



EVALUACIÓN DE *Bacillus* sp COMO POSIBLE CONTROLADOR BIOLÓGICO DE *Fasciola hepatica* EN OVINOS *in vitro*

Presentado por:

Lorena Alejandra Ramírez Morea
María Angélica Sainea Lancheros

Asesor Externo

Jimmy Jolman Vargas Duarte Ph.D

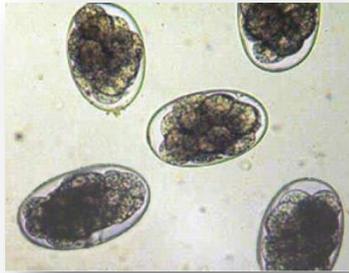
Asesor Interno

Ligia Consuelo Sánchez Leal MSc

**UNIVERSIDAD COLEGIO
MAYOR DE CUNDINAMARCA**

Introducción

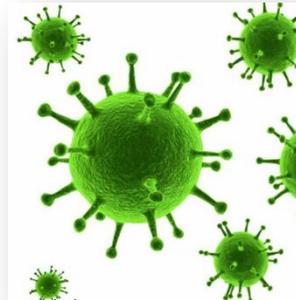
CONTROL BIOLÓGICO



Nemátodos

Tomada de: https://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=157&Itemid=237

Ectoparásitos



Tomado de: <http://www.misistemainmune.es/los-virus>

Virus

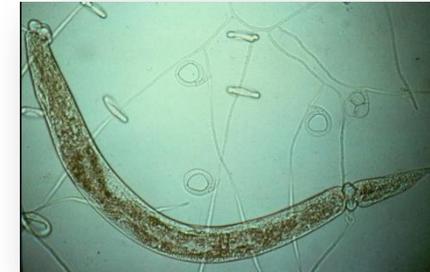
Depredadores

Hongos



Tomada de: <https://atlasmicologia.blogspot.com/2016/04/>

Hongos nemátofagos



Tomado de: <http://nema-agris.blogspot.com/2011/12/hongos-nematofagos-como-alternativa.html>

Tremátodos



Tomada de: <http://munagropecuario.blogspot.com/2016/08/los-artropodos-son-los-invertebrados.html>

Artropodos

Acaros



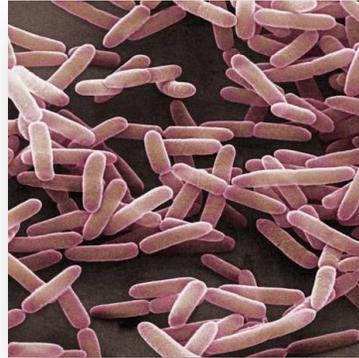
Tomado de: <https://www.thoughtco.com/ants-bees-wasps-order-hymenoptera-1968095>

Parasitoides

Plantas

Bacillus

Biomasa con
producción de
endospora



http://www.allposters.es/-sp/Bacillus-Subtilis-is-a-Rod-Shaped-Gram-Positive-Bacteria-SEM-Posters_i9006275_.htm

