

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE
HUAMANGA**

(Segunda Universidad Fundada en el Perú)

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

**Escuela de Formación Profesional de Medicina
Veterinaria**



**ACTIVIDAD LETAL *IN VITRO* DEL EXTRACTO
PROTEICO TOTAL DE *Bacillus thuringiensis* SOBRE
HUEVOS Y LARVAS (L3) INFECTIVAS DE *Nematodirus
spathiger* – AYACUCHO 2011.**

Tesis para obtener el Título Profesional de:

MÉDICO VETERINARIO

Presentado por:

ADOLFO ALFREDO OCHOA SILVERA

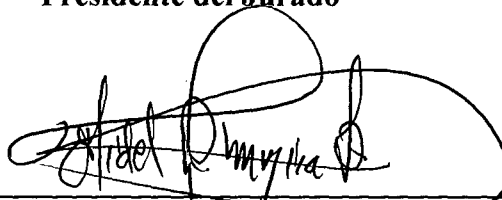
**AYACUCHO – PERÚ
2014**

**“ACTIVIDAD LETAL *IN VITRO* DEL EXTRACTO PROTEICO
TOTAL DE *Bacillus thuringiensis* SOBRE HUEVOS Y LARVAS (L3)
INFECTIVAS DE *Nematodirus spathiger* –AYACUCHO 2011”**

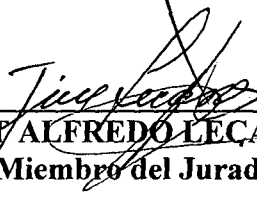
Recomendado : 13 de marzo de 2013
Aprobado : 18 de agosto de 2014



Mg. CARLOS ALBERTO PISCOYA SARMIENTO
Presidente del Jurado



Blgo. FIDEL MUJICA LENGUA
Miembro del Jurado



M.V. JIM HERBERT ALFREDO LECAROS DE CORDOVA
Miembro del Jurado



M.V. GLORIA BETTI ADRIANZEN FACUNDO
Miembro del Jurado

Dr. ROMULO AGUSTIN SOLANO RAMOS
Decano de la Facultad de Ciencias Agrarias

DEDICATORIA

Para ti, Dios mío, y a mis padres,
Adolfo y Rina impulsores de mi vida.

A mis hermanos Manuel y Miguel,
compañeros de mi vida y motivo de mi
superación personal.

A todos aquellos lectores que cuidan
del futuro de nuestro planeta.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga por acogerme en su seno donde aprendí y me instruí para mi desenvolvimiento profesional.

A la Facultad de Ciencias Agrarias y la Escuela de Formación Profesional de Medicina Veterinaria, por haberme formado como profesional.

A los docentes de la Escuela de Formación Profesional de Medicina Veterinaria, de quienes aprendí a ver que la medicina veterinaria es más que una profesión, es el arte de hacer ciencia e investigación.

A mis asesores, Blgo. Fidel Rodolfo Mujica Lengua y a la M.V.Z. Magaly Rodríguez Monje por ser tan pacientes y persistentes, y ayudarme a culminar mi trabajo.

Al Dr. Abad Flores Paucarima del Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología de la UNMSM, y quien me brindó ayuda y consejos desinteresados para mi investigación.

A la Blga. Mg. Martha Esther Valdivia Cuya, Decana de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM, por su gran apoyo durante la obtención de reactivos para laboratorio.

Al M.V. Julio Cesar Soto Palacios, por brindarme apoyo en la recolección de muestras en el Centro de Beneficio de Quicapata.

Al M.V. William Palomino Conde, quien me brindó ayuda y consejos en el diseño estadístico de mi tesis.

INDICE

	Pág.
RESUMEN	01
INTRODUCCIÓN	03
CAPÍTULO I: REVISION DE LITERATURA	05
1.1. Generalidades	05
1.2. Las gastroenteritis parasitarias en rumiantes	07
1.2.1. Infestaciones del abomaso	08
1.2.2. Infestaciones intestinales por tricostrongiloides	09
1.2.3. Reducción de la productividad	09
1.3. Generalidades de <i>Nematodirus spathiger</i>	10
1.3.1. Taxonomía	10
1.3.2. Ciclo biológico	10
1.3.3. Epidemiología	13
1.3.4. Patogenia	15
1.3.5. Signos clínicos	15
1.4. Principales formas de control	15
1.4.1. Control químico	15
1.4.2. Control biológico	20
1.5. El nematocida específico <i>Bacillus thuringiensis</i>	21
1.5.1. Patogenicidad de <i>Bacillus thuringiensis</i>	24
1.5.2. Efecto biolarvicida sobre larvas de nematodos	26
CAPÍTULO II: MATERIALES Y METODOS	28
2.1. Lugar y duración del trabajo	28
2.2. Procedimiento o metodología	28
2.2.1. Infección experimental de un ovino joven	28
2.2.2. Obtención de huevos de <i>Nematodirus spathiger</i>	29
2.2.3. Obtención de larvas infectivas de <i>N. spathiger</i>	31
2.2.4. Obtención del extracto proteico total de <i>B. thuringiensis</i>	33
2.2.5. Conteo de los nemátodos	35
2.2.6. Efecto ovicida y larvicida <i>in vitro</i> de <i>B. thuringiensis</i>	35
2.2.7. Análisis estadístico	37
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
3.1. Concentración proteica de las cinco variedades de <i>B.th</i>	38
3.2. Conteo de los nemátodos	39
3.3. Efecto ovicida y larvicida <i>in vitro</i> de <i>B. thuringiensis</i>	40
3.3.1. Efecto ovicida <i>in vitro</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i>	40
3.3.2. Efecto larvicida <i>in vitro</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i>	56
CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES	79
CAPÍTULO V: RECOMENDACIONES	80
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
ANEXOS	85

RESUMEN

El control del parasitismo gastrointestinal en rumiantes con antihelmínticos químicos tradicionales, viene ocasionando peligrosos efectos adversos en los ecosistemas naturales, el surgimiento de la resistencia antihelmíntica y efectos nocivos sobre organismos no blanco. Ante este problema se renueva el interés por la búsqueda de alternativas de control de nemátodos gastrointestinales, en concordancia con el equilibrio del medio ambiente y el desarrollo sustentable.

La actividad nematicida del extracto proteico total de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) contra huevos y larvas L3 infectivas de *Nematodirus spathiger* (*Ns*) fue evaluado en pruebas *in vitro*. Los huevos o larvas L3 infectivas de *Ns* fueron colocados junto a 1.2 ml de la suspensión del extracto proteico total de *Bt* en placas de Petri considerando 10 repeticiones y el mismo número de repeticiones con solo nemátodos, para el grupo control. Las placas de Petri se incubaron a 24, 48 y 72 h a 25°C.

Se comprobó que los huevos y larvas L3 infectivas de *Ns* son susceptibles al efecto nematicida de *Bt*, a las 24, 48 y 72 h post enfrentamiento al extracto proteico total de *Bt*. Es así, que la variedad con mayor efecto nematicida obtenido es *Bt* variedad *kurstaki* (HD-1), con una concentración proteica de 5.042 mg/ml produciendo a las 72 horas de enfrentamiento una mortalidad de 44.7% en huevos de *Ns*, y de 45.6% en larvas L3 infectivas de *Ns*. En contraste, una inconsistente actividad ovicida y larvicida se observó con las variedades de *Bt* variedad *thompsoni* (HD-542), *Bt* variedad *neoleonensis* (T-24-001), *Bt* variedad

israeliensis (HD-500) y *Bt* variedad *israeliensis* (WHO-2013-9). El extracto proteico total de *Bt* variedad *kurstaki* HD-1, contiene las toxinas nematocidas que pudieran ser empleadas para el futuro en pruebas *in vivo* con animales infectados experimentalmente con *Ns* para explorar la posibilidad de usarlo como una herramienta antihelmíntica de tipo biológico.

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis*, *Nematodirus spathiger*, control biológico.

INTRODUCCIÓN

La crianza de especies rumiantes como vacunos, ovinos, caprinos y los camélidos sudamericanos en los andes peruanos, constituye una importante fuente de ingresos económicos para los ganaderos; sin embargo, son las enfermedades ocasionadas por los parásitos gastrointestinales las que generan bajos rendimientos en la producción lechera, cárnica y lana, siendo su tratamiento costoso y en algunas ocasiones ineficaz.

El tratamiento que se viene dando en la actualidad a las enfermedades ocasionadas por los parásitos gastrointestinales, es mediante el control químico que presenta muchos inconvenientes para su empleo, como la generación de resistencia a los antiparasitarios, residuos de estos fármacos en leche o carne destinados al consumo humano, daño al medio ambiente y sumado a esto el objetivo de producir alimentos orgánicos, generando gastos adicionales en la producción ganadera. Estos inconvenientes ocasionan baja rentabilidad de la ganadería y por lo tanto una baja calidad de vida de los ganaderos.

Los inconvenientes ocasionados por el control químico, han replanteado el uso de los antiparasitarios, renovando el interés por la búsqueda de nuevas alternativas ecológicamente viables, sustentables y sin riesgos para la salud humana, entre ellos el control biológico, que consiste en utilizar organismos vivos con el objeto de controlar las poblaciones de otro organismo.

Son diversas las poblaciones de organismos que han sido reportadas como antagonistas de nemátodos, desde invertebrados hasta bacterias y hongos, siendo considerados como posibles agentes potenciales de control de nemátodos. Estos depredadores o parásitos de nemátodos parásitos de animales, ha despertado un gran interés por los investigadores con la finalidad de buscar un posible efecto potencial en el control de los parásitos gastrointestinales en rumiantes.

De los organismos reportados, la bacteria *Bacillus thuringiensis* ha sido desarrollada, como un excelente agente biocontrolador de enfermedades causadas principalmente por insectos a diferentes cultivos de importancia en la producción agrícola. Para el caso de los nemátodos se han encontrado variedades de *Bacillus thuringiensis* que tienen actividad letal frente a los estadios de vida libre como son los huevos y larvas de nemátodos parásitos de rumiantes.

En el presente trabajo de investigación realizado en el Laboratorio de Parasitología de la E.F.P. de Medicina Veterinaria y el Laboratorio de Biotecnología de la E.F.P. de Biología de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, se evaluó la actividad nematicida *in vitro* del extracto proteico total de *Bacillus thuringiensis* frente a los estadios de vida libre de *Nematodirus spathiger*, huevos y larvas L3 infectivas, por lo que se propusieron los siguientes objetivos:

Objetivo General.

- Evaluar la actividad letal *in vitro* del extracto proteico total de *Bacillus thuringiensis* sobre huevos y larvas (L3) infectivas de *Nematodirus spathiger*.

Objetivos Específicos.

- Obtener un extracto proteico total de *Bacillus thuringiensis*.
- Obtener huevos y larvas (L3) infectivas de *Nematodirus spathiger*.
- Determinar el porcentaje de eficiencia antihelmíntica *in vitro* del extracto proteico total de *Bacillus thuringiensis* sobre huevos y larvas (L3) infectivas de *Nematodirus spathiger*.

CAPÍTULO I

REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. Generalidades.

De las diversas patologías presentes en los rumiantes, las parasitosis se presentan como un verdadero problema en la producción ganadera, dando como resultado una disminución del bienestar animal y su potencial productivo, junto con costos crecientes asociados con medidas de tratamiento (antiparasitarios) y de manejo.

Los parasitismos gastrointestinales no siempre son diagnosticados como causantes de una ineficiencia productiva y, a nivel del campo, no es posible separar esta causa de otras causas posibles tales como una deficiencia nutricional.

Entre el parasitismo gastrointestinal, la helmintiasis es considerada como un problema de animales jóvenes, pero sin duda que la infección en animales maduros también ocasiona muchas pérdidas productivas en los rebaños (Hidalgo, 2004).

En la actualidad los parásitos internos y externos del ganado continúan siendo una de las principales causas de pérdidas económicas a nivel mundial y es durante los últimos años que se viene dando el mejoramiento de acaricidas, insecticidas y antihelmínticos de gran eficacia, amplio espectro y poder residual, lo que ha permitido al productor agropecuario disponer de un instrumento de control práctico y adaptable a

diferentes sistemas de producción. Sin embargo, el desarrollo paulatino de resistencia parasitaria, la ecotoxicidad, la residualidad en los alimentos, a nivel mundial ha demostrado que los antiparasitarios son un recurso necesario pero no renovable.

