

Actividad nematocida de extractos acuosos e hidroalcohólicos de *Pleurotus ostreatus* contra el nematodo *Haemonchus contortus*

Nematicidal activity of aqueous and hydroalcoholic extracts of *pleurotus ostreatus* against the nematode *haemonchus contortus*

Virginia Guadalupe García-Rubio¹
Juan José Ojeda-Carrasco*²

Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México

Fecha de recepción: 23-02-2025 Fecha de aceptación: 11-07-2025



Resumen

Haemonchus contortus es el parásito más dañino, prevalente y de importancia económica en ovinos. Investigaciones recientes analizan la eficacia de extractos de hongos como estrategia de control biológico. Esta investigación evalúa la actividad nematocida de extractos acuosos e hidroalcohólicos de *Pleurotus ostreatus* contra L3 de *H. contortus*. Los hongos empleados en el estudio provinieron de cinco unidades de producción de la Región de Amecameca, Estado de México. El solvente para los extractos acuosos fue agua destilada, y para los extractos hidroalcohólicos, una dilución etanol-agua (70:30) procesada mediante rotoevaporación; ambos extractos se liofilizaron. La infección artificial de un ovino donador (350 L3/kg PV) permitió obtener las larvas. La dosis empleada en los bioensayos fue de 20 mg/mL, con L3 desenvainadas con hipoclorito de sodio al 0.187%, utilizando como control negativo agua destilada y como control positivo ivermectina (10 mg/mL), con diez lecturas, tres repeticiones y una confrontación de 72 h por extracto. Los porcentajes de mortalidad para los extractos acuosos oscilaron entre 26.13 y 69.54 %, y para los hidroalcohólicos, entre 3.68 y 18.15 %. El control de *H. contortus* representa un gran desafío; lograrlo significa reducir al mínimo su presencia y las afectaciones a la salud y bienestar de los ovinos.

Palabras clave: Animal doméstico, control biológico, hongo, parásitos, *Haemonchus contortus*.

Abstract

Haemonchus contortus is the most harmful, prevalent, and economically significant parasite in sheep. Recent studies have explored the efficacy of fungal extracts as a biological control strategy. The present study evaluates the nematicidal activity of both aqueous and hydroalcoholic extracts of *Pleurotus ostreatus* against L3 larvae of *H. contortus*. The fungi used were sourced from five production units in the Amecameca region, State of Mexico. Aqueous extracts were prepared using distilled water, while hydroalcoholic extracts employed a 70:30 ethanol-water solution processed by rotary evaporation; all extracts were subsequently lyophilized. Larvae were obtained through artificial infection of a donor sheep (350 L3/kg BW). Bioassays were conducted using a dose of 20 mg/mL, with L3 larvae exsheathed in 0.187% sodium hypochlorite. Distilled water served as the negative control, and ivermectin (10 mg/mL) as the positive control. Each assay included ten readings, three repetitions, and a 72-hour exposure per extract. Mortality rates for the aqueous extracts ranged from 26.13 to 69.54%, while hydroalcoholic extracts resulted in mortality rates between 3.68 and 18.15%. Controlling *H. contortus* remains a considerable challenge; effective management requires minimizing parasite presence and mitigating its impact on the health and welfare of sheep.

Keywords: Domestic animal, biological control, fungus, parasites, *Haemonchus contortus*.

1. Doctora en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Profesora de Asignatura, Centro Universitario UAEM Amecameca, Universidad Autónoma del Estado de México, México. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9842-3874>. Email: vggarcia@uaemex.mx
2. Doctor en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Profesor de Tiempo Completo, Centro Universitario UAEM Amecameca, Universidad Autónoma del Estado de México. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4262-9224>. Email: *(Autor de correspondencia): jjojedac@uaemex.mx

1. Introducción

Haemonchus contortus es el parásito más dañino, prevalente y de importancia económica en ovinos. Investigaciones recientes han analizado la eficacia de extractos de hongos como estrategia de control biológico. El presente estudio evalúa la actividad nematicida de extractos acuosos e hidroalcohólicos de *Pleurotus ostreatus* contra L3 de *H. contortus*.

Los hongos empleados en el estudio provinieron de cinco unidades de producción de la región de Amecameca, Estado de México. El solvente para los extractos acuosos fue agua destilada, y para los extractos hidroalcohólicos, una dilución etanol-agua (70:30) procesada mediante rotoevaporación; ambos extractos fueron liofilizados.

La infección artificial de un ovino donador (350 L3/kg PV) permitió obtener las larvas. La dosis utilizada en los bioensayos fue de 20 mg/mL, con L3 desenvainadas con hipoclorito de sodio al 0.187 %, empleando como control negativo agua destilada y como control positivo ivermectina (10 mg/mL), con diez lecturas, tres repeticiones y una confrontación de 72 h por extracto.

Los porcentajes de mortalidad para los extractos acuosos oscilaron entre 26.13 y 69.54 %, y para los hidroalcohólicos, entre 3.68 y 18.15 %. El control de *H. contortus* representa un gran desafío; lograrlo implica reducir al mínimo su presencia y las afectaciones a la salud y bienestar de los ovinos.