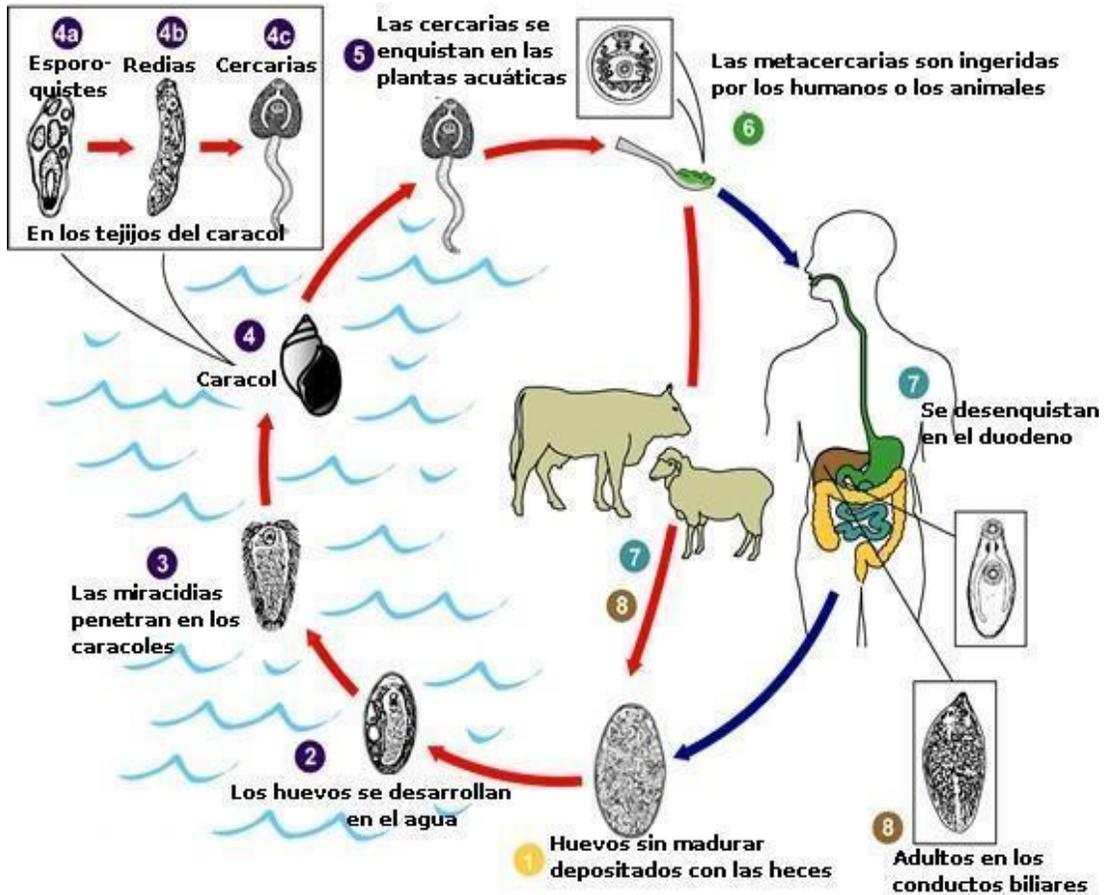
Biomasa
quitinolítica

Bacillus
pumilus

Bacillus
sphaericus

Bacillus
subtilis

Fasciola hepatica



Fasciolosis se ha estimado en 52 millones de euros. Antihelmínticos 400 millones de euros

Resistencia antihelmínticos

Triclabendazol (TCBZ) y Albendazol

Objetivos

Determinar el efecto que produce la biomasa quitinolítica y la biomasa con capacidad de producción de endosporas de *Bacillus* sp. sobre huevos de *Fasciola hepatica in vitro*.

OBJETIVO GENERAL
Evaluar la acción de *Bacillus* sp. como controlador biológico sobre huevos de *Fasciola hepatica* en ovinos *in vitro*.

Establecer las condiciones para la producción de biomasa bacteriana quitinolítica y biomasa con producción de endospora terminal a partir de *Bacillus* sp.

Antecedentes



<https://informacionimagenes.net/imagenes-de-banderas-del-mundo-america-europa-africa-asia-y-oceania/>

En **2013** Uribe N, Garcia C, describen Fasciolosis como una zoonosis emergente y reemergente. Reportada en África, Asia, Oceanía, Europa y America

2.4 – 17 millones de personas afectadas.
180 millones de personas en riesgo de adquirirla.

En **2010** en Perú Espinoza R, Terashima A y Herrera P, estudiaron la pérdida económica que se presenta por año en ganado infectado por *Fasciola hepatica*. USD\$ 50 millones

En **1999** Mas-Comas S, Esteban J, y Burgues reportaron Fasciolosis en Puerto Rico y Cuba. En 1983 en Cuba hubo un brote afectado a más de 1.000 personas.



