



Fórum micológico

## Hongos nematófagos utilizados para el control biológico de nematodos gastrointestinales en el ganado y sus formas de administración

María Federica Sagüés<sup>a,b,\*</sup>, Peter Purslow<sup>c</sup>, Silvina Fernández<sup>d</sup>, Luis Fusé<sup>a</sup>, Lucía Iglesias<sup>a</sup> y Carlos Saumell<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Área de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil, Argentina

<sup>b</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), Argentina

<sup>c</sup> Department of Food Science, Ontario Agricultural College, University of Guelph, Canada

<sup>d</sup> BioNem Research Centre, Guelph, Canada

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

*Historia del artículo:*

Recibido el 7 de abril de 2011

Aceptado el 22 de junio de 2011

On-line el 7 de julio de 2011

*Palabras clave:*

Control biológico

Hongos nematófagos

Nematodos gastrointestinales

Administración

### R E S U M E N

En la actualidad el control de los nematodos gastrointestinales se realiza casi exclusivamente con moléculas antihelmínticas. La inadecuada utilización ha generado resistencia en algunos géneros parasitarios. Sumado a la preocupación de consumir alimentos inocuos en pro de la salud humana, se ha estimulado el desarrollo de otros métodos de control para las larvas gastrointestinales, tales como el control biológico, basado en el uso de enemigos naturales de las larvas de los nematodos. Entre los enemigos naturales de las larvas de nematodos gastrointestinales el más frecuentemente utilizado es el hongo *Duddingtonia flagrans*. Este tiene la capacidad de reducir el número de larvas de nematodos en materia fecal, y sus clamidosporas, así como de atravesar el tracto gastrointestinal y mantener su capacidad germinativa, facilitando así la posibilidad de desarrollar diferentes formas de administración. En esta revisión se mencionan las especies de hongos utilizadas hasta el momento y se discuten las distintas formas de administración de hongos nematófagos ensayadas hasta el momento.

© 2011 Revista Iberoamericana de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

### Nematophagous fungi used for the biological control of gastrointestinal nematodes in livestock and administration routes

#### A B S T R A C T

The control of gastrointestinal nematodes relies at present mostly on antihelmintic treatments using synthetic molecules. This approach, however, has led to the appearance of resistance to some types of antihelmintics which, together with the need to cut down on the use of chemicals, has fostered the development of other control methods, such as biological control, which is the use of living organisms that are naturally antagonistic to an unwanted species. Among the natural enemies of nematode parasitic larvae is the microfungus *Duddingtonia flagrans*. Research has shown the ability of this fungus to reduce the number of nematode larvae in faeces, the ability of its chlamydo-spores to survive the passage through the gastrointestinal tract of livestock and, moreover, to keep its germinative ability, thus facilitating the development of formulations. The present review looks at the species currently used and the different ways of administering already tested nematophagous fungi.

© 2011 Revista Iberoamericana de Micología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

La cría de bovinos y ovinos en sistemas pastorales se caracteriza por una producción sobre pasturas, donde las afecciones por parásitos internos causan pérdidas económicas<sup>22</sup>. El uso inadecuado de antihelmínticos como medida de control ha

generado un aumento progresivo de casos de resistencia múltiple a distintos especies de endoparásitos, junto a la posibilidad de crear desequilibrios ecológicos y ocasionar la presencia de residuos de pesticidas en carne, leche y lana<sup>27</sup>.

En la actualidad se están investigando y poniendo a punto alternativas adicionales para el control de las parasitosis gastrointestinales, tales como la resistencia genética del ganado, inmunológica, nutricional, administración de vegetales

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: federica@vet.unicen.edu.ar (M.F. Sagüés).

antihelmínticos, nutracéuticos y el control biológico (CB). Este último constituye una de las estrategias más prometedoras para un control sustentable de los nematodos gastrointestinales<sup>13</sup>. La búsqueda de formulaciones que vehiculicen su uso como método de control es motivo de investigación.

### Control biológico

Grønbold et al.<sup>12</sup> definen el CB como un método ecológico diseñado por el hombre para disminuir las poblaciones parasitarias a un nivel subclínico aceptable, conservando estas poblaciones en un nivel no perjudicial gracias a antagonistas vivos naturales.