Al respecto, en un estudio realizado con animales sacrificados en un rastro de Tabasco, México, se determinó que el 57.4 % de los animales estaba parasitado y que la carga parasitaria de NGI era significativa. En el abo-

maso, la prevalencia de *Haemonchus contortus* fue de 37.2 % y de *Trichostrongylus axei* de 4.1 %. En el intestino delgado, se identificaron cinco especies de nematodos con prevalencias diferenciadas: *Cooperia curticei* (36 %), *Trichostrongylus colubriformis* (25.2 %), *Strongyloides papillosus* (3.3 %), *Ostertagia ostertagi* y *Bunostomum trigonocephallum* (0.8 %). En tanto que, en el intestino grueso, se comprobó la presencia de *Oesophagostomum columbianum* (11 %) y *Trichuris ovis* (0.41 %) (González *et al.*, 2011). También se ha demostrado que las poblaciones de NGI strongilidos pueden variar con la época del año, con 95 % en lluvias y 91 % en la época de seca, y dentro de éstos *H. contortus* varía su incidencia con 29 y 37 %, respectivamente (Camacho *et al.*, 2021). Aunque las parasitosis varían a lo largo del año no sólo por las condiciones ambientales, sino por la prolificidad y prevalencia de los parásitos, éstas se presentan como una constante en los rebaños y el nivel de sus efectos está asociada con la carga parasitaria y la patogenicidad de los parásitos, que suele ser diferencial (Zaragoza Vera *et al.*, 2021).

Ante esta problemática, históricamente la principal estrategia empleada para el control de NGI ha sido la aplicación de compuestos antihelmínticos sintéticos. La alta eficacia de estos fármacos, vinculada tanto a su poder residual como a su amplio espectro antiparasitario, si bien en un inicio resolvió el problema, a la larga generó graves consecuencias al crear un falso sentido de seguridad en los productores. Estos sustituyeron el diagnóstico y el asesoramiento profesional por su uso indiscriminado e irracional, lo que derivó en el desarrollo de resistencia por parte de los parásitos y en severos daños al ambien-

te, principalmente al suelo, debido a la acumulación de los fármacos depositados junto con los desechos de los animales (Sepúlveda Vázquez *et al.*, 2018).

Es por ello que, desde hace años, el desafío se ha orientado a lograr el control de las parasitosis de manera que los animales puedan mantener una adecuada productividad, sin que los parásitos manifiesten resistencia antihelmíntica. Para tal efecto, se plantea el Manejo Integrado de las Parasitosis (MIP), que implica combinar y/o complementar el control químico con otras estrategias no químicas. Esto supone considerar las características y condiciones específicas en que se desarrollan los rebaños, con el fin de combatir las diferentes fases del ciclo biológico de los parásitos y reducir el empleo de antihelmínticos químicos (Salgado Moreno *et al.*, 2017). De la diversidad de estrategias sustentables, la utilización de la resistencia genética del hospedero ha mostrado alta eficacia, principalmente en ovinos de pelo de los trópicos (Morteo Gómez *et al.*, 2021).

Como parte de estas estrategias, se busca introducir en el MIP nuevas alternativas que, además de incidir en el control de los parásitos, reduzcan significativamente los daños provocados al ambiente, con el fin de lograr un control sostenible que integre diferentes dimensiones —ecológica, ética, cultural, política y económica— como base de las interacciones sociales con la naturaleza, abordando de forma sistémica esta problemática (Benítez *et al.*, 2021). Esto implica que dichas alternativas, además de regular las poblaciones de parásitos, se implementen mediante una gestión adecuada de los recursos ecológicos en beneficio de las poblaciones (Domínguez Solís *et al.*, 2023).

Dentro del control biológico, destacan los estudios que evalúan el uso de extractos de plantas y hongos tanto silvestres como cultivados; en estos últimos, las contribuciones se han desarrollado con el hongo shiitake (*Lentinula edodes*) y principalmente, con diferentes especies del hongo ostra *Pleurotus* spp. Pineda Alegría *et al.* (2021), evaluaron el efecto ovicida de tres extractos (agua, acetato de etilo y metanol) de basidiomas de *L. edodes* contra huevos y larvas de *H. contortus*. La mayor eficacia en la inhibición de la eclosión de huevos (IEH) (100 %) se obtuvo con los extractos de acetato de etilo, en 4 concentraciones (5 a 40 mg/mL), seguidas por el extracto acuoso (36.1 % a 20 mg/mL) y el extracto con metanol (17.7 %, a 10 mg/mL).

Haemonchus contortus, es el parásito de más prevalencia e importancia en los ovinos. Se aloja en el abomaso y sus hábitos hematófagos causan severos daños, ya que cada nematodo puede ingerir hasta 50 μ L de sangre al día; esta pérdida de sangre provoca anemia e hipoproteinemia, reduciendo de forma significativa la correcta digestión y absorción de nutrientes, lo que afecta de igual forma el metabolismo energético. Aunado a ello, su alto grado de adaptabilidad y prolificidad causa cuadros de diferente severidad, al provocar disminución del apetito, pérdida de peso, debilidad, anemia, mucosas pálidas, emaciación, edema mandibular, entre otros signos; condiciones que favorecen el desarrollo de otras enfermedades y pueden provocar la muerte del ovino. Contra este parásito se han empleado diferentes tratamientos químicos como albendazol 5 mg/kg, fenbendazol 5 mg/kg, oxfendazol 5 mg/kg, levamisol 7.5 mg/kg, ivermectina 0.2 mg/kg, moxidectina 0.2 mg/kg y closantel 10 mg/kg; sin embargo,

el parásito ha desarrollado la capacidad de resistencia múltiple, lo que vuelve más complejo su control (Aduci *et al.*, 2021; Cuevas, 2019; Emery *et al.*, 2016; López Rodríguez *et al.*, 2023; Pérez Bautista *et al.*, 2021; Selmon, 2018;).