Ante la creciente necesidad de rediseñar sistemas de control rentables, eficientes y sostenibles, los organismos internacionales y en particular la FAO, promueven acciones destinadas a minimizar las consecuencias de este problema (FAO, 2003).

Son diversas las formas de control y prevención del parasitismo gastrointestinal del ganado, siendo propuestas, las medidas de manejo como rotación de potreros y pastoreo alternado con diferentes especies, la selección genética de animales resistentes a estos parásitos, inmunización del ganado ya sea mediante la administración de larvas irradiadas o de extractos proteicos purificados obtenidos de células intestinales de nemátodos, etc.

Es importante poner atención en los estadios de vida libre o no parásita, cuyo desarrollo se lleva a cabo en el medio ambiente. Estos, inician el proceso evolutivo en forma de huevo, cuando son eliminados al suelo junto con las heces de los animales. Desde este primer contacto con su nuevo hábitat y durante todo su desarrollo evolutivo hasta convertirse en estadio tercero o larva infectante, tienen que enfrentar diversos enemigos naturales que constantemente atentan contra sus poblaciones.

Los enemigos naturales de los nemátodos en el suelo, pueden dividirse para su estudio en diferentes grupos de acuerdo a su clasificación taxonómica y comportamiento biológico con respecto a los nemátodos. Dentro de estos podemos encontrar a un extenso grupo de hongos y bacterias, además de otros microorganismos tales como nemátodos y artrópodos nematófagos, que actúan como depredadores de nemátodos. E inclusive otros organismos como algunas plantas que producen sustancias nematicidas y que en forma indirecta ejercen un efecto

detrimental sobre diferentes grupos de nemátodos en el suelo (Mendoza, 2000).

Uno de los principales microorganismos que están actualmente siendo explorados como una posible herramienta biológica de control, es *Bacillus thuringiensis*. Esta bacteria ha sido desarrollada como un excelente agente biocontrolador de enfermedades causadas principalmente por insectos a diferentes cultivos de importancia en la producción agrícola. La forma en que esta bacteria ejerce su efecto patógeno en contra de los insectos es a través de la formación de cristales de naturaleza proteica que son producidos dentro de las células vegetativas (Herrera y col., 2004).

En las últimas décadas se ha observado actividad nematotóxica de cristales producidos por algunas variedades de esta bacteria, reportándose actividad nematicida en animales infectados con nemátodos. Recientemente se han identificado genes del grupo Cry V con actividad nematicida (Mendoza, 2000).

1.2. Gastroenteritis parasitarias en rumiantes.

En el tracto digestivo de rumiantes se suelen encontrar mezclados los nemátodos de los géneros *Trichostrongylus*, *Ostertagia*, *Cooperia*, *Nematodirus*, *Haemonchus*, *Chabertia*, *Bunostomum*, *Oesophagostomum* y anquilostomas. Todos ellos están relacionados con gastroenteritis parasitaria. A estos nemátodos se les conoce en forma colectiva como trichostrongiloides.

La transmisión se produce por ingestión de larvas infectantes. El riesgo de infección depende de factores que actúan sobre la susceptibilidad del hospedador, del número de larvas infectantes que se acumulan en los pastos y del número de larvas en hipobiosis. Los más vulnerables son los terneros, corderos, cabritos y tuis.

La enfermedad de Tipo I se produce tras una infección reciente; la enfermedad de Tipo II se retrasa hasta que las larvas hipobióticas reanuden su desarrollo (Radostits y col., 1999).

Cada especie de tricostrongiloide difiere en cuanto al hábitat y en cuanto a las lesiones que ocasionan, en términos generales se describe los principales mecanismos que desencadenan la diarrea, el adelgazamiento y la disminución de la producción.

1.2.1. Infestaciones del abomaso.

Las larvas en desarrollo de *Ostertagia* dilatan las glándulas gástricas y producen pequeños nódulos de color blanco sobre la superficie de la mucosa (carecen de importancia). Las alteraciones de mayor importancia se producen entre 18 a 21 días después de la infestación, cuando los vermes comienzan a emerger de las glándulas. Esto desencadena una reacción hiperplásica en las glándulas adyacentes, que causan lesiones nodulares de mayor tamaño. Muchas de las células que revisten las glándulas afectadas no son funcionales, reduciéndose las células parietales secretoras de ácido que se traduce en un aumento del pH gástrico, que puede alcanzar valores de 6,0 a 7,0.

La hiperplasia de la mucosa del abomaso permite que no se destruyan bacterias y protozoarios provenientes del rumen. El pepsinógeno no se convierte en pepsina, ya que esto sólo ocurre en medio ácido, y en consecuencia, no se dispone de pepsina para digerir las proteínas. Se incrementan las concentraciones de pepsinógeno y gastrina en sangre. También hay un incremento de la permeabilidad epitelial del abomaso, generando pérdida de proteínas hacia la luz del abomaso.

En casos graves, es observable hipoalbuminemia, edemas y adelgazamiento. El proceso provoca una disminución de la síntesis de proteína muscular y la consecuente pérdida de productividad (Radostits y col., 1999).

1.2.2. Infestaciones intestinales por trichostrongiloides.

Se asocian con lesiones inflamatorias, engrosamiento de la mucosa y desaparición o acortamiento de las vellosidades. La actividad enzimática del epitelio está reducida. Mientras *Nematodirus* y *Cooperia* se localizan en estrecho contacto con la mucosa, las larvas y las formas adultas de especies de *Trichostrongylus* excavan túneles superficiales, provocando mayores lesiones en los tejidos. Las lesiones se localizan en el tramo anterior del intestino delgado, y su gravedad depende de la concentración de vermes.

La mala absorción no es una de las características destacadas de la patogenia, ya que las zonas no afectadas del intestino pueden compensar los efectos. En consecuencia la digestión y absorción de proteínas puede encontrarse dentro de los valores normales. Sin embargo, sí se produce una baja retención y utilización de nitrógeno debido a una enteropatía con pérdida de proteína, junto con las graves pérdidas de células descamadas y de producción de moco. Esto contribuye a una reducción de la producción y en los casos mas graves produce edemas e hipoalbuminemia. La absorción de minerales se encuentra reducida, provocando un retraso del crecimiento del esqueleto, una reducción de la densidad ósea y de su mineralización. La infección por *Trichostrongylus* reduce la absorción de fósforo e incrementa la pérdida de fósforo endógeno, ocasionando la deficiencia de fósforo. Se desconoce el mecanismo preciso que provoca la diarrea asociada con estas infestaciones (Radostits y col., 1999).

1.2.3. Reducción de la productividad.

Los parásitos intestinales y del abomaso originan una disminución del apetito, que es responsable en un 60 % de la diferencia en la ganancia de peso que existe entre ovejas y bovinos infestados por *Ostertagia* y los que se encuentran libres de vermes. La ingestión voluntaria de alimentos se puede reducir significativamente incluso en animales asintomáticos. Los elevados niveles de gastrina en infecciones por trichostrongiloides en

abomaso alteran la motilidad retículo – ruminal y reducen la velocidad del vaciado del abomaso, provocando un éstasis de la ingesta y una reducción de la ingestión de alimentos (Radostits y col., 1999).

1.3. Generalidades de *Nematodirus spathiger*.

Las especies de *Nematodirus* se comportan de manera diferente a otros tricostrongiloides, los corderos son la única fuente de contaminación de los pastos ovinos, transmitiéndose de una generación de corderos a otra (Radostits y col., 1999).

Nematodirus spathiger tiene como hospedadores a ovinos, caprinos, camélidos sudamericanos y ocasionalmente vacunos, localizándose en el íleon del Intestino delgado. Está distribuido mundialmente, pero es más común en zonas templadas. (Urquhart y col., 2001; Leguía y Casas, 1999).

1.3.1. Taxonomía.

Reino	: Animal
Phylum	: Nematelminthes
Clase	: Nematoda
Orden	: Strongylida
Suborden	: Strongylina
Superfamilia	: Trichostrongyloidea
Familia	: Trichostrongylidae
Genero	: <i>Nematodirus</i>
Especie	: <i>Nematodirus spathiger</i>

Fuente: Urquhart y col. (2001).

1.3.2. Ciclo biológico.

El género *Nematodirus* como los otros tricostrongiloides tiene un ciclo biológico directo, este género sufre mudas que consisten en los siguientes estados.

Huevos.

Son eliminados en las heces al medio ambiente, los huevos de especies de *Nematodirus* son diferentes a los demás tricostrongiloides. Son de mayor tamaño e inicialmente no eclosionan. Estos huevos son grandes, ovoides, incoloros y de doble tamaño que los típicos huevos de tricostrongiloides (150 – 212 μm x 75 – 108 μm) (Urquhart y col., 2001).

El potencial de puesta de huevos por hembra de nemátodo por día de *Nematodirus spathiger* es aproximadamente 50 (Colditz, 2008), 100 a 200 (Abbott et al., 2009).

Larvas.

Es en el interior del huevo donde se dan dos estados larvarios no parasitarios (L1, L2), y un último el tercer estado larvario infectante (L3). Estas Larvas se encuentran encapsuladas, es decir, retienen la cutícula de la muda anterior para protegerse. La L3 encapsulada infectante, logra una resistencia aun mayor frente a condiciones ambientales adversas (Radostits y col., 1999).

La evolución a L3 generalmente es muy lenta y en climas templados, tardando un mínimo de dos meses (Urquhart y col., 2001), 14 a 28 días (Leguía y Casas, 1999).

Los huevos de *Nematodirus* que contienen L3 infectante sólo eclosionan tras la exposición a un estímulo específico, especialmente calor tras un período de temperaturas frías. De este modo, la mayoría eclosionan durante la primavera del año siguiente al de su puesta (aunque cierto porcentaje lo puede hacer durante el otoño del primer año). Por tanto, a diferencia de otros tricostrongiloides, *Nematodirus* se transmite de una generación de corderos a otra (Radostits y col., 1999).

Luego de eclosionar la L3 del huevo, bajo condiciones necesarias de humedad, emigran de las heces hacia la vegetación (Urquhart y col., 2001).

Tras la ingestión de las L3 por el hospedador, estas no son migratorias, penetrando en las criptas del intestino delgado, realizándose dos mudas, hasta alcanzar la larva L5 o adulto inmaduro, que se completa en 10 a 12 días después de la infección (Urquhart y col., 2001).

Adultos y reproducción.

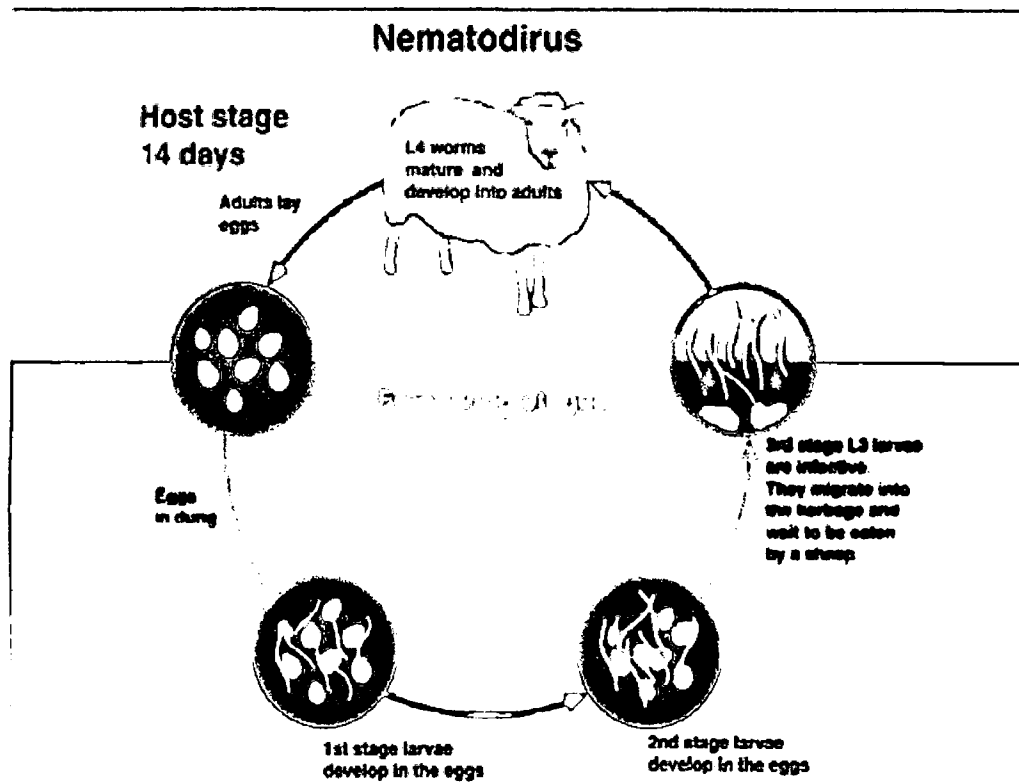
El nemátodo emerge de nuevo a la luz y tras una cuarta muda alcanza el estado adulto. El tiempo que transcurre desde la ingestión de las larvas hasta la aparición de hembras adultas suele ser de cuatro semanas, una más que el resto de tricostrongiloides (Radostits y col., 1999).