Resulta fundamental entender el CB como una medida reguladora cuyo objetivo no es acabar con el organismo blanco, sino controlar su población para reducir sus efectos nocivos<sup>19</sup>, diferenciándose de los antihelmínticos, que fueron elaborados con el propósito de eliminar la totalidad de los parásitos sobre el animal.

Entre los distintos organismos estudiados como posibles agentes de CB se encuentran artrópodos coprófagos, bacterias y hongos. En estos últimos, existen hifomicetos (conocidos como hongos nematófagos) capaces de atrapar y digerir las formas libres de los nematodos en el suelo<sup>18</sup>. Muchos de estos hongos producen esporas de resistencia o tienen fases saprofitas en ausencia de sus hospedadores. Además, no son patógenos para los organismos que no son su blanco<sup>7</sup>.

Existen más de 200 especies de hongos nematófagos descritas; la mayoría pertenecen a los denominados hongos imperfectos o *Deuteromycetes*. Dichos hongos constituyen un grupo heterogéneo y ubicuo, viviendo normalmente en forma saprofitica y ocupando diferentes nichos en el suelo, donde también pueden alimentarse de una amplia gama de nematodos de vida libre, ya sea como recurso principal o secundario<sup>28</sup>.

En función del modo en que utilizan a los nematodos como recurso nutritivo, los hongos nematófagos se dividen en tres grupos: endoparásitos, ovicidas y depredadores.

#### Endoparásitos

Sus hifas crecen únicamente dentro del nematodo, excepto las hifas fértiles que crecen en el exterior<sup>3</sup>. Según la especie, las esporas pueden ser ingeridas para penetrar en el interior del nematodo y posteriormente germinar; las esporas se pueden adherir y perforar la cutícula del nematodo, o pueden presentar zoosporas móviles, que parecen tener un tropismo positivo hacia los nematodos. Ensayos in vitro realizados con las especies *Harposporium anguillulae*<sup>6</sup> y *Drechmeria coniospora*<sup>33</sup> demostraron una alta eficacia en la disminución de larvas en cultivos. Sin embargo, el carácter de parásito obligado de este grupo de hongos limita su empleo como agentes de CB ya que su dispersión únicamente se realiza por contacto directo entre individuos parasitados<sup>19</sup>, precisan de un medio con alta concentración de agua para difundirse y aquellos que deben ser ingeridos solo serían activos contra los estadios parasitarios de larva 1 (L1) y larva 2 (L2), que son los que se alimentan, y no sobre la larva 3 (L3) infectante que, al presentar cutícula doble, no se alimenta, por lo tanto no sería atacada.

#### Ovicidas

Los hongos ovicidas pueden ser usados para el CB de nematodos parásitos y especialmente nematodos fitopatógenos (patógenos de las plantas). En su mayoría son saprófitos, por lo que no dependen de la presencia de huevos del medio. La mayoría de los estudios se han enfocado en la colonización de muestros conteniendo nematodos fitopatógenos. Existe un pequeño grupo de hongos especializados en el parasitismo de huevos de nematodos parásitos, entre los que se encuentra *Verticillium chlamydosporium*, capaz de

infectar huevos de *Ascaris lumbricoides* in vitro<sup>20</sup>. Lysek y Sterba propusieron dos mecanismos de acción de penetración del hongo en el huevo: a través de una simple penetración de la hifa vegetativa a través de la cáscara del huevo, o a través de la formación de un órgano específico de penetración (apresorio) en el sitio de contacto de la hifa con la cáscara del huevo.

Gortari et al.<sup>11</sup> aislaron de un paseo público de Argentina varios géneros de hongos ovicidas, de los cuales el que mejor demostró capacidad para infectar huevos de *Toxocara* spp. fue *Paecilomyces lilacinus*. Ensayos in vitro realizados con la especie *Pochonia chlamydosporia* demostraron que este hongo destruye eficazmente huevos de *Trichuris vulpis* y que puede contribuir a disminuir la contaminación ambiental<sup>36</sup>.

#### Depredadores

Son hongos saprófitos que forman un sistema micelial extensivo en el medio y emplean como recurso nutritivo las fases de vida libre de los nematodos. Algunos de los géneros más importantes dentro de este grupo son *Arthrobotrys*, *Dactylaria*, *Dactylella* y *Monacrosporium*<sup>21-31</sup>. A través de diferentes mecanismos, que van desde la producción de un material adhesivo sobre las hifas hasta la formación de complejos anillos constrictores, los hongos depredadores son capaces de atrapar y consumir los estadios larvarios de los nematodos presentes en el suelo y en las heces.

