%20-%20Estudio%20en%20C.%20elegans%20del%20papel%20de%20los%20genes%20de%20la%20v%C3%ADa%20de%20apoptosis%20como%20mediadores%20d....pdf?sequence=4>
 30. Cuéllar Ordaz, Alfredo, control no farmacológico de parásitos en ovinos. nemátodos gastroentéricos, departamento de ciencias biológicas, facultad de estudios superiores cuautitlán, universidad nacional autónoma de México, 2007. 4(1):43-56.] [Citado 7 junio 2018] Disponible en : http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/parasitarias/parasitarias_ovinos/02-cuellar.pdf
 31. Bonilla Correa Carmen Rosa, Gómez López Eyder Daniel, Sánchez de Prager Marina, El suelo: Los organismos que lo habitan, Instituto de estudios ambientales- IDEA, Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira, 2002. . 1:2-28.[Citado 9 junio 2018] Disponible en pdf: http://www.uneditorial.net/uflip/El-suelo-los-organismos-que-lo-habitan/pubData/source/El-suelo-los-organismos-que-lo-habitan_Uflip.pdf
 32. García Corredor Diego, Pulido Medellín Martín, Díaz Anaya María,

- Uso de hongos nematófagos en el control biológico de nemátodos gastrointestinales en ovinos, Revista LOGOS CIENCIA & TECNOLOGÍA, 2016, .[Citado 9 junio 2018] .Disponible en pdf: file:///C:/Users/Lina%20Gomez/Downloads/236-1180-2-PB.pdf
- 33.** García Pérez Hilda Marilín. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. LABORATORIOS BETERÁ. UNIV DIAG 2000;1(2):31-41. [Internet], Enero 2013, [Citado 9 junio 2018] [Citado en: 13 de Abril 2017]. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/uni/vol1_2_00/uni07200.pdf
- 34.** Pérez María,Santos Jorge,Diaz Lourdes. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS como herramienta en el estudio de las proteínas miofibrilares. Una revisión.NAcameh.2015. 9, (2): 77-96. [Internet], [Citado en: 28 de Abril 2017]. Disponible en: http://cbs.izt.uam.mx/nacameh/v9n2/Nacameh_v9n2_077_PerezCh-et al.pdf
- 35.**Chávez Planes MA,Díaz Brito J, Pérez U, Delfín J. Temas de enzimología. Facultad de Biología Universidad de La Habana, 1990. [Internet], [Citado en: 28 de noviembre 2017]Disponible en: http://www.bvs.sld.cu/revistas/uni/vol1_2_00/uni07200.htm?iframe=true&width=95%&height=95%
- 36.**Da Woon J, Gyoung Hoon T, Jin Wook L, Chan Jin B, Gil Young K, Gyurng Soo Y, y Jung Kap C.Detection of proteins in poliacrilamida gels using eriochrome black T rhodamina B. Anal. Biochem.1998; 263:118-120. [Internet], [Citado en: 28 de enero 2018]Disponible en: <http://www.invernus.uson.mx/revistas/articulos/14-Soto%20y%20Col%2020131.pdf>
- 37.**COLLEGE OF BIOLOGICAL SCIENCES. [Internet]. Missouri: Universidad de Minnesota; c 1992. [Citado 2017 Abr 28] Disponible en: <https://cbs.umn.edu/cgc/home>.
- 38.**R. C. COOKE. B. E. S. GODFREY. A KEY TO THE NEMATODE-DESTROYING FUNGI. Trans. Brit. mycol. Soc. 1964. 47 (1), 61-74 [Citado 2017 Abr 28] Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0007153664800814>