Al respecto, en un estudio realizado en siete unidades de producción pecuaria (UPP) ovinas del trópico mexicano, se evaluó la resistencia antihelmíntica de tres fármacos comerciales administrando dosis de 5 mg/kg PV de bencimidazol (BZ); 0.2 mg/kg PV de ivermectina (IVM) y 7.5 mg/kg PV de levamisol (LEV). Se determinó la cantidad de huevos por gramo de heces antes y después de su aplicación; se comprobó que en todas las UPP había resistencia múltiple, principalmente en *H. contortus*, *Trichostrongylus* spp. y *Oesophagostomum* spp. Los rangos de resistencia oscilaron entre 0-48% con BZ, de 29-82% con IVM y de 1-88% con LEV (Herrera-Manzanilla *et al.*, 2017).

Como parte del control biológico con hongos comestibles, se han realizado diversas investigaciones contra *H. contortus*, dada su importancia en la ovinocultura. Algunos han comparado la eficacia de diferentes especies de *Pleurotus* contra este nematodo, aunque la mayoría tiende a enfocarse a una sola especie. Dentro de los comparativos, Sánchez-Salgado *et al.* (2021), evaluaron la actividad nematocida *in vitro* del micelio de las especies *P. ostreatus*, *P. eryngii* y *P. djamor*, contra L3 de *H. contortus*, determinando un porcentaje de mortalidad de 81.5 %, 87.4 % y 31.3 %, respectivamente. En un estudio similar, Comans Pérez *et al.* (2021), probaron la eficacia de extractos orgánicos del micelio de siete hongos en los que se incluyó a tres especies

de *Pleurotus*, contra L3 de *H. contortus*. La mayor mortalidad se obtuvo con *L. edodes* (93.9 %), seguida por *P. eryngii* (91.9 %), *P. ostreatus* (88.5 %) y *P. cornucopiae* (88 %) a las 72 h post-confrontación, a una concentración de 200 mg/mL.

De los estudios realizados con una sola especie, Pineda Alegría *et al.* (2017), probaron el extracto hidroalcohólico de basidiomas frescos de *P. djamor*, contra huevos y larvas de *H. contortus*. No hubo efecto ovicida a las concentraciones empleadas, pero sí un efecto larvicida a las 72h, de 77 % (160 mg/mL) y 98.7 % (320 mg/mL). Por su parte, Cruz Arévalo *et al.* (2020) realizaron extractos hidroalcohólicos (HA) y acetónicos (AE) de basidiomas de siete cepas de *P. eryngii* a una concentración de 20 mg/mL contra L3 de este nematodo. Todas las cepas mostraron actividad larvicida; el mayor porcentaje de mortalidad fue para HA con un rango de 11.5-18.8 %, en tanto que para AE osciló entre 2.30 y 9.63 %.

En los estudios que emplean *P. ostreatus*, Magalhães de Matos *et al.* (2020), evaluaron *in vitro* e *in vivo* el efecto del extracto acuoso contra huevos y L3 de *H. contortus*, identificando como compuestos activos a los ácidos linolelaídico, 9,15-octadecadienoico, oxálico, tetradecanoico y tridecanoico. La inhibición de la eclosión de huevos se alcanzó al 100% (2.24 mg/mL), en tanto que el efecto larvicida de 94.7 % (50 mg/mL). En el *in vivo*, emplearon jerbos (*Meriones unguiculatus*) como animales experimentales, pero no encontraron resultados significativos. Estos estudios muestran la diversidad de estrategias metodológicas empleadas y cómo estas pueden ser determinantes en los resultados

que se obtengan; no obstante, demuestran la actividad nematocida de *Pleurotus* spp.

2. Materiales y Método

a. Área de estudio

La investigación se realizó en los municipios de Amecameca, Ayapango, Juchitepec y Tenango del Aire, ubicados en la región suroriente del Estado de México. En la Tabla 1, se presentan los datos de localización, climáticos y edafológicos. Para 2022, la actividad económica preponderante en Amecameca fue la de servicios (85.4 %), el sector agropecuario representó solo el 3.2 %, con el cultivo de productos agrícolas, (principalmente maíz) y la crianza de ganado bovino y porcino. En Ayapango, 42.8 Km² (84.1 %)

se destinan al sector agropecuario que aporta el 89.9 % de los ingresos, con la crianza de bovinos, porcinos, ovinos, caprinos y aves de corral; el sector de servicios aporta el 10.05 %. En Juchitepec, las actividades agropecuarias ocupan el 83.1 % del uso del suelo; en el sector pecuario destaca la crianza de ovinos, que en 2020 alcanzó 22,357 cabezas de ganado, ubicándolo en el principal productor a nivel estatal. Finalmente, en el municipio de Tenango del Aire el 68.4 % de la superficie está destinada a las actividades agropecuarias que generan el 29.3 % de los ingresos. Los principales productos agrícolas son el maíz, amaranto y avena; y en el sector pecuario, destaca la crianza de bovinos, porcinos, ovinos y caprinos (COPLADEM, 2022; SIACONG-NG, 2020).

Tabla 1

Datos de localización, climáticos y edafológicos de los municipios

MUNICIPIO	COORDENADAS		SUPERFICIE (Km ²)	ALTITUD (msnm)	CLIMA	TMA* (°C)	PMA* (mm)	SUELOS PREDOMINANTES
	LATITUD	LONGITUD						
Amecameca	19°07'73" N	98°46'11" O	172.9	2,480	Cw(b)	14.9	1752	Andosol y Litosol
Ayapango	19°07'37" N	98°48'09" O	50.83	2,450	Cw	14.7	900	Regosol, Arenosol y Umbrisol
Juchitepec	19°06'07" N	98°52'51" O	141.09	2,530	Cw	14.05	749.2	Leptosol, Arenosol y Phaeozem
Tenango del Aire	19°09'25" N	98°51'41" O	38.09	2,285	Cw	13.9	825.3	Litosol y Andosol

*TMA = Temperatura media anual; *PMA = Precipitación media anual; Cw = Templado subhúmedo con lluvias en verano; Cw (b) = Templado con invierno seco, cálido y templado.