Un grupo abundante de hongos depredadores utiliza como estrategia de captura la formación de redes tridimensionales adhesivas. Toda la red está cubierta por una capa mucilaginoso a la que quedan adheridos los nematodos y cuya producción parece estar estimulada por el forcejeo de los nematodos atrapados<sup>29</sup>. La forma de una fuerza mecánica (órganos de captura) y la liberación de enzimas hidrolíticas extracelulares tales como proteasas séricas<sup>41-43</sup>, quitinasas<sup>40</sup> y colagenasas<sup>9</sup> que digieren la cutícula del nematodo (compuesta principalmente por proteínas). Una hora después de la penetración, el hongo forma un bulbo infectivo en el interior del nematodo<sup>35</sup> y en pocas horas ocupa completamente el cuerpo de este. El proceso de digestión puede llegar a durar hasta una semana, tras lo cual la hifa trófica se lisa y el hongo se desarrolla en nuevo saprofiticamente, hística que la presencia de nematodos en el medio estimula nuevamente su actividad depredadora<sup>29</sup>.

Los géneros de nematodos parásitos de los animales domésticos, cuyas larvas son más móviles (*Cooperia*, *Ostertagia*, *Haemonchus* y *Cyathostomas*), estimulan una mayor producción de redes tridimensionales que aquellas larvas de movimientos más lentos, como son *Oesophagostomum* y *Nematospirides*<sup>24</sup>. Las L1 y las L2 son más lentas en sus movimientos pero más susceptibles de morir rápidamente que las L3, las que al mantener la vaina de la L2 obtienen más protección y son más resistentes a la mortalidad<sup>25</sup>.

En la búsqueda de hongos nematófagos para el control de los nematodos gastrointestinales, la mayoría de los trabajos se han centrado en las especies depredadoras, ya que su carácter saprofitico permite su aislamiento y mantenimiento en cultivos puros, facilitando así su producción en el laboratorio. Estos hongos han sido aislados en gran variedad de hábitats, especialmente en medios ricos en materia orgánica, como el estiércol, el abono o los pastos<sup>5-14</sup>. Entre las especies conocidas de hongos nematófagos, *Duddingtonia flagrans* cumple con todas las características antes descritas y, además, tiene la capacidad de atravesar el tracto gastrointestinal de los bovinos<sup>17</sup> y otras especies domésticas, como equinos<sup>16</sup>, cerdos<sup>26</sup> y ovinos<sup>10</sup>, pudiendo germinar y luego reducir el número de larvas infectantes en materia fecal. Supervivencia en el tracto gastrointestinal se debe a que sus clamidosporas (esporas de resistencia) presentan una gruesa pared que les permite tolerar las condiciones extremas<sup>18</sup>.

La temperatura óptima para el crecimiento y función predatora del hongo se sitúa entre 10 y 30 °C, alcanzando su máxima actividad para la formación de redes entre 25 y 28 °C<sup>12-29</sup>. Otros factores tales como luz, humedad, pH y la presencia de oxígeno, pueden también influir en la formación de elementos de captura.

Cualquier agente de CB debe resultar inocuo para el medio ambiente, por este motivo se ha de valorar si la presencia masiva de clamidosporas en las heces alterar el equilibrio natural del ecosistema. Yeates et al.<sup>42</sup> observaron que la presencia de *D. flagrans* no provocó cambios en la fauna de nematodos del suelo, y concluyeron que el uso del hongo no tiene efectos ambientales adversos. Así, también Hay et al.<sup>14</sup>, Saumell et al.<sup>34</sup> y Knox et al.<sup>15</sup> demostraron no solo que el uso masivo de clamidosporas de *D. flagrans* no produce efectos adversos en el ambiente, sino además que el hongo no sobrevive largos períodos en el mismo.

La función que debe cumplir *D. flagrans* u otras especies de hongos nematófagos como agentes de CB debería tomarse como una medida profiláctica, ya que su acción se ve limitada a los estadios de vida libre de los nematodos gastrointestinales, por lo que debe combinarse con otras estrategias de control que actúen sobre las fases de vida parasitaria.