39. Nordbring-Hertz B, Hans-Börje J, Tunlid A. Nematophagous Fungi. Encyclopedia of life sciences 2006; doi: 10(10):38. [Internet]. [Citado 23 febrero 2018]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1038/npg.els.0004293>.
40. Márquez Lara D, Patiño Burbano RE, Cubides Cárdenas JA, Montero Acero K, Díaz Sabogal D, Gómez Sánchez Y. Capacidad pre-dador in vitro de hongos nematófagos nativos de Cundinamarca sobre nematodos gastrointestinales de bovinos. Rev Med Vet. 2015;(31):47-55. Tomado de [Internet]. [Citado 23 febrero 2018]. Disponible en: <http://revistas.lasalle.edu.co/index.php/mv/article/view/3708/2907>
41. John Stansberry, Eric J. Baude, Merritt K. Taylor, Pei-Jiun Chen, Suk-Won Jin, Ronald E. Ellis, Michael D. Uhler. A cGMP-dependent protein kinase is implicated in wild-type motility in *C. elegans*. 20001 [Citado el 12 de agosto de 2018]. [Internet]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1471-4159.2001.00131.x>
42. Schenck S, Chase T, Rosenzweig W, Pramer D. producción 1980. La colagenasa por hongos de nemátodos que atrapan. Appl. Rein. Microbiol. 40: 567-70 [Internet]. Citado el 12 de agosto de 2018. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99652005000100012
43. Jaffee, B. A., Ferris, H. Y Scow, K. M., 1998. Nematode-trapping fungi in organic and conventional cropping systems. ;(21):5-15 [Internet], [Citado el 22 de agosto 2018] disponible en pdf: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18944958>
44. Lopez Luis, Hansson Hans, BIODIVERSIDAD DEL SUELO: CONTROL BIOLÓGICO DE NEMÁTODOS FITOPATÓGENOS POR HONGOS NEMATÓFAGOS, UNIDAD DE DIAGNÓSTICO Y CONTROL BIOLÓGICO DE ENFERMEDADES VEGETALES. CIBIO, ;(9):55 [Internet], [Citado 23 de Agosto 2018] Disponible en pdf: https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/1152/1/cuadbiod06_3.pdf
45. Nordbring-Hertz B, Hans-Börje J, Tunlid A. Nematophagous Fungi. Encyclopedia of life sciences 2006. Citado el 12 de agosto de 2018. [Internet]. [Citado 23 de Agosto 2018] Disponible en pdf:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1038/npg.els.0004293>.

46. Dong L, Zhang K. 2006. el control microbiano de los nemátodos parásitos de plantas: a cinco partes interacción. *Planta Suelo* 288: 31-45 Citado el 12 de agosto de 2018. [Internet]. [Citado 13 de julio 2018] Disponible en pdf: <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/150792/Evaluacion-de-formulaciones-de-rizobacterias-sobre-el-parasitismo-de-nemátodos-en-vides-sobre-suelo-naturalmente-infestado.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
47. Shylesh Bhaskaran , Jeffrey A. Butler , Sandra Becerra , Verónica Fassio , Milena Girotti y Shane L. Rea .Breaking *Caenorhabditis elegans* La forma más fácil de usar el homogeneizador Balch: una herramienta antigua para una nueva aplicación. *Anal Biochem.* 2011 June 15; 413(2): 123–132. Citado el 12 de agosto de 2018. [Internet]. [Citado 18 de julio 2018] Disponible en pdf:
48. Kramer James, Johnson Jeffrey J. , Edgar Robert, Basch Corrine , Roberts Sara, The *sqt-1* gene of *C. elegans* encodes a collagen critical for organismal morphogenesis, *Laboratory for Cell, Molecular, and Developmental Biology University of Illinois*, 27 September 1988 [Citado 22 de Agosto 2018] Disponible en pdf: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0092867488902140>
49. COX GEORGE, KUSCH MEREDITH , EDGAR ROBERTS. Cuticle of *Caenorhabditis elegans* : Its Isolation and Partial Characterization, *Thimann Laboratories, Division of Natural Sciences, University of California, Santa Cruz*, December 30, 2014, [Citado el 22 de agosto 2018] Disponible en pdf: <http://jcb.rupress.org/content/90/1/7>
50. Saumell CA, Padilha T. Influence of weather and time of deposition on sheep faeces colonization by nematophagous fungi in the Mata Region of Minas Gerais State, Brazil. *Appl. Soil Ecol.* 2000, 14: 63-70. Citado el 12 de agosto de 2018. [Internet]. [Citado 23 de Agosto 2018] Disponible en pdf: <http://www.vet.unicen.edu.ar/ActividadesCurriculares/ParasitologiayEnfermedadesParasitarias/images/imag/Plantillas/Plantilla%20Carlos%20Saumell.pdf>.