La mayoría de los estadios se localizan en la superficie de la mucosa del íleon. Las larvas L5 maduran sexualmente en la superficie de la mucosa, siendo el período de prepatencia 15 días (Urquhart y col., 2001), 28 a 30 días (Leguía y Casas, 1999).

Es una especie dioica, con dimorfismo sexual, los machos generalmente son más pequeños que las hembras, siendo estas las que ponen huevos (Urquhart y col., 2001).

Los adultos son delgados de unos 2 cm de longitud, están entrelazados, ofreciendo una apariencia de madeja de lana. Se observa una pequeña, pero evidente vesícula cefálica. Las espículas son largas y delgadas con las puntas fusionadas. En todas las especies, excepto *Nematodirus battus*, el macho tiene dos juegos de costillas paralelas en cada uno de los principales lóbulos de la bolsa copuladora; la hembra tiene un extremo posterior romo y con una pequeña espina o púa, y los huevos son grandes, ovoides, incoloros y de doble tamaño que los típicos huevos de tricostrongílidos (150 – 212 μm x 75 – 108 μm) (Urquhart y col., 2001).

Ciclo de Vida del Género *Nematodirus*



Fuente: Abbott et al., 2009.

1.3.3. Epidemiología.

Nematodirus spathiger, es un parásito de clima frío, resistente a bajas temperaturas debido a que sus estadios de vida libre presentan condiciones especiales de desarrollo encapsulado dentro del huevo, así se sabe que la larva tiene una supervivencia óptima en un medio fresco y húmedo o en un medio fresco y seco, o también en el invierno, contándose para el efecto de un alto potencial biótico.

Durante las épocas del año, tanto seca como con lluvia, *Nematodirus spathiger* se presenta constantemente, lo cual indica que la zona de Ayacucho tiene condiciones de clima que favorecen su transmisión (Gomez, 1983).

Las características de importancia en la epidemiología de *Nematodirus spathiger* son:

- a) La capacidad de los estadios de vida libre, fundamentalmente los huevos que contienen L3, para sobrevivir en el pasto, incluso durante más de dos años.
- b) Las condiciones para que la mayoría de los huevos eclosionen y por lo tanto aparezcan una gran cantidad de L3 en el pasto, se producen en noviembre y diciembre. Aunque cada año se produzca la presencia de larvas en el pasto, no todos los años se van a desencadenar casos clínicos de nematodiosis; si la cantidad máxima de L3 aparece tempranamente, es probable que los corderos lactantes no consuman suficiente pasto para ingerir un gran número de L3, mientras que si aparece tarde, es probable que los corderos tengan suficiente para resistir la infección. Parece evidente que existe cierta resistencia asociada a la edad frente a la infección por *Nematodirus spathiger* que comienza cuando los corderos tienen alrededor de tres meses de edad. Sin embargo, corderos de 6 a 7 meses de edad pueden tener grandes poblaciones de *Nematodirus spathiger*, por lo que parece dudoso que la inmunidad asociada a la edad sea absoluta.
- c) El escaso papel que juegan las ovejas madres en el ciclo anual de *Nematodirus spathiger* que puede ser considerada una enfermedad de cordero a cordero. Las ovejas adultas suelen eliminar pocos huevos en sus heces, insuficientes para causar un incremento de larvas en los pastos, aunque aseguran la permanencia de la infección en las praderas (Urquhart y col., 2001).

Las larvas de *Nematodirus spathiger*, *N. battus*, *N. filicollis*, *N. helvetianus* han sido relacionadas con brotes de nematodiosis en ovinos y bovinos, pero resulta más común encontrarlas junto con otros tricostrongídeos.

Aunque en las necropsias se han hallado L4 de *Nematodirus spathiger*, aparentemente inhibidas en su desarrollo, parece más probable que se acumulen debido a la resistencia del hospedador que por la hipobiosis (Urquhart y col., 2001).

1.3.4. Patogenia.

En la nematodiosis, debida a la infección por *Nematodirus spathiger*, el principal efecto patógeno es por la acción de los estadios larvarios. Tras la ingestión de una gran cantidad de larvas L3 se altera la mucosa intestinal, particularmente en el íleon, aunque la mayoría de los estadios se localizan en la superficie de la mucosa. El desarrollo de L4 a L5 se completa en 10 a 12 días después de la infección y coincide con graves daños a las vellosidades y con erosión de la mucosa, lo que supone la atrofia de las vellosidades. La capacidad del intestino para intercambiar fluidos y nutrientes se ve muy reducida y con la diarrea los corderos se deshidratan rápidamente. En la necropsia, la canal tiene un aspecto deshidratado y se aprecia enteritis en íleon (Urquhart y col., 2001).

1.3.5. Signos clínicos.

En infecciones graves, la diarrea es el síntoma más importante. Conforme se deshidratan, los animales están sedientos, por lo que en los rebaños infectados los corderos inapetentes y con diarrea se congregan alrededor de los bebederos, mientras que las madres continúan alimentándose con normalidad, sin verse afectadas por la infección (Radostits y col., 1999).

1.4. Principales formas de control.

1.4.1. Control químico.

En la actualidad existen numerosos antihelmínticos de amplio espectro que combinan una elevada eficacia contra vermes en estado adulto y larvario, a la vez que presentan una baja toxicidad para ovejas y bóvidos. Sin embargo, la mayoría pertenece tan solo a tres grupos químicos principales:

- Las ivermectinas, doramectina y moxidectina, que se administran por vía oral o parenteral a razón de 0.2 mg/Kg.
- Los bencimidazoles (BZD), por vía oral: albendazol 5 mg/Kg, febantel 5 mg/Kg, fenbendazol 5 mg/Kg, netobimina 7.5 mg/Kg, mebendazol 15 mg/Kg y el oxfendazol 5 mg/Kg.

- El levamisol se puede administrar por vía oral y parenteral a 7.5 mg/Kg.

El monohidrato de citrato de morantel también se administra en forma de purga en ovinos.

La elección del antihelmíntico depende de numerosos factores como:

- El precio;
- La seguridad (incluye residuos en carne y leche y los efectos sobre el medio ambiente);
- La facilidad de administración; y
- El espectro de actividad (Radostits y col., 1999).

1.4.1.1. Inconvenientes del control químico.

- **Resistencia a los antihelmínticos.**

El parasitismo gastrointestinal, es generalmente tratado con antihelmínticos para tratar los casos clínicos, para lo que se exige nuevos tratamientos. Pero el continuo uso de drogas para combatir las verminosis ha llevado a la aparición de resistencia a los antihelmínticos en las principales regiones de cría de ovinos de América del Sur (Hidalgo, 2004).

La resistencia a los antihelmínticos se está extendiendo en el mundo, constituyendo un problema que preocupa, debido a que complica cada vez más el control de muchas especies de parásitos gastrointestinales en los rumiantes, particularmente en la ganadería bovina. Si bien la mayor parte de los casos de resistencia se presentan en la especie ovina, se conocen actualmente reportes que informan sobre la presencia de resistencia en los nemátodos gastrointestinales de bovinos en diferentes países (Márquez, 2007).

Algunos individuos en las poblaciones de parásitos tienen aptitud para evitar que las drogas los maten. Si se repiten con frecuencia los tratamientos con el mismo grupo químico sobre la población de parásitos que contenga a esos individuos, en poco tiempo predominará esa descendencia. Generalmente cuando en una población se desarrolla la

resistencia a una droga, la cepa resulta resistente a todo el grupo químico. Este proceso también puede iniciarse en un campo por el ingreso de cepas resistentes con animales provenientes de otros establecimientos (Olaechea, 2005).

- **Residuos químicos en alimentos de origen animal**

La creciente demanda de productos de origen animal por parte de la población humana ha dado lugar a la intensificación de los sistemas de producción agropecuarios, en particular la producción ganadera. Esta situación ha conducido a que los animales de las explotaciones pecuarias se vean expuestos al incremento de enfermedades de diversa índole, lo que trae consigo una mayor utilización de medicamentos veterinarios como los antimicrobianos, los pesticidas y los antiparasitarios, cuyos principios activos pueden dejar residuos en los alimentos de origen agrícola o pecuario.

El uso de medicamentos veterinarios y agroquímicos en la producción agropecuaria, ya sea con fines terapéuticos, zootécnicos, como promotores de crecimiento o para la protección de cultivos, expone a los consumidores de alimentos de origen animal a la ingestión de sustancias o residuos potencialmente tóxicos, siendo la leche y los derivados lácteos los que más contaminantes pueden llegar a contener y ocasionar potenciales problemas en la salud pública.

No se tienen conocimientos sobre cuáles y cuántos de estos residuos pueden estar presentes en los productos agropecuarios, ni los productores y asesores técnicos cuentan con información suficiente para evitar el problema de residualidad. Tampoco se dispone de protocolos de diagnóstico ni de información suficientes que permitan cuantificar la problemática con el fin de sentar las bases para su vigilancia y control (Márquez, 2007).

- **Efectos ecotóxicos.**

Ciertas drogas de uso veterinario pueden modificar el funcionamiento normal del ecosistema afectando ciertos eslabones sensibles de la cadena de los animales degradadores. Esto concierne en particular a los coleópteros y los dípteros coprófagos, la mesofauna edáfica y las lombrices. Su eliminación parcial, aunque sea por un lapso de tiempo corto, puede conducir a más que duplicar el tiempo de desaparición del excremento del ganado de la superficie del suelo. La exclusión total de los insectos durante el primer mes que sigue al depósito del excremento del ganado alarga considerablemente el tiempo necesario para su desaparición, tiempo que podría llegar a ser de 3 y hasta 4 años en clima seco.

No todos los productos veterinarios presentan el mismo riesgo para el ambiente, esto depende de la familia química a la cual pertenecen.

Los benzimidazoles, así como los imidazotiazoles (levamisol) no tienen efectos nocivos significativos sobre los coleópteros coprófagos, al igual que las salicilanilidas (niclosamida y rafoxamida).

Por el contrario, los residuos de otros antihelmínticos utilizados desde hace tiempo, como la fénotiazida, el coumafos, la ruelena, la piperazina y el diclorvos (fosfato organofosforado), tienen efectos nocivos sobre los insectos coprófagos como los dípteros y los escarabajos. Igualmente sucede con los piretroides de síntesis, como el alfa cipermetrina, la flumetrina y la deltametrina.

Las endectocidas que comprende las avermectinas y más recientemente la milbemecinas, que son lactonas macrocíclicas también presentan efectos secundarios sobre la fauna de invertebrados que no son el blanco a tratar.

Los efectos tóxicos o no tóxicos, sobre la fauna no blanco, de ciertas moléculas actualmente comercializadas son conocidos, pero para otras moléculas los datos son fragmentarios o inexistente (Lumaret y Martínez, 2005).