Si bien es indudable que *D. flagrans* es el hongo con mayor potencial, otras especies también han demostrado eficacia. Entre estas especies, por ejemplo, están *Monacrosporium thaumasium*<sup>37</sup>, *Arthrobotrys oligospora*<sup>4</sup> y *Arthrobotrys conoides*<sup>8</sup>.

### Formas de administración de los hongos nematófagos

Entre las formas de administración evaluadas hasta el momento se encuentran:

#### a) Granos de cereales con los hongos

Los granos de cereales ofrecen un sustrato ideal para el crecimiento y producción de gran cantidad de esporas de hongos nematófagos. Waller et al.<sup>39</sup> administraron diariamente 5 g de cebada con  $3 \times 10^6$  clamidosporas durante 5 días, resultando suficiente para disminuir el número de larvas en materia fecal, cuando la misma fue cultivada en agar agua. Este método puede llegar a utilizarse en sistemas intensivos o cuando el encierre diario de los animales forma parte de la rutina de manejo. Otra opción de aplicación sería para suplementar períodos nutricionalmente críticos para los animales, tales como el destete y el parto, períodos en que la excreción de huevos de parásitos por materia fecal es mayor.

#### b) Bloques minerales

*D. flagrans* fue incorporado con éxito en bloques minerales. Waller et al.<sup>39</sup> usaron ovinos con éxito para acostumbrar a consumir el bloque antes del inicio del tratamiento. Los bloques eran pesados durante el transcurso del ensayo para determinar el consumo diario. *D. flagrans* sobrevivía en el bloque mineral un mínimo de 18 semanas, cuando era almacenado a 4 °C. Un importante punto a considerar es el tiempo de vida de los esporos en los bloques debido a su posible germinación si existiera humedad en el ambiente.

Las ventajas que presenta la administración de bloques minerales conteniendo clamidosporas de *D. flagrans* son el bajo coste y el doble propósito de su fabricación, que es la de ser un suplemento nutricional y un vehículo para los hongos nematófagos al mismo tiempo. Las desventajas de esta forma de administración son la variación que existe en su consumo por los animales, y que debe almacenarse en un lugar fresco (4 °C) para evitar la absorción de humedad y la germinación de las clamidosporas, con la consecuente pérdida de la eficacia del bloque<sup>39</sup>. Los bloques minerales con clamidosporas podrían ser una forma de administración en sistemas productivos donde los animales son criados a pasto, y podrían administrarse en los períodos de máxima

contaminación de las pasturas para evitar así los picos de infectividad larvaria.

#### c) Bloques energéticos

Sagüés et al.<sup>32</sup> incorporaron clamidosporas de *D. flagrans* en bloques energéticos. Los autores evaluaron a través de un test de eficacia en ovinos la administración del mismo. Dos superficies con pasturas fueron contaminadas a partir de animales parasitados. Una superficie alimentó animales que recibieron bloques con hongos y la otra animales que recibieron bloques sin hongos. Posteriormente, los animales fueron retirados y se colocaron dos grupos de animales libres de parásitos que permanecieron un mes pastoreando. Finalizado este período, se sacrificaron los animales para determinar el número y las especies de nematodos presentes en el tracto gastrointestinal. El porcentaje de eficacia del hongo sobre el total de la población parasitaria susceptible fue del 92%. Los bloques minerales como forma de administración de agentes de CB podrían utilizarse en producciones de animales donde los animales son criados a pasto y su administración podría realizarse en los momentos en que la contaminación de la pastura es un riesgo para la salud animal.

#### d) Pellets de alginato

Otra forma de administración estudiada con éxito en varias especies de animales domésticos es la incorporación de hongos nematófagos en pellets de alginato de sodio. Estudios realizados por Araújo et al.<sup>2</sup> demostraron que la incorporación de estos hongos en los pellets no afectó su capacidad predatora. Las especies de hongos nematófagos incorporadas con éxito en los pellets fueron *Monacrosporium thaumasium*<sup>1-37</sup> y *Arthrobotrys robusta*<sup>2</sup>. Después de administrar pellets conteniendo *A. robusta* por vía oral a bovinos, Araújo et al.<sup>2</sup> lograron aislarlo en materia fecal, demostrando así que el pasaje a través del tracto gastrointestinal no afectó la capacidad predatora de ese hongo.