11. ANEXOS

ANEXO 1 Composición medio NGM

COMPONENTE	CANTIDAD
Agua	500 mL
NaCl	1.5 gr
Agar	8.5 gr
Peptona	1.25 gr
CaCl ₂ 1M	0.5 mL
Colesterol en etanol	0.5 mL
MgSO ₄ 1M	0.5 mL
Buffer KPO ₄ 1M	12.5 mL

PREPARACIÓN DE MEDIO NGM

1. Adicionar en un Erlenmeyer de 500 mL, 200 mL de agua destilada.
2. Agregar 1,5 g de NaCl en constante agitación y calor.
3. Adicionar 8,5 g de agar y 1,25 g de peptona. Completar a 500 mL con 300 mL de agua destilada.
4. Autoclavar.
5. Sumergir el Erlenmeyer en una tina de agua destilada fría. Dejar en reposo hasta que se encuentre tibio.
6. Agregar a la solución 0,5 mL de CaCl₂ 1M.
7. Agregar 0,5mL de colesterol en etanol.
8. Agregar 0,5 mL de MgSO₄ 1M.
9. Agregar 12,5 mL de Buffer KPO₄ 1M. (108,3 g KH₂PO₄, 35,6 g K₂HPO₄ en 1L de H₂O)
10. Mezclar bien y servir en placas de Petri.

ANEXO 2 Composición y preparación del buffer M9

Formula base del buffer m9, formula aproximada por litro.

Na ₂ HPO ₄	6 grams/L
KH ₂ PO ₄	3 grams/L
NaCl	5 grams/L
MgSO ₄	0.25grams/L
H ₂ O	1 L

Instrucciones de preparación.

1. Disuélvanse 3 g de KH_2PO_4 , 6 g de Na_2HPO_4 y 5 g de NaCl en 1 L de H_2O .
2. Autoclave por 20 min.
3. Agregue 1 ml de MgSO_4 1M.
4. Almacenar a temperatura ambiente. después de 2 semanas, verifique la contaminación visible antes de su uso.

ANEXO 3 Elaboración de la electroforesis SDS PAGE

MATERIALES Y REACTIVOS

- Fuente de electroforesis.
- Baño de incubación
- Cubeta de electroforesis con cristales, peines y separadores.
- Formador de geles
- Pipetas
- Solución de acrilamida/bisacrilamida: Contiene 30 % acrilamida + 0.8 % bisacrilamida preparada en agua destilada
- Disolución de SDS: 10 % en agua destilada
- Disolución de persulfato amónico: 100 mg/mL en agua destilada • TEMED (solución comercial)
- Tampón del gel separador: Tris 1M; pH = 8,8
- Tampón del gel acumulador: Tris 0,5 M; pH = 6,8
- Tampón de Ruptura 5X que contiene: 2,5 ml de solución de SDS 10%; 0,2 ml de 2-mercaptoetanol; 0,5 ml de azul de bromofenol 0,05%; 0,3 ml de tampón de electroforesis; 1 ml de glicerol y 0,5 ml de Tris 0,5 M pH 6,8.
- Tampón de electroforesis: contiene 14,4 g/l de glicina, 3 g/l de Tris (base) y 10 ml/l de SDS 10%.

- Marcadores preteñidos de peso molecular

PROCEDIMIENTO PARA LA ELECTROFORESIS EN SDS – PAGE

MONTAJE DEL SISTEMA DE ELECTROFORESIS

Se utilizará un gel plano de 1,5 mm de grosor.