1.4.1.2. El futuro de los antiparasitarios.

El futuro de los actuales antiparasitarios no es fácil de predecir. En realidad sí lo es si se los sigue utilizando con la falta de criterio que se evidencia por el alarmante aumento de los reportes de resistencias parasitarias. En el combate contra la resistencia parasitaria se debería incluir los esfuerzos por el descubrimiento de nuevas drogas y el desarrollo de nuevas formas de liberación que, en sintonía con la fisiología del hospedador y del parásito, apliquen el concepto de quimioterapia en mejores condiciones que las actuales. Puede haber quien piense que el descubrimiento y/o desarrollo de nuevos medicamentos no se justifica cuando las vacunas, mecanismos de combate biológico y animales resistentes a los parásitos son posibilidades concretas de futuros desarrollos. Sin dejar de aceptar que esos desarrollos pueden representar poderosas herramientas en la lucha contra los parásitos, no debemos confundirnos, faltan muchos años para que alguna estrategia relacionada a ellos entre en escena con posibilidades de éxito y, no nos cabe duda que aún en ese caso, los antihelmínticos van a seguir jugando un rol fundamental en sanidad animal (Errecalde, 2004).

Pareciera evidente que para evitar entrar a la "era post-antibiótica", no van a ser las prohibiciones de utilización la llave. Las prohibiciones no harán más que reducir la productividad a niveles alarmantes en regiones del planeta que las necesitan elevadas, aumentar el mercado negro y las fabricaciones ilegales y carentes de todo control, el contrabando y la pérdida de control sobre el flujo de antimicrobianos en el mundo, lo que, paradójicamente, puede impactar negativamente en los niveles de resistencias bacterianas.

El uso racional de los antimicrobianos, por veterinarios bien formados en el tema cuando eso es posible, o por técnicos entrenados en su uso, en otros casos, con instrucciones concretas para la utilización de productos farmacéuticos de elevada calidad, es la única y clara salida para el

problema que nos ocupa. Para ello, se deberán destinar recursos a la investigación básica y aplicada, especialmente vinculada a aspectos de la farmacocinética y la farmacodinamia de los antibacterianos, a la investigación clínica de sus efectos y, especialmente a la educación y entrenamiento de todos aquellos involucrados en la elaboración, comercialización, utilización, fiscalización y control de los productos fabricados en base a antibióticos (Errecalde, 2004).

1.4.2. Control biológico.

El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) define al control biológico como “el uso o manejo de enemigos naturales nativos, introducidos o genéticamente modificados (predadores, parásitos, parasitoides y patógenos de plagas) y otros organismos benéficos seleccionados (antagonistas, competidores y alelopáticos) y sus productos para reducir la poblaciones y los efectos de las plagas” (Lecuona, 1995).

Los plaguicidas microbianos están compuestos por bacterias, hongos, virus protozoarios y nemátodos que presentan mayores posibilidades para emplearlos en el control biológico de plagas.

La mayor parte de los microorganismos capaces de provocar enfermedades en los insectos no daña a otros animales o a las plantas. Han sido encontrados más de 1165 microorganismos relacionados con el control biológico, siendo casi todos patógenos. Esto comprende 90 especies y variedades de bacterias, 260 de virus y rickettsias, 460 de hongos, 255 especies de protozoarios y 100 de nemátodos (Lecuona, 1995).

El control microbiano presenta ventajas por tener especificidad y selectividad para sus respectivos hospederos; posee la capacidad de multiplicación, dispersión y reproducción sobre la población en la que actúa; no tiene efectos secundarios y posee un control mas duradero; permite un control asociado y la aplicación de la ingeniería genética; no contamina ni es tóxico y no crea resistencia sobre insectos; además su

costo de producción es económico y se puede aplicar en forma artesanal y/o sofisticada. Las bacterias y los virus son de fácil manejo por su relativa facilidad de reproducción y por ser menos dependientes de las condiciones ambientales como la humedad, que hacen susceptibles a los hongos. Las bacterias esporulantes son las más estudiadas, incluyendo bacterias patógenas obligatorias. Por su capacidad de formar esporas, poseen alta persistencia en el ambiente, siendo altamente virulentas, con gran capacidad invasiva y de producción de toxinas (Cundía, 2009).

Existe un creciente interés por explorar el uso potencial de antagonistas naturales de los nemátodos en el control de parásitos de rumiantes. Los enemigos naturales de los nemátodos en el suelo, pueden dividirse para su estudio en diferentes grupos de acuerdo a su clasificación taxonómica y comportamiento biológico con respecto a los nemátodos. Dentro de estos podemos encontrar a un extenso grupo de hongos y bacterias, además de otros microorganismos tales como nemátodos y artrópodos nematófagos, que actúan como depredadores de nemátodos e inclusive otros organismos como algunas plantas que producen sustancias nematicidas y que en forma indirecta ejercen un efecto detrimental sobre diferentes grupos de nemátodos en el suelo (Mendoza, 2000).

En 1984 Kriey y Holt, mencionaron 5 especies de *Bacillus* como patógenos de insectos: *B. lentimorbus*, *B. popillae*, *B. sphaericus* y *B. thuringiensis* con acción sobre insectos dípteros, lepidópteros y coleópteros (Lecuona, 1995).

1.5. El nematicida específico *Bacillus thuringiensis* (Bt).

Bacillus thuringiensis es una bacteria, bacilo Gram positivo, esporulador, aerobio facultativo, de un tamaño que oscila entre 1 a 1.2 μm de ancho y de 3 a 5 μm de largo, nativo del suelo, ampliamente distribuido en el ambiente, perteneciente al orden Eubacteriales, familia Bacillaceae, grupo I del género *Bacillus*. Una colonia aislada de Bt, en placa de Petri, muestra una morfología circular, de color crema, con aspecto harinoso y textura semejante a la cera. La observación, al microscopio óptico de

contraste de fases, de un cuerpo paraesporal refringente durante la fase de esporulación permite su diferenciación de otras especies del género *Bacillus*. Las esporas son ovales en posición subterminal y no deforman la célula vegetativa. Una de las características más importantes de Bt es la de sintetizar, durante la fase estacionaria de su ciclo de crecimiento, una inclusión paraesporal de naturaleza proteica (ICPs) denominada inclusión cristalina, cristal o δ -endotoxina. La estructura de esta inclusión es el resultado del ensamblaje de varias unidades polipeptídicas de diferentes pesos moleculares, que oscilan entre 27 y 140 KDa, las cuales le dan su forma característica (Lopez y col., 2009).

Ciertos indicios llevan a pensar que en el antiguo Egipto se conoció la acción insecticida de lo que probablemente fue Bt y que se usó en el control de plagas. Bt fue descubierto por Shigetane Ishiwata (1901), en Japón, quien lo aisló a partir de una larva muerta del gusano de seda (*Bombix mori*) denominándolo *Bacillus soto*. Su identificación como agente entomopatógeno y su denominación, se deben a su reaislamiento por Berliner en el distrito de Thuringia (Alemania), a partir de larvas muertas de la "Palomilla de la Harina" (*Ephestia kuhniella*). Hacia 1936 se introdujo en el mercado el primer producto comercial bajo el nombre de Sporine, cuyo principio activo eran las esporas de Bt.

Bt es un patógeno de insectos y su actividad es atribuida, amplia o completamente (dependiendo del insecto), a las ICPs y su importancia radica en su toxicidad contra larvas de insectos plaga de las órdenes Lepidóptera, Coleóptera, Díptera, Himenóptera, Homóptera, Ortóptera, Malófaga, y contra organismos como ácaros, platelmintos y nemátodos. Incluso ha mostrado actividad sobre células cancerígenas, leucémicas y contra protozoos de importancia médica como *Giardia lamblia* y *Plasmodium berghei*.

Bt es la bacteria entomopatógena más ampliamente utilizada como biopesticida, sola o en combinación con pesticidas químicos, en la protección de especies vegetales, agricultura comercial y contra dípteros

vectores de enfermedades humanas (malaria, dengue, fiebre amarilla, filariasis).

Bt es habitante de muchos ambientes y se han aislado cepas de suelo, insectos, polvo de productos almacenados, residuos, hojas y coníferas, tiene la capacidad de ocupar un gran número de ecosistemas terrestres diferentes como desiertos, estepas, bosque húmedo tropical, altas montañas, playas y cuevas entre muchos otros. Todas las cepas son buenas productoras de amilasas y proteasas, que le permiten utilizar materiales complejos y fáciles de conseguir como fuentes de carbono y nitrógeno. Se han diseñado medios sintéticos y semisintéticos para el crecimiento, producción de cristales y esporulación (Lopez y col., 2009).

Bt tiene distribución mundial en ambientes típicamente terrestres y acuáticos, siendo también aislado de larvas muertas que son sus hospederos naturales (Prado, 1995).

Esta bacteria presenta variedades, siendo las más importantes: *israelensis*, *kurstaki*, *tenebrionis*, *aizawa*, etc. (Cabello, 2006).

Recientes avances en biología molecular de Bt han permitido identificar los genes Cry presentes en las diversas variedades (Yadav, 2007).

En el Perú, se realizó una recolección de muestras de suelo, agua estancadas, ríos y larvas de insectos, de los departamentos de Ancash, Lima, Trujillo, Junín, Arequipa, Moquegua y Tacna, lográndose aislar cepas de *Bacillus thuringiensis* con capacidad entomocida frente a los primeros estadios de *Anopheles pseudopunctipennis* y *Culex spp* (Flores y col., 2010).

En Ayacucho se registró el aislamiento de *Bacillus thuringiensis*, procedentes de muestras de suelo y muestra de agua (Prado, 1995). Posteriormente se probó la toxicidad de Bt variedad *kurstaki* en larvas de "Polilla de la Papa" (Mujica y Chuchón, 1996).

1.5.1. Patogenicidad de *Bacillus thuringiensis*.

La toxina Cry (toxina "llorona" o "gritona") de Bt logra su efecto formando poros líticos sobre las células del intestino medio del insecto susceptible, el mecanismo es como sigue:

- Ingestión de cristales por un insecto susceptible.
- Las protoxinas son solubilizadas por las condiciones alcalinas del intestino medio del insecto en el caso de lepidópteros y dípteros. Otras toxinas de actividad anticoleóptera necesitan cortes por enzimas tipo quimiotripsinas para su solubilización.
- Procesamiento proteolítico de la protoxina por proteasas del intestino medio. Las proteasas mayores en lepidópteros son de tipo tripsina, quimiotripsina y serino-proteasas; en coleópteros son cisteino y aspartato proteasas. También se encuentran termolisinas y catepsinas.
- Unión de la toxina activada a receptores específicos sobre vesículas de membrana de la microvellosidad apical (VMMA) de insectos susceptibles. Entre los receptores encontramos caderinas, aminopeptidasa N (APN), fosfatasa alcalina y proteínas de 210 KDa de VMMA. El sitio que reconoce la toxina en la proteína de unión sería un epítopo muy pequeño o un carbohidrato. La unión fuerte involucra 2 estados que bien puede ser reversible (conteniendo únicamente los dominios II y III y la interacción únicamente con el carbohidrato) o irreversible (requiere la inserción del dominio I en la membrana apical y la interacción proteína-proteína)
- Una vez que se ha dado la inserción dentro de la membrana apical, la toxina se vuelve insensible a las proteasas y anticuerpos monoclonales e induce canales de iones o poros no específicos con un diámetro de 1 a 2 nanómetros (nm) en la membrana celular a manera de oligómeros que rompen el potencial de membrana y muy probablemente la agregación de δ -endotoxinas influye en este proceso. El modelo propone que un flujo de agua, junto con iones, resulta en el hinchamiento celular y eventualmente lisis en presencia

de un ambiente altamente osmótico y de alto pH (8.8 a 9.6). Considerando todo este proceso la muerte del insecto se da como consecuencia de la destrucción del intestino medio y por la septicemia subsiguiente a que las esporas de *Bt* alcanzan la hemolinfa y germinan en ella (Lopez y col., 2009).