<https://informacionimagenes.net/imagenes-de-banderas-del-mundo-america-europa-africa-asia-y-oceania/>

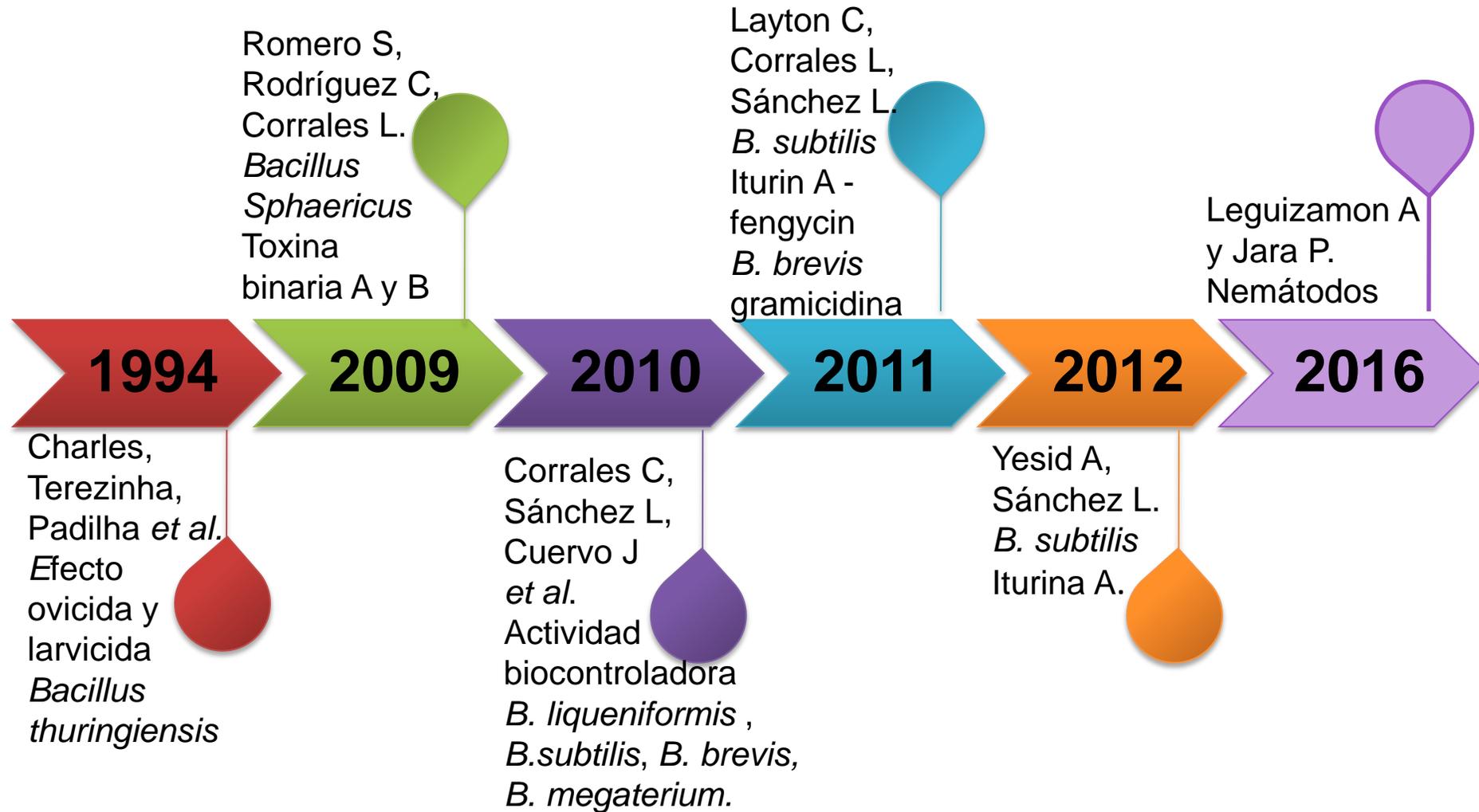


<https://mx.depositphotos.com/46318025/stock-photo-colombian-flag-map.html>

En **2014** en el municipio de Toca, Corredor M y Anaya F, reportaron una prevalencia de Fasciolosis en ovinos de 7.8%.