Nota. Elaboración propia con base en información de INEGI (2015) y COPLADEM (2022).

b. Tipo de Investigación

El presente es un estudio cuali-cuantitativo, experimental y transversal. Las variables independientes fueron los extractos acuosos e hidroalcohólicos (20 mg/mL) y la dependiente la mortalidad de larvas L3 de *H. contortus*. El control negativo fue agua destilada y el positivo, Ivermectina (10 mg/mL).

c. Proceso metodológico

- *Obtención y procesamiento de hongos*

Los hongos fueron colectados directamente de Unidades de Producción (UP) ubicadas en los municipios de Amecameca, Delegación San Pedro Nexapa (UP-1 y UP-2), Ayapango, Delegación San Cristóbal Poxtla (UP-3), Juchitepec, Delegación San Matías Cuijingo (UP-4) y Tenango del Aire, Delegación San Mateo Tepopula (UP-5). Excepto UP-3 que requiere para su cultivo, adquirir insumos en «Hongos Camacho, SPR de RL» en Ixtlahuaca, Estado de México; el resto de los productores adquieren el inóculo con la empresa PRODISSET®. De acuerdo con las especificaciones del fabricante de los inóculos todos se realizan en semillas de trigo; UP-1 emplea la semilla *Pleurotus ostreatus* (BPR-3) y como sustrato una mezcla de rastrojo de maíz con paja de avena; UP2, *P. ostreatus* (BGAT) y rastrojo de maíz; UP-4, (BGAT) y paja de trigo; y UP-5, *P. ostreatus* (B2) y paja de trigo. En el caso de UP3, adquiere la semilla *P. ostreatus* variedad blanca inoculada en sorgo y emplea como sustrato paja de trigo.

Se colectaron muestras de 1 Kg del hongo fresco, que se depositaron en bolsas plásticas debidamente etiquetadas con los datos de identificación. Durante 10 días, se sometieron a un proceso de secado, realizado en el

Laboratorio de la Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia del Centro Universitario UAEM Amecameca, Km 2.5 Carretera Amecameca-Ayapango, Estado de México, colocando los hongos sobre charolas con base de papel absorbente, el cual se cambió periódicamente cada vez que se encontraba humedecido. Las muestras secas, se depositaron en bolsas de polipapel etiquetadas, para su traslado al laboratorio del INIFAP en Jiutepec, Morelos.

- *Obtención de extractos acuosos e hidroalcohólicos*

Este procedimiento se realizó en la Unidad de Helmintología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad (CENID- SAI) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) ubicado en Jiutepec, Morelos, México.

Con una balanza granataria (Modelo VE-2610, marca VELAB), se pesaron muestras de 50 g de los basidiomas deshidratados (dos de cada UP, una por extracto), que se fragmentaron con unas tijeras esterilizadas. Los fragmentos se colocaron en frascos de vidrio de tapa de rosca esterilizados; a uno se le agregó 500 mL de agua destilada y a otro, 500 mL de la solución hidroalcohólica preparada con etanol al 96% y agua destilada en una proporción 70:30. Los frascos se forraron con papel aluminio, rotularon y dejaron reposar por 24h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, el material fue filtrado siguiendo la técnica propuesta por Cuevas (2019). Para los extractos acuosos, se realizaron dos filtrados, el primero colocando sobre un matraz Erlenmeyer (VeraVitrum) de 1000 mL un embudo (Corning 6220-100) con

una torunda de algodón en el que se vertió la solución del frasco; para el segundo, se sustituyó la torunda de algodón por papel filtro. El material filtrado se colocó en porciones de 20 mL en tubos de polipropileno de 50 mL (Scilogex 007107) previamente rotulados. Para los hidroalcohólicos, se siguió el mismo procedimiento adicionando a la torunda una gasa. Los matraces se taparon con papel aluminio y rotularon.

Los filtrados hidroalcohólicos se procesaron con un rotoevaporador (WEV-1001V), colocando bajo la campana de extracción (BGX-CE-90, marca Pronalab) cada muestra en un matraz de bola (United Scientific FG4060-3000) con la ayuda de un embudo, a 40°C y 47 rpm, por aproximadamente 2h, con la finalidad de eliminar el etanol. Las extracciones se colocaron en porciones de 20 mL en tubos de polipropileno de 50mL (Scilogex 007107) previamente rotulados, hasta agotar el total de la extracción. Posteriormente, con una liofilizadora (7753022, marca LAB-CONCO) se procesaron 4 muestras de cada uno de los filtrados y extractos, a -40°C por 48h. Después de liofilizadas las muestras, el material desecado se trituró con la ayuda de una espátula (IMS-SQSP4-7) y se pesaron en una balanza analítica (Modelo GA200, marca OHAUS), para conservarlas en refrigeración a -20°C hasta su uso.

- *Obtención de larvas L3*

Se utilizó un ovino donador mantenido bajo condiciones controladas de alojamiento y alimentación ad libitum, infectado artificialmente vía oral, con larvas infectantes de *H. contortus* con 350L3/kg/PV. Transcurridos 21 días, con un guante plástico de palpación se colectaron las heces directamente del recto

del ovino infectado, para evitar la contaminación con otros agentes con orina o la colecta de larvas de vida libre, si se colectaran las heces del suelo.