Ribeiro Braga et al.<sup>30</sup> y Tavela et al.<sup>37</sup> incorporaron *D. flagrans* y *M. thaumasium*, respectivamente, en pellets de alginato. Estos pellets fueron administrados a equinos para probar de esta manera el control de larvas de *Cyathostomas*. Las yeguas utilizadas recibieron una dosis oral de 1 g de pellets por 10 kilogramos de peso vivo una vez a la semana durante 6 meses, demostrando reducciones significativas en el número de huevos de nematodos en materia fecal y de larvas de coprocultivos. La reducción significativa del número de larvas de *Cyathostomas* usando pellets de alginato conteniendo *D. flagrans* y *M. thaumasium* hace que este tipo de tratamiento efectivo pueda ser usado como una herramienta para el CB de nematodos parásitos en equinos.

#### e) Bolos de liberación controlada

Otra forma de administración de hongos nematófagos puede ser a través de bolos de liberación controlada (BLC), en forma de dispositivos intrarruminales. Estudios realizados por Waller et al.<sup>38</sup> demostraron que las clamidosporas de *D. flagrans* fueron capaces de sobrevivir las presiones de fabricación al ser incorporadas dentro de matrices en la elaboración de prototipos intrarruminales de BLC. Los estudios in vitro demostraron que las clamidosporas permanecieron viables durante 9 meses dentro de los BLC almacenados a 4 °C. En estudios in vivo se observó que los bolos liberaron clamidosporas viables de forma constante hasta 23 días, tras su colocación en el rumen; después de ese período el dispositivo se humedeció en el centro y dejó de liberar clamidosporas correctamente.

Sería deseable lograr que los BLC liberasen  $5 \times 10^6$  clamidosporas por día durante 90 días. En el futuro se podrían usar los BLC si la contaminación de las pasturas resultase riesgosa por la posible aparición de altas cantidades de larvas infectivas en el pasto. La liberación de las clamidosporas por materia fecal sería entonces efectiva para disminuir el número de larvas migrando desde la materia fecal hacia las pasturas.

## Conclusiones y perspectivas

Debido al rápido incremento de casos de resistencia antihelmíntica y a la creciente demanda por consumir alimentos inocuos para la salud humana y que sean obtenidos con tecnologías amigables con el medio ambiente, es necesario encontrar una alternativa para el control de las parasitosis gastrointestinales en los rumiantes. Las investigaciones actuales se están centrando en la obtención de una forma de administración que sirva como vehículo para los hongos nematófagos capaces de atrapar y destruir larvas de nematodos gastrointestinales en la materia fecal. Por otro lado, *D. flagrans* no es la única especie capaz de realizar el CB de nematodos gastrointestinales, como ha sido demostrado. En consecuencia, estudios con otras especies deberán ser estimulados.

Sabemos que el CB no elimina la totalidad de los parásitos, sin embargo, habrá que evaluar su uso y conveniencia considerando que, a pesar de no actuar como los antihelmínticos, eliminando más del 90% de los parásitos adultos en el animal, el CB aplicado a campo ha demostrado valores de eficacia entre el 60 y 90% sobre la población de larvas infectantes sobre la pastura. Dado que más del 95% de la población total de parásitos se encuentra en el ambiente, el CB actuaría sobre el punto de mayor importancia para el control de los nematodos gastrointestinales.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Bibliografía