En Quindio, en el año **2014** se reportó una prevalencia de *Fasciola hepatica* en heces de bovinos de 3.74%

Antecedentes



Metodología



Aislamiento de cepas de *Bacillus* sp.

CEPA	GÉNERO-ESPECIE	NOMBRE
Bp01	<i>Bacillus pumilus</i> nativo del suelo	BFH01
BpC01	<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 4884	BFH02
BS01	<i>Bacillus sphaericus</i> nativo del suelo	BFH03
BSC01	<i>Bacillus sphaericus</i> ATCC 4525	BFH04
BI07	<i>Bacillus subtilis</i> aislada de cultivos de <i>Solanum quitoense</i>	BFH05
CH4	<i>Bacillus subtilis</i> aislada de chimeneas de restaurantes de pollo	BFH06
U2-01	<i>Bacillus pumilus</i> aislada de plantas de cultivos de uchuva	BFH07
CH7B	<i>Bacillus pumilus</i> aislada de chimeneas de restaurantes de pollo	BFH08
BIO10	<i>Bacillus subtilis</i> aislada de cultivos de <i>Solanum quitoense</i>	BFH09
TB2	<i>Bacillus subtilis</i> con actividad antagónica frente a <i>Fusarium</i>	BFH10
Control TB2	<i>Bacillus subtilis</i> con nativo del suelo	BFH11

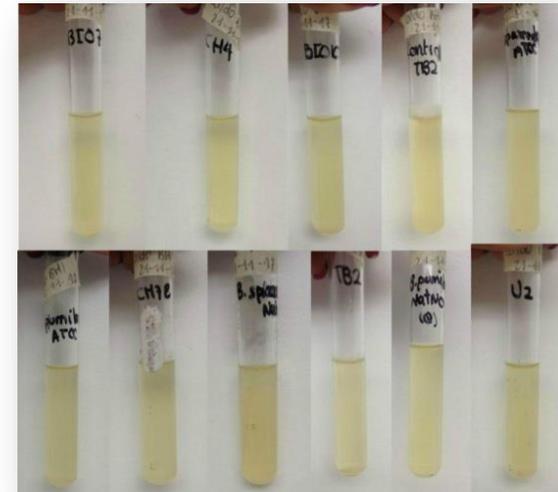


Imagen por autoras

Estimulo de actividad quitinolítica y producción de endosopora

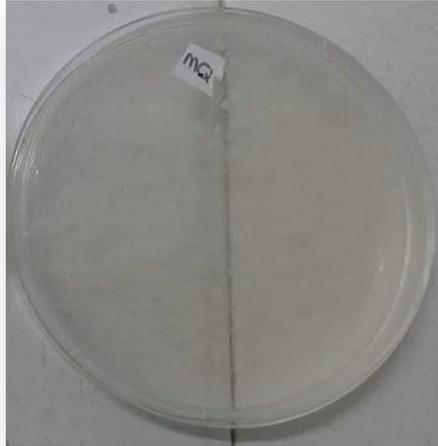


Imagen por autoras

Tinción de Gram

No crecimiento	(-)
Crecimiento escaso	(+)
Crecimiento Moderado	(++)
Crecimiento abundante	(+++)