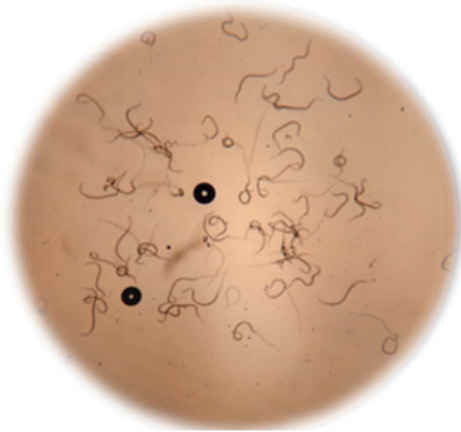
Las heces fueron procesadas para la obtención de L3 mediante coprocultivo de acuerdo con el procedimiento propuesto por Liébano *et al.* (2011). Las heces se depositaron en un recipiente de plástico, se homogenizaron con agua destilada, hasta lograr una consistencia pastosa, se adicionaron fragmentos de espuma de polipropileno y se mezclaron, con la finalidad de conservar humedad y evitar compactación, al recipiente se le colocó una tapa con papel aluminio, haciendo una pequeña ventana con una gasa para su ventilación. El recipiente se mantuvo durante 7 días a 27°C, vigilando que no se desecara, las L3 se recuperaron por la técnica de Baermann y se centrifugaron utilizando un gradiente de sacarosa al 40% para eliminar los detritus.

- *Desenvaine de larvas*

Previo a la confrontación, se realizó la cuantificación de larvas colocando con una micropipeta (Eppendorf) 12 alícuotas de 10µL para observarlas al microscopio óptico (40X-2500X, marca OMAX). Al estimar que se contaba con el volumen de larvas necesarias para las series, se procedió a su desenvaine agregando a la muestra 2 mL de hipoclorito de sodio al 0.187%, homogenizando y dejando que actuara por 6-8 min. Después de 10 min, se verificó el desenvaine en el microscopio (Figura 1) procediendo a realizar 3 lavados con agua destilada para eliminar el exceso del hipoclorito, introduciendo en cada ocasión la muestra en una centrífuga C3100-LC-83500, marca Benchmark) a 3500 rpm.

Figura 1

Observación al microscopio de larvas desvainadas de H. contortus



Nota. Microfotografía de larvas desvainadas, las formas en rojo son las L3 y las hialinas corresponden a las vainas.

- *Confrontación de tratamientos*

Se emplearon placas de microtitulación de poliestireno de fondo redondo de 96 pocillos (marca Advangene), con una capacidad de 360 μL cada uno. Cada confrontación integró 12 series y 3 repeticiones. Las 12 series incluyeron, 50 μL de agua destilada como control negativo, 50 μL de Ivermectina (10 mg/mL) como control positivo. En los pocillos de los tratamientos debidamente identificados en la placa, se agregaron 50 μL del volumen de L3, cuantificando el número de larvas en cada caso. Posteriormente, según correspondiera por tratamiento, 50 μL de cada uno de los 10 extractos (5 acuosos y 5 hidroalcohólicos),

a una concentración de 20 mg/mL, para un total de 100 μL en cada pocillo. Una vez preparadas las placas, se dejaron reposar durante 72 h a temperatura ambiente.

Una vez transcurrido el periodo de confrontación (72h), con la ayuda de una micropipeta (Eppendorf) de 200 μL se homogenizó cada pocillo por separado, tomando una muestra de 10 alícuotas de 10 μL en un portaobjetos, para realizar la observación y cuantificación de las larvas vivas (presentaban movimiento o estaban enroscadas) y muertas (estaban elongadas y sin respuesta al contacto), registrando los datos correspondientes en cada caso.

El porcentaje de mortalidad se calculó con la fórmula (Pineda Alegría *et al.*, 2017):

$$\% \text{ de Mortalidad} = \frac{\text{Promedio del Tratamiento} - \text{Promedio del Control (-)}}{\text{Promedio del Tratamiento}}$$

- *Análisis Estadístico*

Para comparar la acción nematocida de los extractos acuosos e hidroalcohólicos de *P. ostreatus* sobre las L3 de *H. contortus* los datos fueron analizados mediante un modelo lineal generalizado, usando un análisis de varianza (ANOVA), para examinar las diferencias entre las medias de los tratamientos. El control negativo (agua destilada) se utilizó para ajustar el porcentaje de mortalidad.

3. Resultados y Discusión

En los últimos años se han realizado diferentes estudios que buscan probar la efectividad de los extractos de hongos comestibles, como una alternativa para el control biológico de los nematodos en sus diferentes fases del ciclo de vida. Un número importante de estos trabajos se han desarrollado principalmente sobre los efectos de estos extractos sobre la L3, la fase infectante de *H. contortus*, el nematodo de mayor prevalencia e importancia en la crianza de ovinos.

Los trabajos realizados con el género *Pleurotus*, evalúan el efecto de distintas concentraciones de extractos obtenidos con solventes de distinta polaridad (agua, etanol, metanol, cloroformo, acetato de etilo) a partir de micelio, basidiomas o sustrato agotado de este hongo comestible. Algunos comparan entre sí, los efectos de diferentes especies de este hongo; y otros, a una especie particular. A diferencia de estos, en el presente estudio se emplearon cepas de la misma especie, privilegiando la valoración de los efectos obtenidos al emplear diferentes tipos de extracción, a una misma dosis (20 mg/mL). Los resultados se presentan en la Tabla 2.