Los principales componentes del cristal son proteínas de 51 y 42 KDa; y se requiere de ambas para ser tóxicas. Cuando el complejo espora-cristal es ingerido por la larva, las proteínas son solubilizadas e hidrolizadas por la acción de una peptidasa que convierte la proteína de 42 KDa a una de 39 KDa y la proteína de 51 KDa a una de 43 KDa, sin afectar la toxicidad. Los estudios revelan que el extremo amino terminal de la proteína de 51 KDa es responsable del ligamiento al intestino medio, y su extremo carboxiterminal interactúa con la proteína de 42 KDa formando una toxina binaria. Estas proteínas se unen a un receptor en el intestino medio del insecto mediante la acción de una α -amilasa producida por la larva.

Las toxinas binarias y los componentes individuales permeabilizan un receptor libre de Vesículas Unilaminares Fosfolipídicas Largas (VUL) y una Bicapa Lipídica Planar (BLP), por un mecanismo de formación de poros con grandes aberturas y largos canales; esta permeabilidad se logra con un pH alcalino y la presencia de ácidos grasos rompiendo las membranas de las células epiteliales del mesenterón hacia la hemolinfa, subiendo el pH y paralizando a las larvas. Luego de 2 a 5 h de la ingestión del cristal o protoxina, las células presentan vacuolas y mitocondrias agrandadas y finalmente se desprenden de la membrana de apoyo; cesan su alimentación y la muerte se produce entre los 2 a 7 días posteriores, dependiendo de la susceptibilidad a la bacteria y la edad de la larva (Cundia, 2009).

Además de las proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*, también existen otros tipos de factores de virulencia, incluyendo exotoxinas (α , β), quitinasa, y fosfolipasas. El estadio L3, de nemátodos tiene una cutícula externa, la cual puede ser afectada por estas enzimas. El modo de acción

de *Bacillus thuringiensis* sobre los nemátodos no es claro; presumiblemente causan daño citológico en células del intestino medio del nemátodo parásito (López y col., 2006).

La actividad de las toxinas sobre los nemátodos, es una situación muy diferente, desde que los nemátodos carecen de cavidad oral; para las instancias del tercer estadio larval. Probablemente los receptores de membrana de la cutícula de L3 o la membrana externa del huevo, pueden estar involucrados en la actividad nematicida.

Las investigaciones revelan que se altera la permeabilidad de la membrana de huevos de nemátodos luego de ser expuestos a las toxinas de *Bacillus thuringiensis* y esto sugiere la probabilidad de que la toxina induce a unos cambios osmóticos en la membrana externa del huevo, modificando el intercambio iónico y finalmente causa la muerte del huevo (López y col., 2002).

1.5.2. Efecto biolarvicida sobre larvas de nemátodos gastrointestinales.

A fines de la década de 1980, se reporta actividad tóxica contra nemátodos de diferentes especies, abriéndose nuevas expectativas en el control de parásitos en animales, plantas y el ser humano (López y col., 2002).

Ya en la década de 1990, se reportan dos aislamientos de Bt con una fuerte actividad contra nemátodos parásitos en animales, estos reportes son de un grupo de investigadores en San Diego, California (EUA). En la segunda mitad de la década del 90, un grupo de investigadores de la Universidad Agraria de Huazhong en China, reiniciaron la línea de investigación, demostrando la acción tóxica contra *Haemonchus contortus* (huevos y larvas), con posibilidad de ser usados en animales como un agente biocontrolador. Más recientemente los resultados fueron excelentes en el control del estado adulto de *Haemonchus contortus*, después de ser administrado en cabras (López y col., 2002).

Actualmente organizaciones como el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y el Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria (Cenid-Pavet) México, están realizando estudios sobre actividad nematocida de las toxinas del Bt. contra *Haemonchus contortus*, de forma experimental en jerbos y ovinos bajo condiciones controladas, mediante la aplicación intramuscular, con reducción de la carga parasitaria de 73 a 80% de efectividad (López y col., 2006).

CAPÍTULO II

MATERIALES Y METODOS

2.1. Lugar y duración del trabajo.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Parasitología de la E.F.P. de Medicina Veterinaria y el Laboratorio de Biotecnología de la E.F.P. de Biología de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, departamento de Ayacucho, a una altitud de 2764 m.s.n.m.

El trabajo de investigación se condujo durante los meses de enero a diciembre del año 2011.

2.2. Procedimiento o metodología.

2.2.1. Infección experimental de un ovino joven.

Se tomaron muestras de aproximadamente 30 g de heces del recto de ovinos en bolsas de polietileno luego de que estos animales fueran beneficiados en el Centro de Beneficio de Quicapata.

Inmediatamente después, las muestras fueron transportadas al Laboratorio de Parasitología de la E.F.P. de Medicina Veterinaria, para diferenciar los huevos de *Nematodirus spathiger* (150 – 212 μm x 75 – 108 μm) de otros huevos de tricostrongilos, utilizando cuadros de ayuda para la detección coprológica de huevos de los helmintos más comunes (Kassai, 2002).

Luego se procedió al aislamiento de los huevos de *Nematodirus spathiger*, mediante el uso de dos tamices, colocados uno debajo del otro,

el de arriba permitió retener las partículas grandes, mientras que el tamiz inferior de 53 μm de abertura permitió retener los huevos del nemátodo y fue vertido en un recipiente hasta sedimentar y posteriormente eliminar el sobrenadante.

El material sedimentado se transfirió a recipientes de polietileno y se incubó por dos meses a temperatura ambiente, hasta la obtención de Larvas L3 infectivas de *Nematodirus spathiger*. Transcurrido este tiempo el cultivo del nemátodo se colocó en el aparato de Baerman (Herrera y col., 2004) para liberar las larvas L3 infectivas. Estas larvas fueron administradas vía oral a un ovino joven previamente desparasitado (20 días previos).

Posteriormente, para la obtención de huevos y larvas L3 infectivas de *Nematodirus spathiger* se tomaron muestras de heces a partir del recto del ovino infectado experimentalmente.



Figura N° 2.1: Inoculación con Larvas L3 Infectivas de *Nematodirus spathiger* a un ovino joven.

2.2.2. Obtención de huevos de *Nematodirus spathiger*.

Se inició colectando heces frescas del recto del ovino previamente infectado con el nemátodo. Las muestras colectadas de aproximadamente 400 g. se conservaron a 4°C hasta su empleo, para luego ser

homogenizadas con la adición de agua destilada en un mortero y depositarse en recipientes de polietileno de 9 litros de capacidad.

La suspensión obtenida en los recipientes se filtró a través de un tamiz, para retener las partículas grandes, dejándose sedimentar por 10 min para luego eliminar el sobrenadante.

Al sedimento obtenido se le adicionó un volumen similar de solución saturada de azúcar (1280 g de azúcar rubia en 1000 ml de agua destilada). Esta suspensión se depositó con cuidado para evitar las burbujas en un recipiente de polietileno de 1000 ml con forma cilíndrica, colocándose una lámina de polietileno flexible en contacto con la suspensión durante 30 min, permitiendo que los huevos del nemátodo se dirijan hacia arriba y se adhieran a la pared superior de la lámina flexible.

Transcurrido este periodo, la lámina flexible conteniendo los huevos se retiró y colocó en posición vertical en otro recipiente de polietileno para ser lavado con agua destilada, que permitió separar los huevos de la lámina, que finalmente continúan en suspensión. La suspensión final se conservó hasta su empleo a 4°C (adaptado de López y col., 2002 y; Leguía y Casas, 1999).



Figura N° 2.2: Huevos de *Nematodirus spathiger* en la suspensión final (10X izquierda y 40X derecha).

2.2.3. Obtención de larvas L3 infectivas de *Nematodirus spathiger*.

Se inició colectando heces frescas del recto del ovino previamente infectado con el nemátodo. Las muestras colectadas de 400 g se homogenizaron con una adecuada cantidad de agua en un mortero, para luego ser macerada uniformemente hasta su fluidificación y depositadas en recipientes de polietileno de 9 litros de capacidad.

La suspensión se pasó a través de una malla, para retener las partículas grandes, debido a que la larva infectiva de *Nematodirus spathiger* se desarrolla dentro del huevo, no requiriendo por lo tanto del contenido de las heces para alimentarse.

Al obtener la suspensión se dejó sedimentar eliminándose el sobrenadante, mientras que el sedimento se transfirió a recipientes de polietileno con forma cuadrangular para su incubación a temperatura ambiente hasta su empleo.

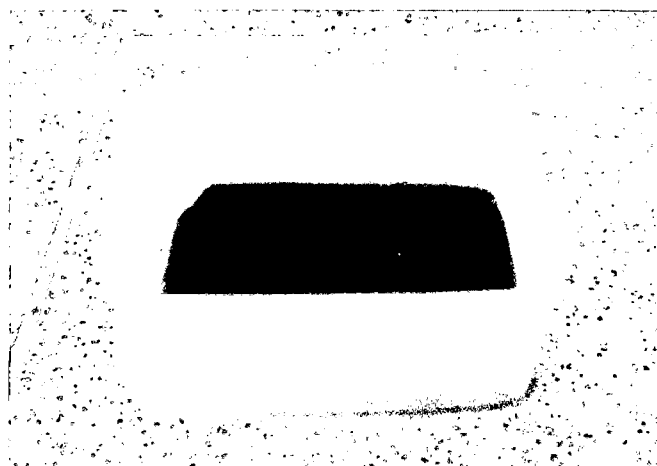


Figura N° 2.3: Incubación de los huevos de *Nematodirus spathiger* en la suspensión en recipientes de polietileno a temperatura ambiente.

Para poder colectar las larvas infectivas del nemátodo, se dejó secar a temperatura ambiente y hasta la eliminación del exceso de humedad. Luego procediéndose a realizar una modificación del Método de Baerman, es decir la Migración larvaria (Herrera y col., 2004), colocándose el

material de cultivo envuelto en gasas de algodón y sumergido bajo la superficie del agua tibia.

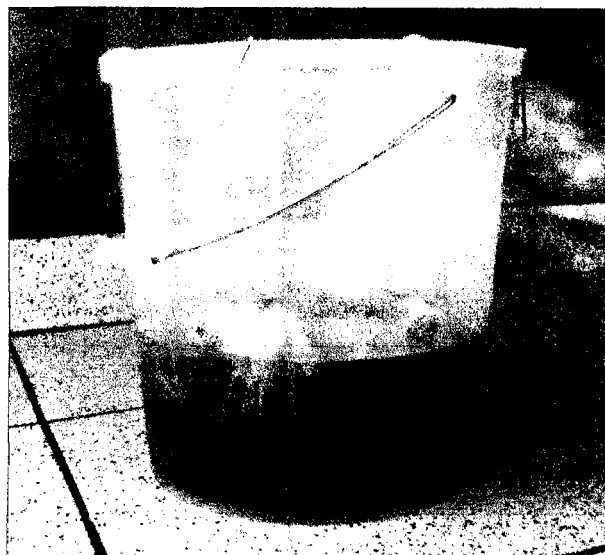


Figura N° 2.4: Modificación del Método de Baerman (migración larvaria) para coleccionar larvas L3 infectivas de *Nematodirus spathiger*.

Se dejó reposar por un tiempo de 24 h y luego se coleccionaron las larvas infectivas de *Nematodirus spathiger* (adaptado de Leguía y Casas, 1999).

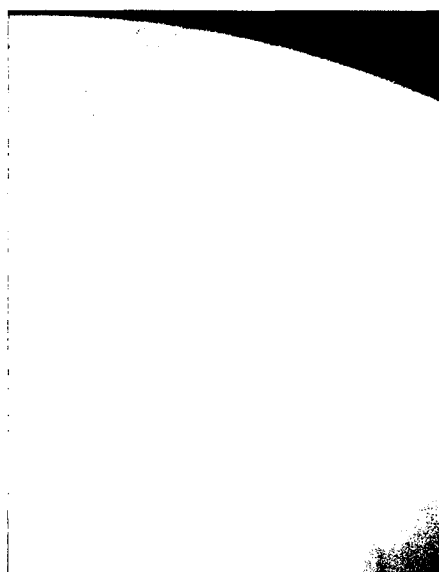


Figura N° 2.5: Larva L3 infectiva de *Nematodirus spathiger* coleccionada.

2.2.4. Obtención del extracto proteico total de *Bacillus thuringiensis*.

Para la evaluación del efecto letal *in vitro* de *Bacillus thuringiensis* sobre huevos y larvas (L3) infectivas de *Nematodirus spathiger*, se usó 5 variedades de esta bacteria pertenecientes al cepario del Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM).