24 – 48 y 72 horas



Imagen por autoras

Tinción de Schaeffer Fulton

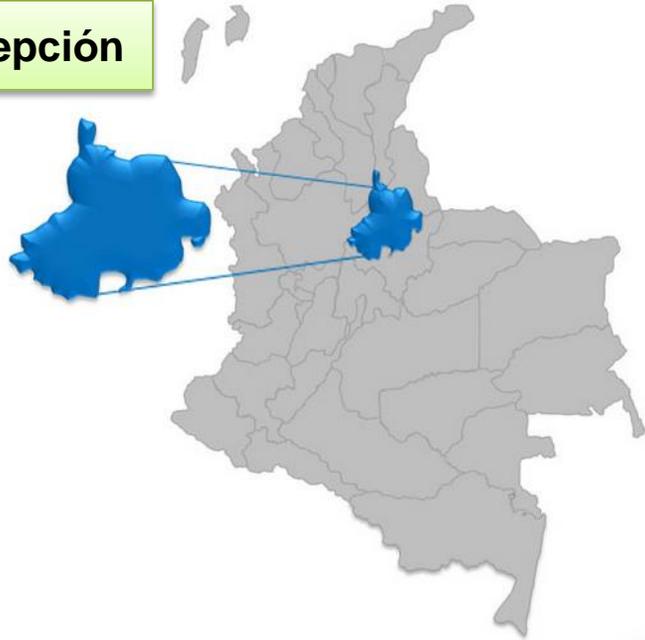


Imagen por autoras

3

Obtención de muestras y recuperación de huevos

Concepción



[https://es.wikipedia.org/wiki/Santander_\(Colombia\)](https://es.wikipedia.org/wiki/Santander_(Colombia))



Imagen por autoras



Imagen por autoras

Sedimentación rápida

4

Realización de bioensayos



Imagen por autoras

Escala McFarland



Imagen por autoras

Control
positivo



Imagen por autoras

Control
negativo



Imagen por autoras

Concentrados de huevos
con cada cepa de *Bacillus*

Resultados



Aislamiento de cepas de *Bacillus* sp.