De acuerdo con los resultados obtenidos, los extractos acuosos reportan una mejor eficacia que los hidroalcohólicos (que son los mayormente empleados en otros estudios). Con base en los resultados de V_c (valor crítico) y F del ANOVA, las diferencias significativas ($F > V_c$) sólo se presentaron en los extractos acuosos T1 ($4.870 > 3.354$) y T2 ($8.648 > 3.345$). Respecto a las fuentes de variación (entre grupos > dentro de los grupos), no existieron diferencias significativas en los tratamientos.

Tabla 2

Porcentaje de mortalidad de L3 de Haemonchus contortus a 72 h post-confrontación

TRATAMIENTOS	MORTALIDAD PROMEDIO (%)
H ₂ O Control (-)	0.46
Ivermectina Control (+)	100
EXTRACTOS ACUOSOS	
T1_UP1 Amecameca	36.5 ± 9.4
T2_UP2 Amecameca	40.8 ± 13.2
T3_UP3 Ayapango	31.6 ± 4.8
T4_UP4 Juchitepec	26.1 ± 2.7
T5_UP5 Tenango del Aire	69.5 ± 5.1
PROMEDIO	40.923
EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS	
T1_UP1 Amecameca	17.3 ± 3.1
T2_UP2 Amecameca	18.1 ± 1.2
T3_UP3 Ayapango	10.7 ± 4.6
T4_UP4 Juchitepec	3.7 ± 1.7
T5_UP5 Tenango del Aire	10.4 ± 3.8
PROMEDIO	12.1

Nota. Elaboración propia con base en los resultados procesados de la investigación.

Para los extractos acuosos destaca el mayor porcentaje de mortalidad de T5 (69.5%) que emplea la semilla B2 y como sustrato paja de trigo, lo que contrasta con T3 (semilla ~BPR-3) y T4 (semilla BGAT) que, aunque emplean el mismo sustrato, registraron mortalidades de 31.6 % y 26.1 %, respectivamente. Aun cuando pudiera inferirse que el cambio en la variedad de semilla puede estar asociada a esta diferencia; resalta el hecho de que T2 emplea la misma semilla que T4, diferenciándose por emplear rastrojo de maíz como sustrato, registrando una mortalidad mayor de 14.7 %. Esto indica que el tipo de sustrato sí es determinante, pero también que existen otras variables como las condiciones y manejo del cultivo, y el tipo de semilla que se emplea en el inóculo, que pueden estar influyendo en los resultados, como se muestra con T1 (semilla BPR-3) donde el inóculo del micelio se realizó en granos de trigo, y emplea como sustrato una mezcla de rastrojo de maíz y paja de avena y T3 (~BPR-3) en el que se emplea sorgo y paja de trigo, respectivamente.

Estudios han demostrado que las características de los sustratos son determinantes en la producción de los metabolitos secundarios que, en este caso, son de los que depende la actividad nematicida que pueda presentar la cepa estudiada. En uno de estos estudios, se comparó la composición química de *P. ostreatus* sometido a crecimiento en diferentes sustratos, todos con los mismos contenidos de sales NaNO_3 (80 mg/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (20 mg/L), KH_2PO_4 (30 mg/L) y KCl (10 mg/L); pero suplementados con harinas de distintos cereales como fuente de carbono, como: cebada, avena, trigo, arroz, maíz, soya, salvado de trigo, trigo integral, maíz pinto, harina de siete granos y maíz amarillo. Con base en los

resultados obtenidos, se determinó que la relación C/N y el contenido de carbohidratos en los sustratos, influye tanto en la composición química, la producción de metabolitos, como en el rendimiento de la biomasa de los micelios (Chegwin y Nieto, 2013).

Por su parte, Vega (2016), realizó el cultivo de *P. ostreatus* mediante fermentación en estado líquido, utilizando como fuentes de carbono maíz amarillo (MA) y salvado de trigo (ST), determinando la existencia de diferencias significativas en los metabolitos secundarios producidos. MA mostró mejores resultados tanto en la cinética de crecimiento, como en el número y proporciones de los metabolitos obtenidos, principalmente α y β -glucanos, mananos, xilanos y galactanos. ST mostró una mayor producción de triterpenos.

De los estudios realizados con extractos acuosos de *P. ostreatus*, Magalhães de Matos *et al.* (2020) reportan una mortalidad larvaria de 94.7 % a una concentración de 50 mg/mL. Con base en la inferencia proporcional, para la concentración empleada en este estudio (20 mg/mL) se tendría un porcentaje de mortalidad de 37.9 %, valor al que se aproxima T1 (36.5 %) y es superada por T2 (40.8 %) y T5 (69.5 %), de lo que se deduce la necesidad de emplear concentraciones mayores para valorar los efectos de este tipo de extractos.

Respecto a los extractos hidroalcohólicos, Valdez Uriostegui *et al.* (2021), emplearon los mismos solventes (etanol-agua) y disolución (70:30) que en el presente estudio, reportando una mortalidad de 50.5 % a las 24h y de 70.5 % a las 48h a una concentración de 240 mg/mL. La contrastación de estos resultados con el porcentaje de mortalidad en extractos acuosos de 94.7% (50 mg/mL) (Ma-

galhões de Matos *et al.*, 2020) muestra que los tipos de extracción también influyen en los resultados que se obtengan. En este caso, no fue posible comparar ni hacer inferencias con los porcentajes del presente estudio por las diferencias en los tiempos de exposición y concentraciones empleadas.

4. Conclusiones

Los resultados obtenidos confirman los hallazgos previos sobre la acción nematicida de los extractos de *P. ostreatus* contra *H. contortus*.