-*Bacillus thuringiensis* variedad *kurstaki* (HD-1).

-*Bacillus thuringiensis* variedad *israeliensis* (WHO-2013-9).

-*Bacillus thuringiensis* variedad *israeliensis* (HD-500).

-*Bacillus thuringiensis* variedad *thompsoni* (HD-542).

-*Bacillus thuringiensis* variedad *neoleonensis* (T-24-001).

Se reactivaron las variedades inoculando 3 asadas del cultivo bacteriano en 100 ml de Caldo Luria Bertani (LB), se incubó por 72 h a 30°C en una incubadora de agitación orbital (80 rpm), hasta la formación de cristales y esporas a las 72 h.

Luego se sembró una asada a 2 placas de Petri conteniendo Agar Luria Bertani (LB), las cuales fueron incubadas por 24 h a 30°C.



Figura N° 2.6: Siembra de *Bacillus thuringiensis* en Agar Luria Bertani (LB).

Luego se inoculó a 200 ml de Caldo suplementado con leche peptonizada, incubándose por 72 h a 30°C en una incubadora de agitación orbital (130 rpm), hasta que se produzca la autólisis.

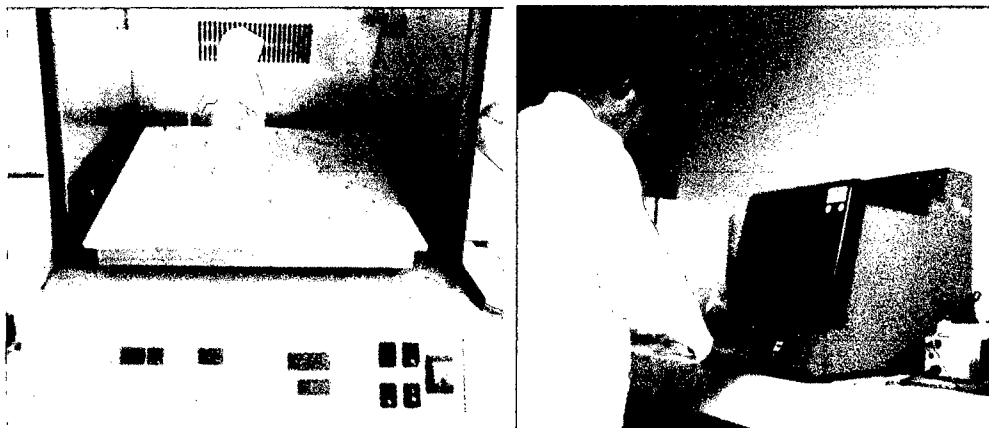


Figura Nº 2.7: Incubación con agitación orbital (130 rpm) de *Bacillus thuringiensis* en caldo suplementado con leche peptonizada.

Una vez autolizado el cultivo, se centrifugó a 3,000 rpm y se lavó el sedimento bacteriano 3 veces con agua destilada, para al final resuspender la pastilla en Solución de Buffer Fosfato (PBS) 0.01 M, con un pH de 8.0., obteniéndose 35 ml de suspensión conteniendo esporas y cristales parasporales.

Con el objetivo de verificar la inhibición de actividad de proteasas se añadió 1 μ l de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (1mM) por cada ml de la suspensión conteniendo esporas y cristales parasporales.

Las muestras fueron solubilizadas por adición de 1 μ l de 2-mercapto-etanol (10 mM) por cada ml de la suspensión, con el objetivo de separar las cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro, incubándose a 37°C por 4 h, para luego ser centrifugadas a 10,000 rpm, durante 40 min a 4°C.

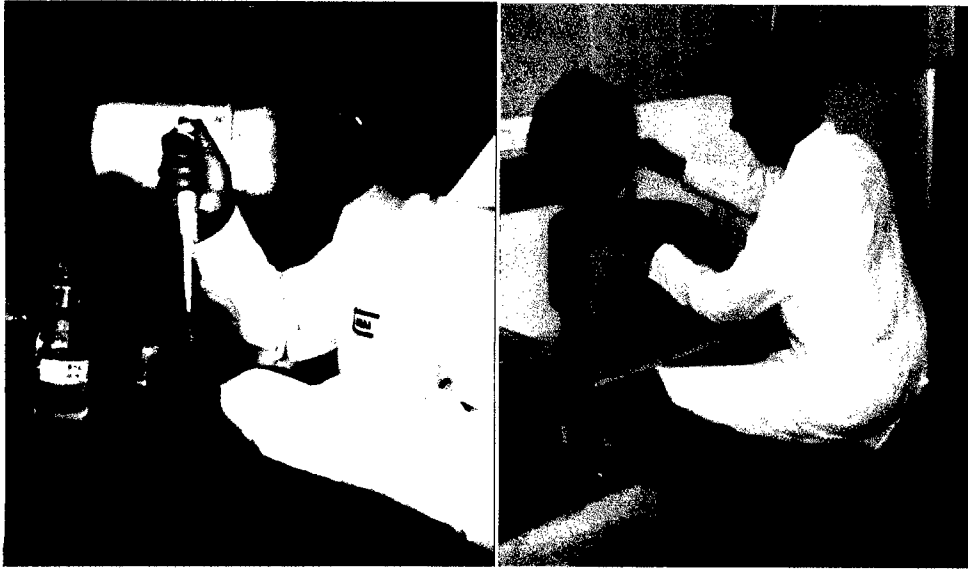


Figura N° 2.8: Adición de reactivos y centrifugado de la suspensión hasta la obtención del sobrenadante conteniendo las proteínas.

El sobrenadante conteniendo las proteínas fue procesado por el Método de Biuret, para poder determinar su concentración (adaptado de López y col., 2002).

2.2.5. Conteo de los nemátodos.

La determinación del número total de huevos y larvas de *Nematodirus spathiger* se realizó mediante la observación al microscopio de un volumen de 1.2 ml de la suspensión tanto de huevos como de larvas (adaptado de López y col., 2002).

2.2.6. Efecto ovicida y larvicida *in vitro* de *Bacillus thuringiensis*.

En una placa de Petri de 6 cm de diámetro se depositaron 1.2 ml de una suspensión que contiene 100% huevos o larvas de *Nematodirus spathiger* seguidas de 1.2 ml de la muestra de proteína purificada de *Bacillus thuringiensis* obtenida.

Se realizaron 10 repeticiones y adicionalmente 10 placas de Petri conteniendo solo huevos y larvas para el control o testigo.

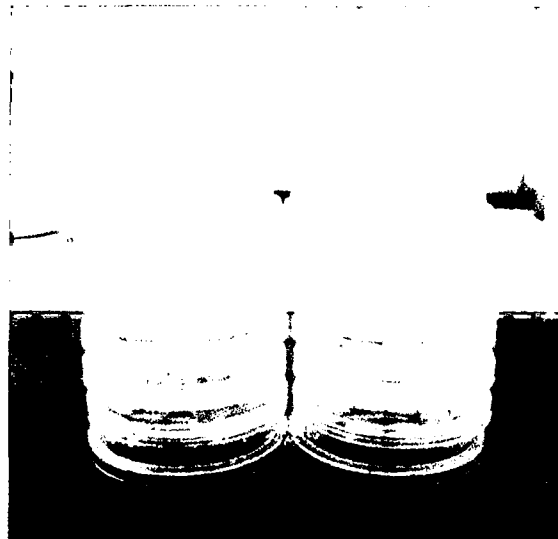


Figura N° 2.9: Placas de Petri con 1.2 ml de suspensión de huevos o larvas de *Nematodirus spathiger* más 1.2 ml de muestra de proteína purificada de *Bacillus thuringiensis*.

Las placas de Petri con los preparados se incubaron a 24, 48 y 72 h a 25°C.

La observación se realizó bajo un microscopio usando el objetivo 4X, documentándose el número de huevos y larvas afectadas por las toxinas de *Bacillus thuringiensis*.



Figura N° 2.10: Observación al microscopio y conteo de huevos y larvas afectadas por las toxinas de *Bacillus thuringiensis*.

Para diferenciar huevos de *Nematodirus spathiger* pertenecientes al grupo control, de los huevos expuestos al extracto proteico total de *Bacillus thuringiensis*, se consideró el normal desarrollo embrionario dentro de los huevos, a diferencia de los huevos expuestos al extracto proteico total donde se detiene el desarrollo embrionario después de iniciado (Anexos N° 27, 28 y 29).

Para diferenciar las larvas L3 infectivas de *Nematodirus spathiger* pertenecientes al grupo control, de las larvas L3 infectivas expuestas al extracto proteico total de *Bacillus thuringiensis*, se consideró a las larvas L3 en movimiento, a diferencia de las larvas L3 infectivas expuestas al extracto proteico total donde se mantienen inmóviles, casi en posición de línea recta (Anexos N° 30 y 31).

El porcentaje de eficiencia antihelmíntica de la toxina del *Bacillus thuringiensis* se estimó usando la siguiente fórmula.

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

% A: mortalidad tratamiento.

% B: mortalidad testigo registrado de huevos y larvas.

(adaptado de López y col., 2002; Lecuona, 1995 ;y Cundía, 2009).

2.2.7. Análisis estadístico.

Se empleó el Diseño Completamente Randomizado (DCR), con 5 tratamientos, 10 repeticiones (una placa de Petri por repetición) y también un grupo control, analizándose estadísticamente la actividad nematicida mediante el Análisis de Varianza (ANVA). La comparación de promedios de actividad nematicida fue mediante la Prueba de Tukey (P<0.05).

Mediante Regresión Lineal se evaluó la relación funcional entre la concentración del extracto proteico total de *Bacillus thuringiensis* y la actividad nematicida.

CAPÍTULO III
RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. Concentración proteica de las cinco variedades de *Bacillus thuringiensis*.

TABLA Nº 3.1: VALORES DE ABSORVANCIA Y CONCENTRACIÓN (mg/ml) OBTENIDOS MEDIANTE LA CURVA DE CALIBRACIÓN CON OVOALBÚMINA

Tubo de prueba	Absorvancia	Concentración (mg/ml)
Blanco (agua destilada)	0	0.000
Dilución 1	0.142	2.000
Dilución 2	0.179	4.000
Dilución 3	0.308	6.000
Dilución 4	0.401	8.000
Dilución 5	0.552	10.000
Sobrenadantes	Absorvancia	Concentración (mg/ml)
BT HD-1	0.266	5.042
BT HD-542	0.168	3.172
BT HD-500	0.160	3.019
BT WHO-2013-9	0.163	3.076
BT T-24-001	0.120	2.256

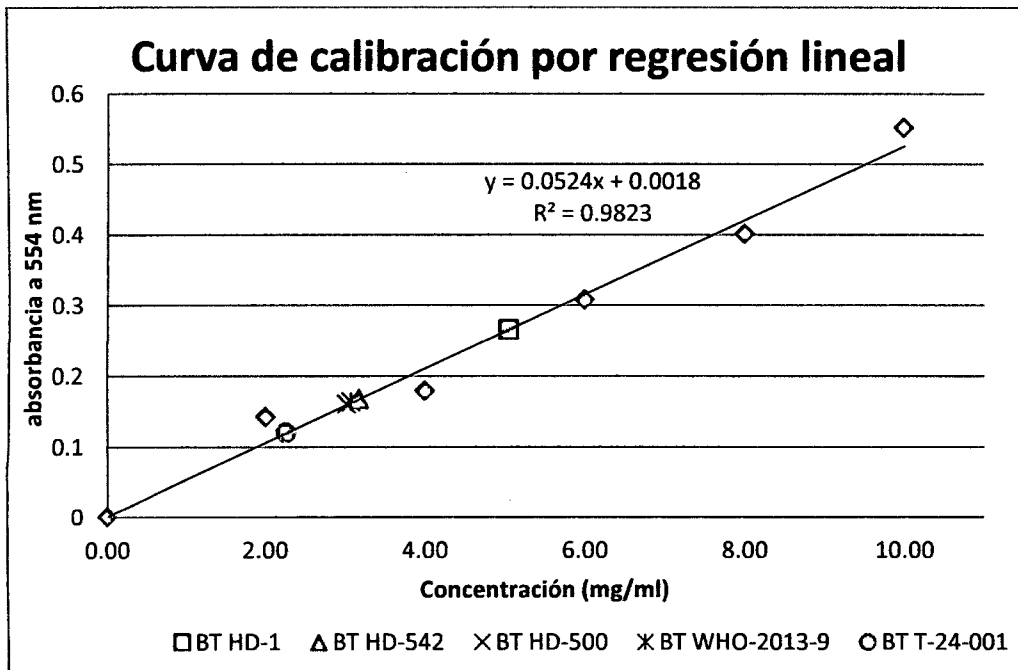


GRÁFICO N° 3.1: Curva de calibración con ovoalbúmina y la concentración (mg/ml) de las variedades de *Bacillus thuringiensis*.