- Araújo JV, Sampaio WM, Vasconcelos RS, Campos AK. Effects of different temperatures and mineral salt on pellets of *Nematostium thamasium* - a nematode-trapping fungus. Vet Archiv. 2000;70:181-90.
- Araújo JV, Stephano MA, Sampaio WM. Effects of temperature, mineral salt and passage through the gastrointestinal tract of calves on sodium alginate formulation of *Arthrobotrys robusta*, a nematode-trapping fungus. Rev Parasitol Vet. 2000;9:55-9.
- Barron GL. The nematode destroying fungi. Guelph: Canadian Biological Publication; 1977, 140.
- Bird J, Herd RP. *In vitro* assessment of two species of nematophagous fungi (*Arthrobotrys oligospora* and *Arthrobotrys flagrans*) to control the development of infective cyathostome larvae from naturally infected horses. Vet Parasitol. 1995;56:181-7.
- Bird J, Larsen M, Nansen P, Kraglund HO, Grønvold J, Henriksen SA, et al. Dung-derived biological agents associated with reduced numbers of infective larvae of equine strongyles in faecal cultures. J Helminthol. 1998;72:21-6.
- Charles TP, Roque MV, Santos CD. Reduction of *Haemonchus contortus* infective larvae by *Harposporium anguillulae* in sheep faecal culture. Int J Parasitol. 1996;26:509-10.
- Deschênes R. Innocuité des Hyphomycètes prédateurs de nématodes pour la végétation des pâturages et pour le bétail. Comp Rend Séan Soc Biol. 1939;135:830-2.
- Etchepare J, Fusé L, Freije E, Saumell C. Eficacia de *Arthrobotrys conoides* y *Duddingtonia flagrans* en la reducción de L<sub>3</sub> de trichostrongilideos tras el pasaje por el tracto gastrointestinal en ovinos con infección natural [tesis de grado]. Tandil, Argentina: Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires; 2004.
- Galper S, Cohn E, Spiegel Y, Chet I. A collagenolytic fungus, *Cunninghamella elegans*, for biological control of plant-parasitic nematodes. J Nematol. 1991;23:269-74.
- Githigia SM, Thamsborg SM, Larsen M, Kyvsgaard NC, Nansen P. The preventive effect of the fungus *Duddingtonia flagrans* on trichostrongyle infections of lambs on pasture. Int J Parasitol. 1997;27:931-9.
- Gortari C, Cazau C, Hours R. Hongos nematófagos de mucos de *Toxocara canis* en un paseo público de La Plata, Argentina. Rev Iberoam Micol. 2007;24:24-8.
- Grønvold J, Nansen P, Henriksen SA, Larsen M, Wolstrup J, Bresciani J, et al. Induction of traps by *Ostertagia ostertagi* larvae, chlamydospore production and growth rate in the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*. J Helminthol. 1996;70:291-7.
- Grønvold J, Wolstrup J, Nansen P, Larsen M, Henriksen SA, Bjørn H, et al. Biotic and abiotic factors influencing growth rate and production of traps by the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* when induced by *Cooperia oncophora* larvae. J Helminthol. 1999;73:129-36.
- Hay FS, Narvaez JH, Miller C, Bateson L, Robertson H. Infestation of sheep dung by nematophagous fungi and implications for the control of free-living stages of gastrointestinal nematodes. Vet Parasitol. 1997;70:247-54.
- Konx MR, Josh PF, Anderson LJ. Deployment of *Duddingtonia flagrans* in an improved pasture system: dispersal and persistence of the fungus on free-living soil nematodes and microarthropods. Biol Control. 2002;24:176-82.
- Larsen M, Nansen P, Henriksen SA, Wolstrup J, Grønvold J, Zorn A, et al. Predacious activity of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against cyathostome larvae in faeces after passage through the gastrointestinal tract of horses. Vet Parasitol. 1995;60:315-20.
- Larsen M, Wolstrup J, Henriksen SA, Grønvold J, Nansen P. *In vivo* passage through calves of nematophagous fungi selected for biocontrol of parasitic nematodes. J Helminthol. 1992;66:137-41.
- Larsen M. Biological control of helminths. Int J Parasitol. 1999;29:139-46.
- Larsen M. Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious micro fungi. Parasitology. 2000;120:121-31.
- Lysek H, Sterba J. Colonization of *Ascaris lumbricoides* eggs by the fungus *Verticillium chlamydosporium* goddard. Folia Parasit. 1991;38:255-9.
- Mankau R. Biocontrol: parasiti as nematode control agent. J Nematol. 1980;12:244-52.
- McLeod RS. Cost of major parasites to the Australian livestock industries. Int J Parasitol. 1995;25:1363-7.
- Morgan M, Behnke JM, Lucas JA, Peberdy JF. *In vitro* assessment of the influence of nutrition, temperature and larval density on trapping of the infective larvae of *Heligmosomoides polygyrus* by *Arthrobotrys oligospora*, *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium megalosporium*. Parasitology. 1997;115:303-10.