Se encontraron diferencias significativas entre los dos tipos de extracciones probadas, obteniendo mejores resultados en los extractos acuosos que en los hidroalcohólicos. Estos resultados, sustentan la imposibilidad de hacer extrapolaciones desde resultados previos, por las variaciones en el diseño experimental, por lo que es necesario continuar con la realización de investigaciones en donde haya un mayor manejo de las variables. No obstante, se confirma que esta alternativa de control puede ser integrada al MIP, a favor de una ovinocultura sustentable.

5. Referencias

- Aduci, I.; Sajovitz, F.; Hinney, B.; Lichtmannsperger, K.; Joachim, A.; Wittek, T. & Shiyan Y. (2022). Haemonchosis in Sheep and Goats, Control Strategies and Development of Vaccines against *Haemonchus contortus*. *Animals* (Basel) 12(18), 2339. <https://doi.org/10.3390/ani12182339>
- Benítez, N. D.; Delgado, M. L. J. & Pedraza, G. L. M. (2021). Sostenibilidad ambiental y educación en la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia- Facultad Seccional Sogamoso. En O.W. Castro Martínez y A. Villafuerte Salazar (Coords). *Educación ambiental y estudios biológicos. Aportes e investigaciones en tiempos de pandemia* (pp. 95-109). Universidad Autónoma de Chapingo. <https://tinyurl.com/mpzmv9>
- Camacho, R. J. C.; Utrera, Q. F.; Hernández, H. J. E.; Aguirre, E. G. G.; Becerra, P. F.; Fernández, M. E. C.; Zambrano, G. M. A. & Pérez, R. A. (2021). Prevalencia de parasitosis gastrointestinales en dos épocas del año, en ovinos de pelo procedentes del sureste mexicano. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research* 4(4), 4898-4907. <https://tinyurl.com/ykwkvw79>
- Chegwin, A. C. & Nieto, I.J. (2013). Influencia del medio de cultivo en la producción de metabolitos secundarios del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* cultivado por fermentación en estado líquido empleando harinas de cereales como fuente de carbono. *Revista Mexicana de Micología* 37,1-9. <https://tinyurl.com/bdw32kuz>

- Comans-Pérez, R. J.; Sánchez, J. E.; Tawfeeq, L. K.; González-Cortázar, M.; Castañeda-Ramírez, G. S.; Mendoza-de Gives, P.; Sánchez-García, A. D.; Millán-Orozco, J. & Aguilar-Marcelino, L. (2021). Biological control of sheep nematode *Haemonchus contortus* using edible mushrooms. *Biological Control* 152: 104420. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104420>
- COPLADEM (19 de marzo de 2022). *Planes de Desarrollo Municipal 2022-2024*. Comité de Planeación para el Desarrollo del Estado de México. <https://tinyurl.com/4a4ty37m>
- Cruz-Arévalo, J.; Sánchez, J. E.; González-Cortázar, M.; Zamilpa, A.; Andrade-Gallegos, R.H.; Mendoza-de-Gives, P. & Aguilar-Marcelino, L. 2020. Chemical Composition of an Anthelmintic Fraction of *Pleurotus eryngii* against eggs and Infective larvae (L3) of *Haemonchus contortus*. *BioMed Research International* 6:4138950. <http://doi.org/10.1155/2020/4138950>
- Cuevas, P. E. J. (2019) evaluación *in vitro* de extractos crudos de *Pleurotus* sp., y la participación de sus proteínas contra *Haemonchus contortus*. [Tesis de Maestría], Universidad Autónoma del Estado de Morelos. <https://tinyurl.com/bduu4pfb>
- Domínguez-Solís, D.; Martínez-Rodríguez, M.C. & Alvarado-Cardona, M. (2023). Implementación de estrategias para un desarrollo sustentable en México: una reflexión social, política y cultural. *Revista Investigium IRE: Ciencias Sociales y Humanas*, XIV (1), 63-72. <https://doi.org/10.15658/INVESTIGIUMIRE.2314.01.06>
- Ensuncho-Hoyos, C.; Castellano-Coronado, A.; Maza-Ángulo, L.; Bustamante-Yañez, M. & Vergara-Garay, O. (2014). Prevalencia y grado de infección de nematodos gastrointestinales en ovinos de pelo en pastoreo de cuatro municipios de Córdoba, Colombia. *Revista Científica, FCV-LUZ* 24(5), 414-420. <https://tinyurl.com/2uvzr2ek>
- Emery, D. L.; Hunt, P. W. & Le Jambre, L. F. (2016). *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here? *International Journal for Parasitology*, 46 (12): 755–769. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.07.001>
- Herrera-Manzanilla, F. A.; Ojeda-Robertos, N. F.; González-Garduño, R.; Cámara-Sarmiento, R. & Torres-Acosta, J. F. J. (2017). Gastrointestinal nematode populations with multiple anthelmintic resistance in sheep farms from the hot humid tropics of Mexico. *Veterinary Parasitology, Regional Studies and Reports* 9:29-33. <http://doi.org/10.1016/j.vprsr.2017.04.007>
- INEGI (2015). *Aspectos Geográficos*. Estado de México. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. <https://tinyurl.com/5n8hznz7w>