3.2. Conteo de los nemátodos.

El número total de huevos en promedio fue de 42 huevos en 1.2 ml de suspensión y 136 larvas L3 infectivas en 1.2 ml de suspensión.

TABLA N° 3.2: CONTEO PROMEDIO DE HUEVOS Y LARVAS L3 INFECTIVAS DE *Nematodirus spathiger*

ESTADIO	VOLUMEN (ml)	CONTEO PROMEDIO
Suspensión de Larvas (L3) infectivas	1.2	136
Suspensión de Huevos	1.2	42

3.3. Efecto ovicida y larvicida *in vitro* de *Bacillus thuringiensis*.

Los análisis de actividad letal se realizaron a las 24, 48 y 72 horas de iniciado el enfrentamiento de los huevos y larvas L3 infectivas frente al extracto proteico total de *Bacillus thuringiensis* (Anexo N° 24, 25 y 26).

Los resultados del presente trabajo de investigación, exponen claramente que el extracto proteico de las cinco variedades de *Bacillus thuringiensis* presenta actividad nematocida *in vitro* frente a los huevos y larvas L3 infectivas de *Nematodirus spathiger* que coincide en gran medida con trabajos realizados con *Bacillus thuringiensis* sobre insectos plaga (Flores y col., 2010; Mujica y Chuchón, 1996; y Cundia, 2009).

Con respecto al mecanismo de acción de las toxinas de *Bacillus thuringiensis* sobre los nematodos (López y col., 2002), el mecanismo de acción difiere al presentado sobre insectos plaga, partiendo que los nemátodos carecen de cavidad oral para las instancias del tercer estadio larval. Probablemente los receptores de membrana de la cutícula de la larva L3 infectiva o la membrana externa del huevo, puedan estar involucrados en la actividad nematocida. También refieren que se altera la permeabilidad de la membrana de los huevos de nemátodos luego de ser expuestos a las toxinas de *Bacillus thuringiensis*, y esto sugiere la probabilidad de que la toxina induce a unos cambios osmóticos en la membrana externa del huevo, modificando el intercambio iónico y finalmente causa la muerte del huevo.

3.3.1. Efecto ovicida *in vitro* de *Bacillus thuringiensis*.

Los huevos de *Nematodirus spathiger* muertos durante el enfrentamiento con el extracto proteico total de *Bacillus thuringiensis*, se observaron con el desarrollo embrionario detenido después de haberse iniciado (López y col., 2002), cuando reportan el desarrollo embrionario detenido de huevos de *Haemonchus contortus* expuestos a las toxinas de *Bacillus thuringiensis* tripsinizadas y solubilizadas.

Las tablas nos muestran la mortalidad obtenida de los huevos frente al extracto proteico total de *Bacillus thuringiensis*, a las 24, 48 y 72 horas.

TABLA N° 3.3: MORTALIDAD DE HUEVOS DE *Nematodirus spathiger* EN EL GRUPO CONTROL.

Grupo Control (Huevos)			
	Horas		
Repeticiones	24	48	72
1	0	2	2
2	0	0	1
3	0	1	1
4	0	0	0
5	2	2	2
6	0	0	0
7	1	1	2
8	0	0	0
9	2	2	2
10	1	1	1
Promedio	0.6	0.9	1.1
Mortalidad (%)	1.4	2.1	2.6

n = 42

3.3.1.1. Mortalidad de Huevos de *Nematodirus spathiger* frente al extracto proteico total de *Bacillus thuringiensis* variedad *kurstaki* HD-1.

TABLA Nº 3.4: MORTALIDAD DE HUEVOS DE *Nematodirus spathiger* FRENTE AL EXTRACTO PROTEICO TOTAL DE *Bacillus thuringiensis* VARIEDAD *kurstaki* HD-1.

Huevos Frente a BT HD-1			
Repeticiones	Horas		
	24	48	72
1	11	14	21
2	8	12	22
3	10	13	17
4	7	9	13
5	10	13	23
6	12	13	21
7	8	11	18
8	10	13	22
9	12	16	19
10	11	14	18
Promedio	9.9	12.8	19.4
Mortalidad Absoluta (%)	23.6	30.5	46.2
Mortalidad Corregida (%)	22.5	29.0	44.7

n = 42

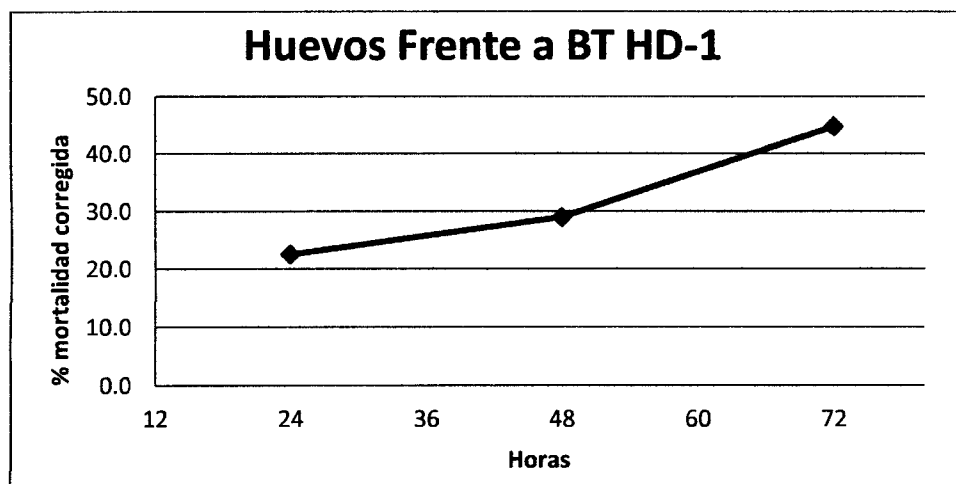


GRÁFICO Nº 3.2: Mortalidad de huevos de *Nematodirus spathiger* frente al extracto proteico total de *Bacillus thuringiensis* variedad *kurstaki* HD-1.

Los resultados de las Tablas N° 3.4 y 3.9 sobre la actividad ovicida del extracto proteico total de la variedad Bt *kurstaki* HD-1, muestran que esta variedad presenta una mortalidad corregida de huevos de *Nematodirus spathiger* de 22.5 % a las 24 h, incrementándose esta mortalidad hasta 29 y 44.7% a las 48 y 72 h respectivamente. La actividad ovicida de esta variedad es la de mayor efectividad de las cinco variedades en estudio; hallándose diferencias estadísticas significativas de la variedad Bt *kurstaki* HD-1 sobre las variedades Bt variedad *thompsoni* (HD-542), Bt variedad *neoleonensis* (T-24-001), Bt variedad *israeliensis* (WHO-2013-9), Bt variedad *israeliensis* (HD-500) y también sobre el grupo control (Cuadros estadísticos N° 3.1, 3.2 y 3.3). Estos resultados no presentan similitud con otros resultados obtenidos (López y col., 2002) cuando reportan actividad ovicida de hasta 98 y 99 % a las 24 y 48 h respectivamente, con toxinas de *Bacillus thuringiensis* tripsinizadas y solubilizadas sobre huevos de *Haemonchus contortus*.

3.3.1.2. Mortalidad de Huevos de *Nematodirus spathiger* frente al extracto proteico total de *Bacillus thuringiensis* variedad *thompsoni* HD-542

TABLA Nº 3.5: MORTALIDAD DE HUEVOS DE *Nematodirus spathiger* FRENTE AL EXTRACTO PROTEICO TOTAL DE *Bacillus thuringiensis* VARIEDAD *thompsoni* HD-542

Huevos Frente a BT HD-542			
Repeticiones	Horas		
	24	48	72
1	8	10	13
2	4	10	11
3	5	11	12
4	4	13	13
5	7	8	10
6	3	12	13
7	7	12	17
8	5	14	16
9	4	10	11
10	7	14	15
Promedio	5.4	11.4	13.1
Mortalidad Absoluta (%)	12.9	27.1	31.2
Mortalidad Corregida (%)	11.6	25.5	29.3

n = 42

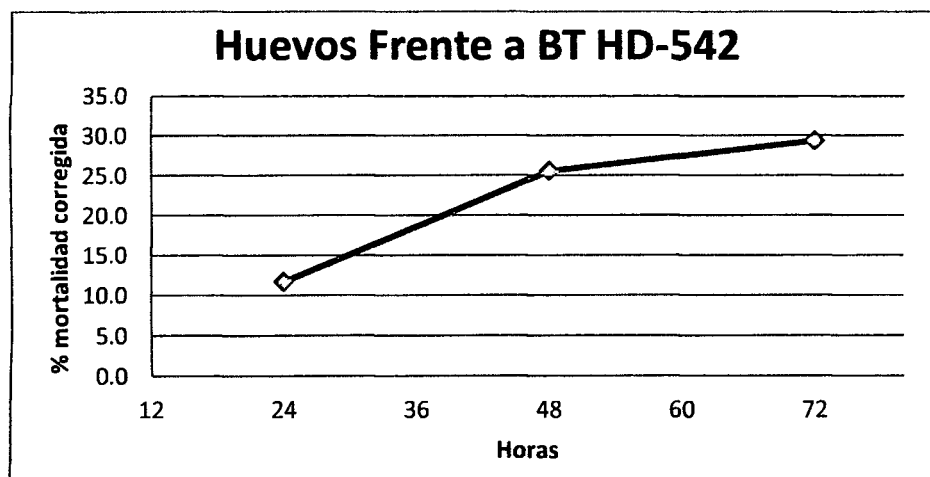


GRÁFICO Nº 3.3: Mortalidad de huevos de *Nematodirus spathiger* frente al extracto proteico total de *Bacillus thuringiensis* variedad *thompsoni* HD-542.

Los resultados de las Tabla N° 3.5 y 3.9 sobre la actividad ovicida del extracto proteico total de la variedad Bt *thompsoni* HD-542, muestran que se presenta una mortalidad corregida de huevos de *Nematodirus spathiger* de 11.6 % a las 24 h, 25.5 % a las 48 h y 29.3 % a las 72 h. La actividad ovicida presentada por esta variedad es la segunda en efectividad después de Bt variedad *kurstaki* HD-1 con diferencia estadística significativa. También se halló diferencias estadísticas significativas de la variedad Bt *thompsoni* HD-542 sobre Bt variedad *israeliensis* (WHO-2013-9), Bt variedad *israeliensis* (HD-500), Bt variedad *neoleonensis* (T-24-001) y el grupo control (Cuadros estadísticos N° 3.1, 3.2 y 3.3).

Estos resultados son inferiores a los obtenidos por la variedad Bt *kurstaki* HD-1 y distan mucho de otros resultados obtenidos (López y col., 2002) cuando reportan actividad ovicida de hasta 98 y 99 % a las 24 y 48 h respectivamente, con toxinas de *Bacillus thuringiensis* tripsinizadas y solubilizadas sobre huevos de *Haemonchus contortus*.