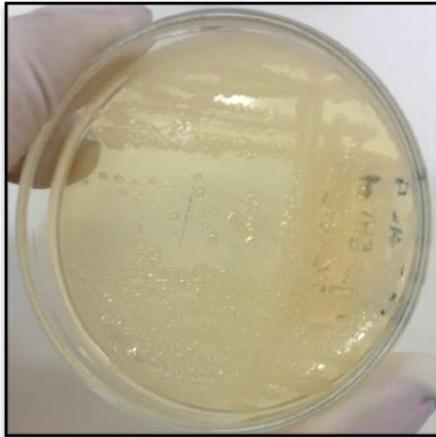


Imagen por autoras

BFH-01

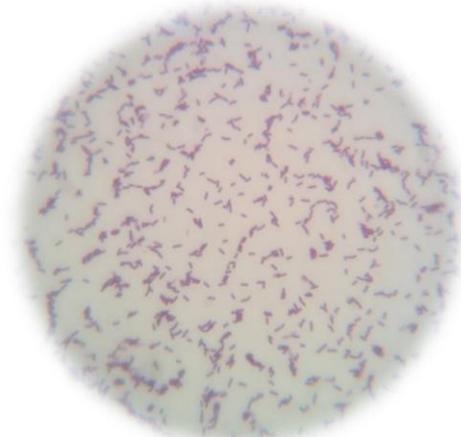


Imagen por autoras

BFH-02



Imagen por autoras

BFH-08



Imagen por autoras

BFH-07



Estimulo de actividad quitinolítica y producción de endospora

Medio MMQ



24 horas : -
48 y 72 horas: +

Medio MQ



24 horas : +
48 y 72 horas: +++



BFH-01 y BFH-02
crecimiento ++

Medio GTA



24 horas : +
48 horas: ++
72 horas: +++



Obtención de muestras y recuperación de huevos

LECTURA	Hpg
1	19
2	20
3	19

Recuento de huevos por gramo del
pool de muestras



4

Realización de bioensayos

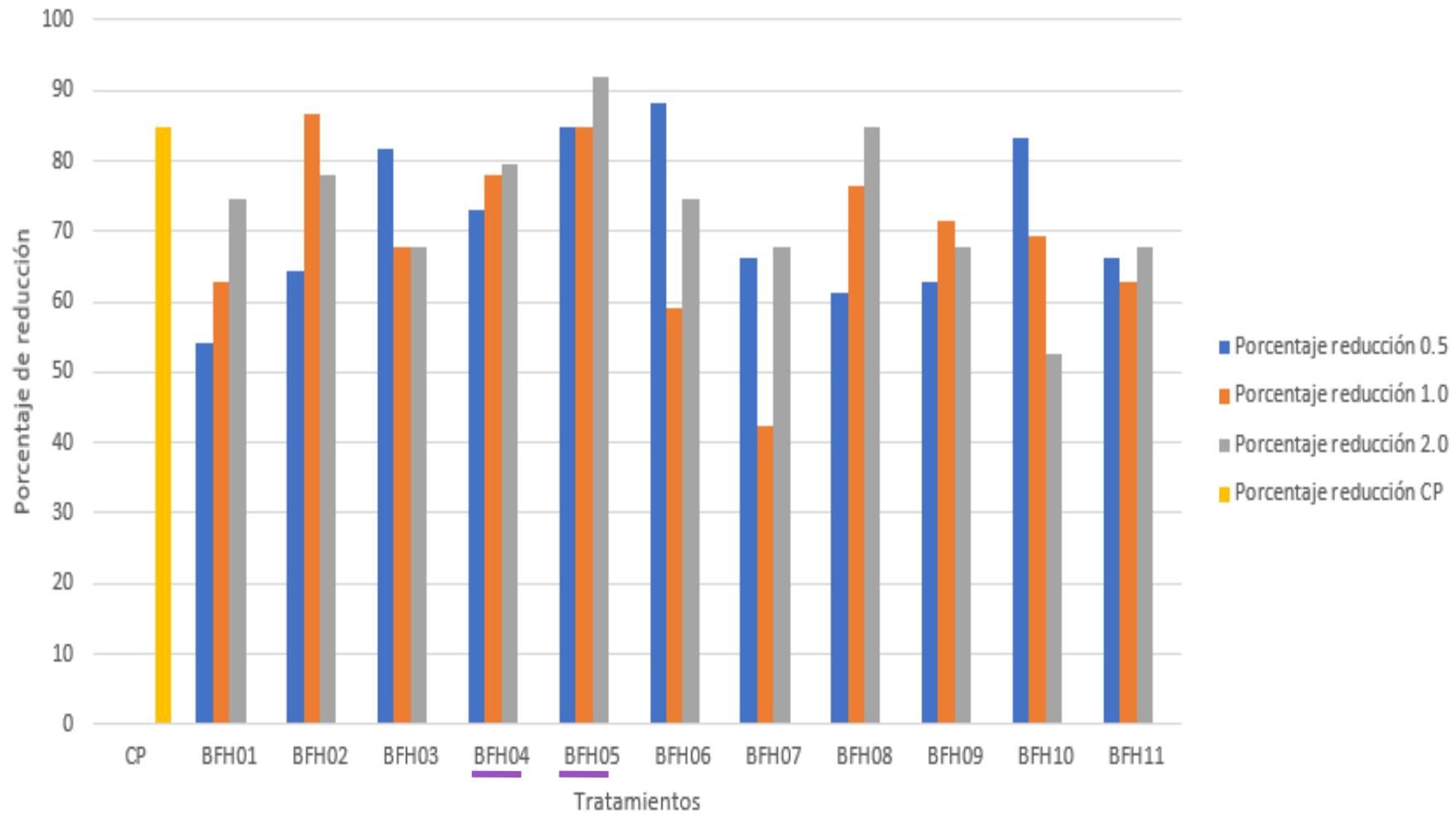
Porcentajes de reducción por concentración.