- Montar el “sandwich” con dos placas de vidrio (uno tiene un rebaje) y los dos “separadores” en vertical entre ellas y a ambos lados.
- Introducirlo en el soporte formador de geles. Sujetar el conjunto.
- Se empleará un gel separador con un 7,5 % de acrilamida y un gel acumulador con un 4,8% de acrilamida. Los geles se preparan mezclando, en un vaso de precipitados, los componentes indicados en la tabla (el persulfato y el TEMED inician la reacción de polimerización, por lo que se deben añadir en último lugar) y rápidamente proceder al llenado con la mezcla (las cantidades indicadas dan para dos geles). La solución de acrilamida/bisacrilamida se debe utilizar con guantes y pipetear con propipeta. Primero se polimeriza el gel separador (ver tabla). Para ello se rellena, con la mezcla todavía líquida, el espacio entre las dos placas hasta unos 3 cm del borde superior del cristal corto, usando una pipeta pasteur. Añadir encima una pequeña cantidad de agua destilada (esto hace que la superficie del gel quede recta). Esperar a que polimerice el gel (entre 30 y 60 min, observar la mezcla sobrante en el vaso). Volcar para retirar el agua destilada. Secar con un papel de filtro. Añadir sobre este gel separador la mezcla (ver tabla) del gel “acumulador” y antes de que polimerice introducir en la parte superior el “peine”, que formará en el gel acumulador los pocillos para luego poder aplicar las muestras. Se guarda el gel en la cámara fría hasta el día siguiente.

SEPARACION DE LAS PROTEINAS POR SDS-PAGE PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Una vez polimerizado el gel concentrador se aplica la muestra.

- Las muestras deben de contener una masa proteica en torno a 24-30 µg. Como todas las muestras tienen que tener la misma cantidad de

Gel separador (7,5%)

Gel concentrador

proteína, se toma el volumen que se necesite de cada una de las proteínas problema.

- Para ello, se toman 24 μ l de la solución con la proteína problema y se añade a la muestra tampón de ruptura 5X en una relación 4:1 (volumen:volumen) (por tanto, 6 μ l).
- Utilizar un tubo con 10 μ L de patrones preteñidos de peso molecular conocido. Esta mezcla ya contiene el tampón de ruptura.
- Los patrones preteñidos contienen las siguientes proteínas. Se recoge el peso molecular aparente. Proteína patrón preteñida Peso molecular aparente (daltons) Miosina 198.840 β -Galactosidasa 115.700 Albúmina sérica 96.740 Ovoalbúmina 53.540 Anhidrasa carbónica 37.130 Inhibidor de tripsina 29,130 Lisozima 19.540 Nota: El peso molecular aparente de la proteína patrón preteñida no se corresponde con el peso molecular real de la proteína utilizada.
- Mantener las muestras durante 5 minutos a 100 °C. Centrifugar los tubos a baja velocidad durante un minuto para concentrar toda la muestra en el fondo del tubo.
- Retirar con cuidado el peine al gel preparado el día anterior. Sacar del formador de geles el "sandwich" de placas de vidrio, separadores y gel y sujetarlo en vertical en la cubeta de electroforesis.
- Llenar las cámaras superior e inferior de la cubeta de electroforesis que contienen los electrodos con tampón de electroforesis, de modo que entre en contacto con ambos extremos del gel.
- Se aplican las muestras y los patrones de peso molecular en los pocillos del gel, usando micropipetas con puntas finas.
- Se completa cada pocillo con tampón de ruptura 1X preparado diluyendo el tampón de ruptura 5X en tampón de electroforesis. Se añade al pocillo.
- Es conveniente anotar el orden de aplicación de las muestras, así como identificar el gel en el que están las muestras que corresponden a cada taquilla.

Agua destilada 12 mL	Agua destilada 5,8 mL
Acrilamida/Bisacrilamida 6,25 mL	Acrilamida/Bisacrilamida 1,65 mL
Tris 1 M pH 8,8 6,25 mL	Tris 0,5 M pH 6,8 2,5 mL
SDS 10% 250 μ L	SDS 10% 100 μ L
TEMED 12,5 μ L	TEMED 6,5 μ L
Persulfato amónico (100 mg/1 ml) 200 μ L	Persulfato amónico (100 mg/ 1 ml) 94 μ L

DESARROLLO DE LA ELECTROFORESIS

- Conectar los cables de la cubeta a una fuente de corriente continua (comprobar la polaridad: rojo (+), negro (-)).
- Aplicar 80 V hasta que el frente (visible por la banda azul de bromofenol) entre en el gel separador; después subir a 120 V.
- Cuando el frente, se acerca al extremo inferior del gel, desconectar la corriente y sacar el sándwich (tarda aproximadamente una hora y cuarto).
- Separar las placas de vidrio con ayuda de una espátula y sacar el gel (usar guantes para evitar tocar el gel con los dedos) con cuidado de no invertir su orientación.
- Una vez finalizada la transferencia, se tiñe el gel de electroforesis mediante su inclusión en solución de tinción que contiene Azul de Coomassie, ácido acético, metanol durante 2 horas a temperatura ambiente.
- Posteriormente, se pasa el gel a solución de desteñir que contiene ácido acético 10% y metanol 10% en agua, destiñendo el gel durante toda la noche.