- Liébano, H. E.; López, A. M. E.; Mendoza de G. P. & Aguilar, M. L. (2011). *Manual de Diagnóstico para la identificación de larvas de nematodos gastrointestinales en rumiantes*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), México.
- López-Rodríguez, G., Zaragoza-Bastida, A., Olmedo-Juárez, A., Rosenfeld, M. C., & Rive-ro-Pérez, N. (2023). Gastrointestinal nematodes in sheep and their anthelmintic resistance. A subject under discussion in Mexico. *Journal of the Selva Andina Animal Science*, 10(2), 116-129. <https://doi.org/10.36610/j.jsaas.2023.100200116>
- Magalhães de Matos, A. F. I., Trevisan, L., Giacometi, M., Martins, B.B., Correia, V. F. R., Roulim, S. D. & Gonzalez, M. S. (2020). Nematicidal effect of oyster culinary-medicinal mushroom *Pleurotus ostreatus* (Agaricomycetes) against *Haemonchus contortus*. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 22(11), 1089-1098. <http://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.2020036364>
- Morteo-Gómez, R.; Torres-Hernández, G.; González-Garduño, R.; Becerril-Pérez, C. M.; González-Camacho, J. M.; Díaz-Rivera, P.; Gallegos-Sánchez, J. & Arece-García, J. (2021). Parasitological response of hair sheep to an experimental infection with gastrointestinal nematodes. *Revista Chapingo Serie Agricultura Tropical*, 1(2), 41-55. <http://dx.doi.org/10.5154/r.rchsat.2021.02.04>
- Pérez-Bautista, J. J.; Martínez-Martínez, R.; Hernández-Mogica, M.; González-Lemus, T.; Austria-Hernández I. J. & Mendoza-Pedroza, S.I. (2021). Identification and counting of gastrointestinal parasites in dorper sheep, in Atlapexco, Hidalgo, Mexico. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios, Núm. Esp. II: e2873*. <https://doi.org/10.19136/era.a8nII.2873>
- Pineda-Alegría, J. A.; Sánchez-Vázquez, J. E.; González-Cortazar, M.; Zamilpa, A.; López-Arellano, M. E.; Cuevas-Padilla, E. J.; Mendoza-De-Gives, P. & Aguilar-Marcelino, L. (2017). The Edible Mushroom *Pleurotus djamor* Produces Metabolites with Lethal Activity against the Parasitic Nematode *Haemonchus contortus*. *Journal of Medicinal Food*, 20(12), 1184–1192. <https://doi.org/10.1089/jmf.2017.0031>
- Pineda-Alegría, J. A.; Sánchez, J.E.; Ventura-Zapata, E.; González-Cortázar, M. & Aguilar-Marcelino, L. (2021). Nematicidal Effect of Shiitake (*Lentinula edodes*) Extracts Against *Haemonchus contortus*. *Journal of Medicinal Food* 24(9),953-959. <http://doi.org/10.1089/jmf.2020.0168>
- Rodríguez-Vivas, R.; Pérez-Cogollo, L.; Trinidad-Martínez, I.; Ojeda-Chi, M. & González-Santana, M. (2017). First report of *Nematodirus filicollis* natural infection in a sheep from the Mexican sub-humid tropics, *Revista MVZ Córdoba* 22(3), 6256-6265, <https://doi.org/10.21897/rmvz.1130>

- Salgado-Moreno, S.; Carrillo-Díaz, F.; Escalera-Valente, F. & Delgado-Camarena, C. (2017). Tests to identify resistant sheep to gastrointestinal parasites in San Pedro Lagunillas Nayarit. *Abanico Veterinario*, 7(3), 63-71. <https://doi.org/10.21929/abavet2017.73.7>
- Sánchez-Salgado, S. F.; Castañeda-Ramírez, G. S.; Sánchez, J. E.; Gómez-Rodríguez, O.; Morales-Soto, I. & Aguilar-Marcelino, L. (2021). Actividad nematicida *in vitro* de tres cepas de hongos comestibles de *Pleurotus* spp. contra *Haemonchus contortus* (L3) y *Nacobbus aberrans* (J2). *IBCIENCIAS*, 4(1), 9–13. <https://tinyurl.com/5n83s7pe>
- Sepúlveda-Vázquez, J.; Torres-Acosta, J. F.; Sandoval-Castro, C. A.; Martínez-Puc, J. F., & Chan-Pérez, J. I. (2018). La importancia de los metabolitos secundarios en el control de nematodos gastrointestinales en ovinos con énfasis en Yucatán, México. *Journal of the Selva Andina Animal Science*, 5(2), 79-95. <https://tinyurl.com/48sxdnxu>
- Selemon, M. (2018). Review on Control of *Haemonchus contortus* in Sheep and Goat. *Journal of Veterinary Medicine and Research*, 5(5), 1139. <https://tinyurl.com/4756m94u>
- SIACON-NG (Reporte anual 2020). Producción Pecuaria. Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta. <https://tinyurl.com/3tak9uwt>
- Valdez-Uriostegui, L.A.; Sánchez-García, A.D.; Zamilpa, A.; Sánchez, J.E.; González-Garduño, R.; Mendoza-de Gives, P.; Castañeda-Ramírez, G.S.; González-Cortázar, M. & Aguilar-Marcelino, L. (2021). *In vitro* evaluation of hydroalcoholic extracts of mycelium, basidiomata and spent substrate of *Pleurotus ostreatus* against *Haemonchus contortus*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 24, ID 62: 1-10. <https://tinyurl.com/4tfrb9z7>
- Vega, O. C. (2016). *Comparación de la producción de metabolitos secundarios bioactivos con dos fuentes de carbono en la fermentación líquida de una especie de Pleurotus y su uso potencial en un alimento tipo funcional*. [Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia]. <https://tinyurl.com/58vft5mc>
- Zaragoza-Vera, M.; Torres-Chable, O. M.; Arjona-Jiménez, G. & Zaragoza-Vera, C. V. (2021). Factors affecting the immune response of hairy lambs on the first infection with gastrointestinal nematodes in a hot humid climate in Mexico. *Revista Chapingo Serie Agricultura Tropical*, 1(1), 19–36. <http://dx.doi.org/10.5154/r.rch-sat.2021.01.02>