CEPA	0.5	1.0	2.0
BFH-01	54.1	62.8	74.5
BFH-02	64.3	86.7	78.1
BFH-03	81.6	67.9	67.9
BFH-04	73	78.1	79.6
BFH-05	84.7	84.7	91.8
BFH-06	88.3	59.2	74.5
BFH-07	66.3	42.3	67.9
BFH-08	61.2	76.5	84.7
BFH-09	62.8	71.4	67.9
BFH-10	83.2	69.4	52.6
BFH-11	66.3	62.8	67.9

Porcentaje de reducción de huevos por tratamiento con Albendazol (%)	
Control positivo: Albendazol	84.7

Recuento de controles de huevos por gramo		
CONTROL	Hpg	MEDIA
NEGATIVO	23	19.6
	21	
	15	
POSITIVO	5	3
	3	
	1	

Porcentajes de reducción por concentración.



Revisión microscópica de los huevos post-tratamiento con las cepas bacterianas



Imagen por autoras

Control negativo



Imagen por autoras

Control positivo



Imagen por autoras

BFH-05



Imagen por autoras

BFH-04



Imagen por autoras

BFH-02



Imagen por autoras

BFH-06



Imagen por autoras

BFH-10



BFH-11

Imagen por autoras



BFH-07

Imagen por autoras

Discusión

Fuentes M, 2006
Fasciolosis en
laderas de los
Andes

Beesley N, 2017
Diversidad en
resistencia

Álvarez M, 2006
resistencia
triclabendazol y
Albendazol

Castro 2011,
actividad quitinasa
como defensa a
patógenos

Leguizamón A,
Jara P, medio
MQ y MMQ.

Tasharrofi S, 2011
MgSO₄ y FeSO₄ en
B. pumilus

Tobal 2016,
Quitinasas,
endosporas de
Bacillus

Margino S,
2012 quitinasas
frente a
*Globodera
rostochiensis*

Orbera T, 2009
evaluación *in vitro*
de inhibición de
hongos por
Bacillus

Conclusiones

- 
- Se obtuvo biomasa quitinolítica para nueve cepas de *Bacillus pumilus* y *Bacillus subtilis* en los medios MQ y MMQ y producción de biomasa de endospora terminal en dos cepas de *Bacillus sphaericus* en medio GTA.

- 
- Las 11 cepas de *Bacillus* utilizadas en el estudio obtuvieron un porcentaje de reducción mayor al 55% de efectividad, causaron daños morfológicos, haciendo inviables los huevos de *Fasciola hepatica*, por medio de su actividad quitinolítica y de endospora terminal.

- 
- El control positivo con albendazol (84.7%), fue superado por la actividad ovicida de la cepa BFH-05 *Bacillus subtilis* (87,1%). Esto hace que el control biológico con *Bacillus* sp. sea una buena alternativa sobre *Fasciola hepatica*.

- 
- El control biológico con *Bacillus* sp, es una alternativa que puede ayudar a la reducción de parásitos en animales, contaminación ambiental, residuos químicos encontrados en los productos de origen animal y mitigar problemas en salud animal y salud pública.

Recomendaciones



Ampliar la investigación en control biológico sobre los huevos. Pudiendo hacer enfoque en la actividad biocontroladora de *Bacillus* sobre *Fasciola hepatica*.



Desarrollar metodologías que permitan evaluar el mecanismo por el cual la biomasa productora de endosporas de *Bacillus* realiza una acción biocontroladora.



Generar bioensayos en los que se evalúe a *Bacillus* como controlador biológico en los hospederos intermediarios en diferentes estadios del ciclo biológico de *Fasciola hepatica*.



Generar estrategias para poder ensayar la actividad biocontroladora de *Bacillus* sp sobre los huevos de *Fasciola hepatica in vivo*.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos primero a Dios, por darnos la sabiduría para poder realizar y finalizar este trabajo. A nuestros padres por apoyarnos incondicionalmente En cada paso que dimos para lograr esta meta.

Agradecemos a nuestros asesores, la docente Ligia Consuelo Sánchez y el docente Jimmy Jolman Vargas por guiarnos en este proceso, por permitirnos compartir con ellos este trabajo, por ser un ejemplo en nuestras vidas profesionales, como investigadores y personas de bien.

Asimismo, queremos agradecerles a nuestros docentes que estuvieron presentes en nuestra formación académica como profesionales, dándonos conocimiento y sabiduría.