ANEXO 4 Marcación de las muestras de Fosca

Tipo de muestra: Suelo

Lugar de la toma de muestra: Coordenadas latitud 4.34,-
longitud 73.93 kilómetro 1 fosca Bogotá

Fecha de la recolección: 1 octubre 2017

Dueño de la propiedad: Arturo Quevedo Acosta

Profesional: Nicolas Garay U.

ANEXO 5 Marcación de las muestras de la Calera

Tipo de muestra: Suelo
Lugar de la toma de muestra: Kilómetro 5.5 vía La Calera Cundinamarca
Fecha de la recolección: 27 febrero 2018
Dueño de la propiedad: Cabalgatas Bonanza
Profesional: Nicolas Garay U.

ANEXO 6 Composición medio Sabouraud

COMPONENTES
Peptona
Glucosa
Agar
pH 5,6 25°C

1. Agregar 65g a 1 litro de agua destilada.
2. Llevar a ebullición para disolver por completo.
3. Esterilizar en autoclave a 121 ° C durante 15 minutos.
4. Mezcle bien y servir en placas de Petri estériles.

ANEXO 7 Composición agar agua

COMPONENTES
Agua destilada
Agar

1. Agregar 5 gr de agar en 1 litro de agua destilada

2. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos
3. Mezclar bien y servir en placas de Petri estériles

ANEXO 8 Técnica de siembra de suelo por espolvoreado en placa

La técnica consiste en tomar cada una de las muestras de suelos obtenidas previamente y con ayuda de un filtro tamizar la misma de tal modo que se logre deshacer todo los grumos que pueda presentar la muestra de suelo, posteriormente se toma aproximadamente 1g de muestra con un guante y sobre el agar agua se va dejando caer pequeñas cantidades de tierra hasta que se logre tener un buen recubrimiento de la muestra sobre todo el agar.

ANEXO 9 Técnica plug de agar

Tomar un asa redonda, esterilizarla con ayuda de un mechero. Posteriormente se procede a observar la caja de Petri con agar NGM donde se tiene el cultivo de los nemátodos con un estereoscopio y en aquellas zonas donde hay mayor presencia de nemátodos se procede a tomar la asa previamente esterilizada y de forma vertical se hace una perforación en el medio, con el fin de coger la parte en donde hay mayor presencia del nemátodo, posteriormente se procede a pasar el trozo que se quitó del agar a un nuevo medio que no tiene presencia de nemátodos, este proceso se debe hacer cuatro veces con el fin de conseguir 4 botones que se deben colocar en diferentes partes del agar.

ANEXO 10. Tinción de azul de lactofenol.

Es una tinción para observar hongos, se clasifica como una tinción simple, debido a que toda la muestra se tiñe del mismo color y se utiliza un sólo colorante. El azul de lactofenol tiene unas funciones importantes a la hora de observar hongos, las cuales son:

1. El fenol destruye la flora acompañante
2. el ácido láctico conserva las estructuras fúngicas al provocar un cambio de gradiente osmótico con relación al interior del fúngico generando una película protectora.

3. El azul de algodón tiene la capacidad de adherirse a las hifas y conidios de los hongos microscópicos

Composición:

- Alcohol metílico
- Azul de algodón acetico
- Agua destilada 250 mL
- Alcohol al 96%
- Xilol

Procedimiento

1. Seleccionar las colonias para realizar las improntas.
2. Cortar segmentos de cinta adhesiva transparente aproximadamente de 1 cm².
3. Pegar los segmentos de cinta en un asa micológica.
4. Poner una gota de azul de lactofenol en el portaobjetos.
5. Con el lado adhesivo de la cinta, tocar la parte superior de hongo.
- 6 Colocar la cinta sobre la gota de azul de algodón y poner otra gota de azul de algodón.
7. Poner un cubreobjetos sobre la preparación.
8. Observar en 40x