- Nansen P, Grønvold J, Henriksen SA, Wolstrup J. Interactions between the predacious fungus *Arthrobotrys oligospora* and third-stage larvae of a series of animal-parasitic nematodes. Vet Parasitol. 1988;26:329-37.
- Nansen P, Grønvold J, Henriksen SA, Wolstrup J. Predacious activity of the nematode-destroying fungus *Arthrobotrys oligospora*, on preparasitic larvae of *Cooperia oncophora* and on soil nematodes. Proc Helm Soc Wash. 1986;53:237-43.
- Nansen P, Larsen M, Roepstorff A, Grønvold J, Wolstrup J, Henriksen SA. Control of *Oesophagostomum dentatum* and *Hyostrongylus rubidus* in outdoor-reared pigs by daily feeding with the microfungus *Duddingtonia flagrans*. Parasitol Res. 1996;82:580-4.
- Nari A, Hansen JW. Resistance of ecto- and endo-parasites: current and future solutions, 67th General Session. International Committee. Paris: Office International des Epizooties; 1999. p. 17-21.
- Nordbring-Hertz B, Jansson HB, Tunlid A. Nematode Parasitology. En: Encyclopedia of Life Science(c). Weinheim: Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing; 2006. p. 1-11. Disponible en: [www.els.net](http://www.els.net).
- Nordbring-Hertz B, Stalhammer-Carlemalm M. Capture of nematodes by *Arthrobotrys oligospora*, an electron-microscope study. Canad J Bot. 1978;56:1297-307.
- Ribeiro Braga F, Araújo JV, Silva AR, Araujo JM, Carvalho RO, Araujo AO, et al. Biological control of horse cyathostomins (Nematoda: Cyathostominae) using the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in tropical southeastern Brazil. Vet Parasitol. 2009;163:335-40.
- Rubner A. Revision of predacious hyphomycetes in the *Dactylella-Monacrosporium* complex. Stud Mycol. 1996;39:1-134.
- Sagués MF, Fusé LA, Fernández AS, Iglesias LE, Moreno FC, Saumell CA. Efficacy of an energy block containing *Duddingtonia flagrans* in the control of gastrointestinal nematodes of sheep. Parasitol Res. 2011. doi: 10.1007/s00436-011-2302-y.
- Sant'Ana CP, Charles TP. Efeito da aplicação de conídios de *Drechmeria coniospora* em cultivos de fezes contendo ovos de *Haemonchus contortus*. Arq Bras Med Vet Zootec. 1995;47:123-8.
- Saumell CA, Echeverría F, Gonçalves I, Iglesias L, Rodríguez E, Padilla T. Absence of environmental impact of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans*. 18th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, 26-30 August 2001, Stresa, Italy. Abstracts. p. 128.
- Shepherd A. Formation of the infection bulb in *Arthrobotrys oligospora*. Nature. 1955;175:475.
- Silva AR, Araújo JV, Braga FR, Alves CDF, Frassy LN. *In vitro* ovicidal activity of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thamasium* and *Pochonia chlamydosporium* on *Trichuris vulpis* eggs. Vet Parasitol. 2010;172:76-9.
- Tavela AO, Araújo JV, Ribeiro Braga F, Silva AR, Carvalho RO, Araujo JM, et al. Biological control of cyathostomins (Nematoda: Cyathostominae) with nematophagous fungus *Monacrosporium thamasium* in tropical southeastern Brazil. Vet Parasitol. 2011;175:92-6.
- Waller PJ, Faedo M, Ellis K. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: towards the development of a fungal controlled release device. Vet Parasitol. 2001;102:299-308.
- Waller PJ, Knox MR, Faedo M. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: feeding and block studies with *Duddingtonia flagrans*. Vet Parasitol. 2001;102:321-30.
- Yang J, Gan Z, Lou Z, Tao N, Mi Q, Liang L, et al. Crystal structure and mutagenesis analysis of chitinase CrChi1 from the nematophagous fungus *Clonostachys rosea* in complex with the inhibitor caffeine. Microbiology. 2010;156:3566-74.



41. Yang JK, Huang XW, Tian BY, Sun H, Duan JX, Wu WP, et al. Characterization of an extracellular serine protease gene from the nematophagous fungus *Lecanicillium psalliotae*. *Biotechnol Lett*. 2005;27:1329–34.
42. Yeates GW, Waller PJ, King L. Soil nematodes as indicators of the effect of management on grass-lands in the New Tablelands: effect of measures for control of parasites of sheep. *Pedobiología*. 1997;41:537–48.
43. Zou CG, Xu YF, Liu WJ, Zhou W, Tao N, Tu HH, et al. Expression of a serine protease gene prC is up-regulated by oxidative stress in the fungus *Clonostachys rosea*: implications for fungal survival. *PLoS ONE*. 2010;5:e13386.