A todos, muchas gracias por recordarnos que debemos tener en cada paso que damos, humildad, sabiduría, disciplina, constancia y amor por lo que hacemos.

Referencias bibliográficas

1. Tebit E. Natural Remedies in the Fight Against Parasites. IntechOpen. 2017. Disponible en: <https://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/55437.pdf>
2. Reyes D, Padilla L, Grialdo I, Toro J, Mercedes M, Osorio C. Prevalencia de *Fasciola hepatica*, en humanos y bovinos en el departamento del Quindío-Colombia 2012-2013. Infectio. 2014 [citado 15 Jul 2017]; 18(4):153-157. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.infect.2014.09.001>
3. Barrios C. Guía práctica de ovinocultura. enfocada hacia la producción de carne. BACOM Ltda. Bogotá, agosto de 2007. Documento PDF. [citado 13 octubre 2016]. Disponible en: <http://goo.gl/37YS6Z>
4. González D. Pequeños Rumiantes: Un Proyecto con Posibilidad de Rentabilidad. Conexión Agropecuaria JDC. 2011 [citado 15 Jul 2017]; 1(1):67-74. Disponible en: <file:///C:/Users/salatec35/Downloads/102-389-1-PB.pdf>
5. Toro A, Rubilar L, Palma C, Pérez R. Resistencia antihelmíntica en nematodos gastrointestinales de ovinos tratados con ivermectina y fenbendazol. Archivos de medicina veterinaria. 2014. [citado 15 Jul 2017]; 46(2): 247-252
6. Herrera O, Ríos O, Zapata S. Frecuencia de la infección por nemátodos gastrointestinales en ovinos y caprinos de cinco municipios de Antioquia. Revista MVZ Córdoba. 2013. [citado 15 Jul 2017]; 18(3): 3851-3860.
7. Vázquez A, Bravo A, Mendoza P, Liébano E, Hernández I, Yáñez N., et al. Uso de productos derivados de *Bacillus thuringiensis* como alternativa de control en nematodos de importancia veterinaria: Revisión. Rev. Mexicana de ciencias pecuarias. 2012. [citado 10 agosto de 2017]; 3(1): 77- 88.
8. Reyes O. La ganadería ovina vive su mejor momento en Colombia. Cg. 2013 [citado 20 Jul 2017] Disponible en <http://www.contextoganadero.com/reportaje/la-ganaderia-ovina-vive-su-mejor-momento-en-colombia>
9. García T. Anatomía y fisiología del aparato digestivo de los rumiantes. Cg. [citado 20 Jul 2017] Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/manejo_del_alimento/02-anatomia_fisiologia_digestivo.pdf
10. Berrueta T. Trematodos. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. 2016 [citado 20 Jul 2017]. Disponible en <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/trematodos.html>
11. Miguel C, Francisco A, Antonio M. Parasitología Veterinaria. DPDx. 2000. [citado 22 Jul 2017] Disponible en <https://www.cdc.gov/dpdx/fascioliasis/index.html>
12. Cuéllar A. Nuevas opciones para el control de parásitos en la ovinocultura tropical. Universidad Nacional Autónoma de México. 2016 [citado 22 Jul 2017] Disponible en <http://imap.borrego.com.mx/descargas/opciones.pdf>
13. University of Wisconsin, Madison. Biological Control. Vegetable crop entomology [citado 01 agosto 2017] Disponible en <http://labs.russell.wisc.edu/vegento/ipm/biological-control/>
14. Mejía, A. Alternativa de control biológico de parásitos gastrointestinales en pequeños rumiantes: Hongos nematófagos. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. 2014 [citado 01 agosto 2017] Disponible en: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/4120/Alternativadecontrolbiologicodeparasitos.pdf?sequence=1>
15. Contreras R. El género *Bacillus*. La guía de Biología. 2014 [citado 01 agosto 2017] Disponible en <http://biologia.laguia2000.com/microbiologia/el-genero-bacillus>