3.3.1.3. Mortalidad de Huevos de *Nematodirus spathiger* frente al extracto proteico total de *Bacillus thuringiensis* variedad *neoleonensis* T-24-001

TABLA Nº 3.6: MORTALIDAD DE HUEVOS DE *Nematodirus spathiger* FRENTE AL EXTRACTO PROTEICO TOTAL DE *Bacillus thuringiensis* VARIEDAD *neoleonensis* T-24-001

Huevos Frente a BT T-24-001			
Repeticiones	Horas		
	24	48	72
1	2	4	7
2	2	7	8
3	1	3	7
4	4	7	12
5	4	8	10
6	4	8	11
7	2	5	8
8	3	6	9
9	3	7	9
10	3	5	10
Promedio	2.8	6	9.1
Mortalidad Absoluta (%)	6.7	14.3	21.7
Mortalidad Corregida (%)	5.3	12.4	19.6

n = 42

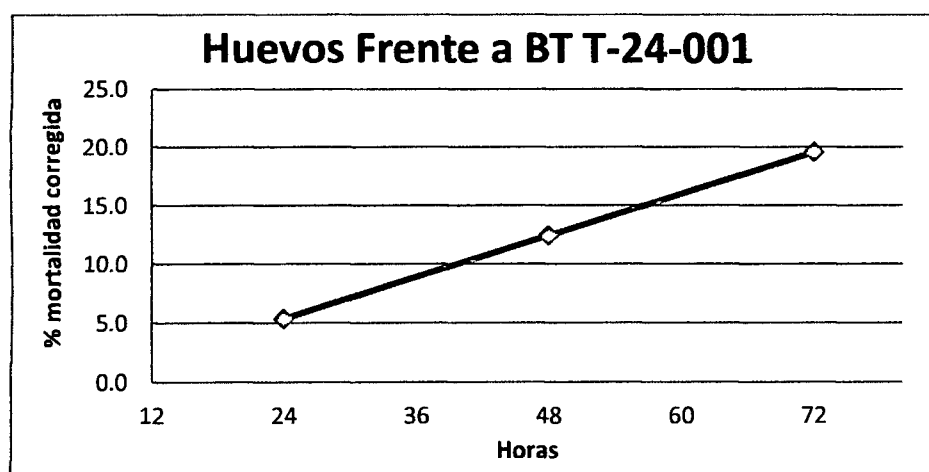


GRÁFICO Nº 3.4: Mortalidad de huevos de *Nematodirus spathiger* frente al extracto proteico total de *Bacillus thuringiensis* variedad *neoleonensis* T-24-001

Los resultados de las Tablas N° 3.6 y 3.9 sobre la actividad ovicida del extracto proteico total de Bt variedad *neoleonensis* (T-24-001), muestran que se presenta menor mortalidad de huevos de *Nematodirus spathiger*, en comparación a Bt variedad *kurstaki* (HD-1) y Bt variedad *thompsoni* (HD-542) con diferencia estadística significativa, siendo la mortalidad corregida de 5.3 % a las 24 h, 12.4 % a las 48 h y 19.6 % a las 72 h. La actividad ovicida de esta variedad no presenta diferencia estadística significativa sobre Bt variedad *israeliensis* (WHO-2013-9) a las 24 h, pero significativa a las 48 y 72 h, mientras que sobre Bt variedad *israeliensis* (HD-500) presenta diferencia estadística significativa a las 24 h y 72 h, pero no significativa a las 48 h. Por último Bt variedad *neoleonensis* (T-24-001) presenta diferencia estadística significativa a las 24, 48 y 72 h sobre el grupo control (Cuadros estadísticos N° 3.1, 3.2 y 3.3).

Estos resultados son inferiores a los obtenidos por la variedad Bt *kurstaki* HD-1 y Bt variedad *thompsoni* (HD-542), distando mucho de otros resultados obtenidos (López y col., 2002) cuando reportan actividad ovicida de hasta 98 y 99 % a las 24 y 48 h respectivamente, con toxinas de *Bacillus thuringiensis* tripsinizadas y solubilizadas sobre huevos de *Haemonchus contortus*.

3.3.1.4. Mortalidad de Huevos de *Nematodirus spathiger* frente al extracto proteico total de *Bacillus thuringiensis* variedad *israelensis* HD-500

TABLA N° 3.7: MORTALIDAD DE HUEVOS DE *Nematodirus spathiger* FRENTE AL EXTRACTO PROTEICO TOTAL DE *Bacillus thuringiensis* VARIEDAD *israelensis* HD-500

Huevos Frente a BT HD-500			
Repeticiones	Horas		
	24	48	72
1	2	6	10
2	2	6	9
3	2	7	7
4	1	7	8
5	2	4	6
6	4	6	6
7	3	8	9
8	2	6	9
9	1	5	7
10	2	8	9
Promedio	2.1	6.3	8
Mortalidad Absoluta (%)	5.0	15.0	19.0
Mortalidad Corregida (%)	3.6	13.1	16.9

n = 42

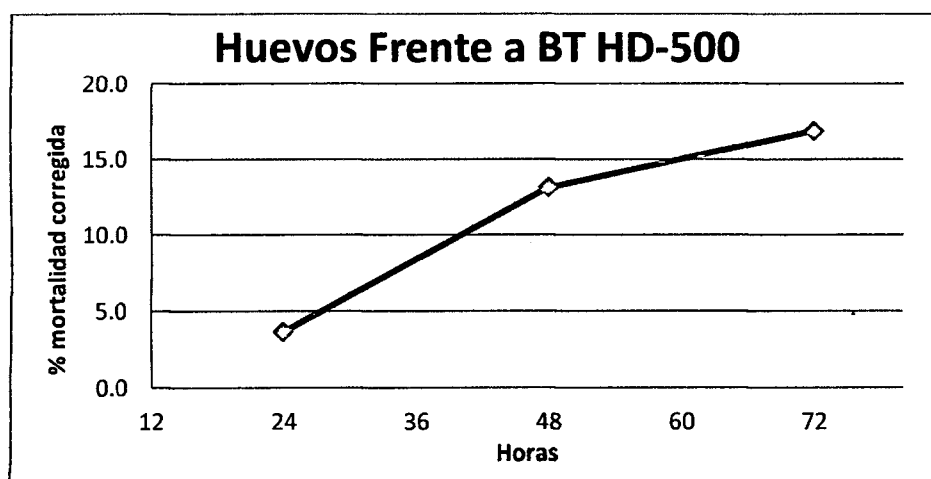


GRÁFICO N° 3.5: Mortalidad de huevos de *Nematodirus spathiger* frente al extracto proteico total de *Bacillus thuringiensis* variedad *israelensis* HD-500

Los resultados de las Tabla N° 3.7 y 3.9 sobre la actividad ovicida del extracto proteico total de Bt variedad *israeliensis* (HD-500), muestran menor mortalidad corregida de huevos de *Nematodirus spathiger*, en comparación a Bt variedad *kurstaki* (HD-1) y Bt variedad *thompsoni* (HD-542) con diferencia estadística significativa, siendo la mortalidad corregida de 3.6 % a las 24 h, 13.1 % a las 48 h y 16.9 % a las 72 h. La actividad ovicida de esta variedad no presenta diferencia estadística significativa con Bt variedad *israeliensis* (WHO-2013-9) a las 24 h, pero significativa a las 48 y 72 h, mientras que con Bt variedad *neoleonensis* (T-24-001) presenta diferencia estadística significativa a las 24 h y 72 h, pero no significativa a las 48 h. Por último Bt variedad *israeliensis* (HD-500) presenta diferencia estadística significativa a las 24, 48 y 72 h sobre el grupo control (Cuadros estadísticos N° 3.1, 3.2 y 3.3).

Estos resultados son inferiores a los obtenidos por la variedad Bt *kurstaki* HD-1 y Bt variedad *thompsoni* (HD-542), distando mucho de otros resultados obtenidos (López y col., 2002) cuando reportan actividad ovicida de hasta 98 y 99 % a las 24 y 48 h respectivamente, con toxinas de *Bacillus thuringiensis* tripsinizadas y solubilizadas sobre huevos de *Haemonchus contortus*.

3.3.1.5. Mortalidad de Huevos de *Nematodirus spathiger* frente al extracto proteico total de *Bacillus thuringiensis* variedad *israelensis* WHO-2013-9

TABLA N° 3.8: MORTALIDAD DE HUEVOS DE *Nematodirus spathiger* FRENTE AL EXTRACTO PROTEICO TOTAL DE *Bacillus thuringiensis* VARIEDAD *israelensis* WHO-2013-9

Huevos Frente a WHO-2013-9			
Repeticiones	Horas		
	24	48	72
1	2	7	8
2	4	5	5
3	2	4	5
4	2	5	6
5	3	4	6
6	2	4	4
7	1	4	4
8	2	5	6
9	2	5	5
10	4	5	8
Promedio	2.4	4.8	5.7
Mortalidad Absoluta (%)	5.7	11.4	13.6
Mortalidad Corregida (%)	4.3	9.5	11.2

n = 42

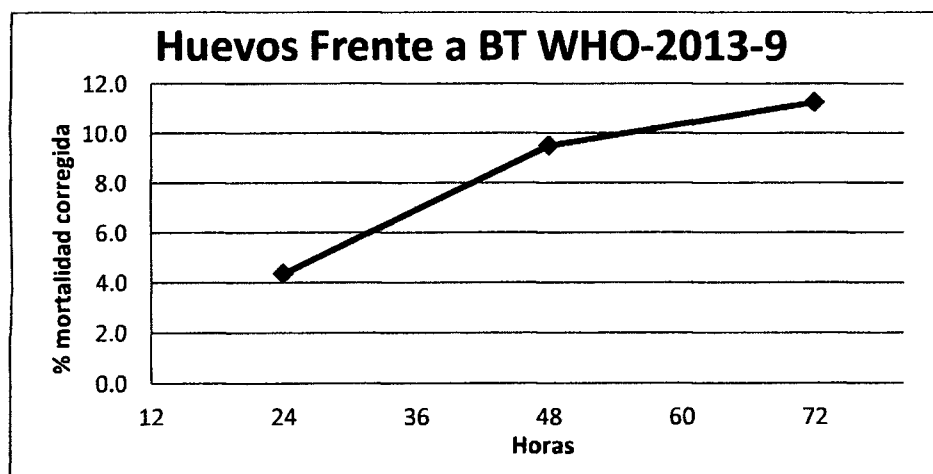


GRÁFICO N° 3.6: Mortalidad de huevos de *Nematodirus spathiger* frente al extracto proteico total de *Bacillus thuringiensis* variedad *israelensis* WHO-2013-9

Los resultados de las Tabla N° 3.8 y 3.9 sobre la actividad ovicida del extracto proteico total de Bt variedad *israeliensis* (WHO-2013-9), muestra menor mortalidad corregida de huevos de *Nematodirus spathiger* en comparación a las variedades Bt variedad *kurstaki* (HD-1) y Bt variedad *thompsoni* (HD-542) con diferencia estadística significativa, siendo la mortalidad corregida de 4.3 % a las 24 h, 9.5 % a las 48 h y 11.2 % a las 72 h. La actividad ovicida de esta variedad es inferior a Bt variedad *israeliensis* (HD-500) y Bt variedad *neoleonensis* (T-24-001) con diferencia estadística significativa a las 48 y 72 h, pero no significativa a las 24 h. Por último presenta diferencia estadística significativa a las 24, 48 y 72 h sobre el grupo control (Cuadros estadísticos N° 3.1, 3.2 y 3.3).

Estos resultados son inferiores a los obtenidos por la variedad Bt *kurstaki* HD-1 y Bt variedad *thompsoni* (HD-542), distando mucho de otros resultados obtenidos (López y col., 2002) cuando reportan actividad ovicida de hasta 98 y 99 % a las 24 y 48 h respectivamente, con toxinas de *Bacillus thuringiensis* tripsinizadas y solubilizadas sobre huevos de *Haemonchus contortus*.

TABLA N° 3.9: PORCENTAJE DE MORTALIDAD CORREGIDA DE HUEVOS DE *Nematodirus spathiger* FRENTE AL EXTRACTO PROTEICO TOTAL DE LAS VARIEDADES DE *Bacillus thuringiensis*.

MORTALIDAD CORREGIDA (%)			
VARIEDAD	24 horas	48 horas	72 horas
HD-1	22.5	29.0	44.7
HD-542	11.6	25.5	29.3
T-24-001	5.3	12.4	19.6
HD-500	3.6	13.1	16.9
WHO-2013-9	4.3	9.5	11.2
PROMEDIO	9.5	17.9	24.4

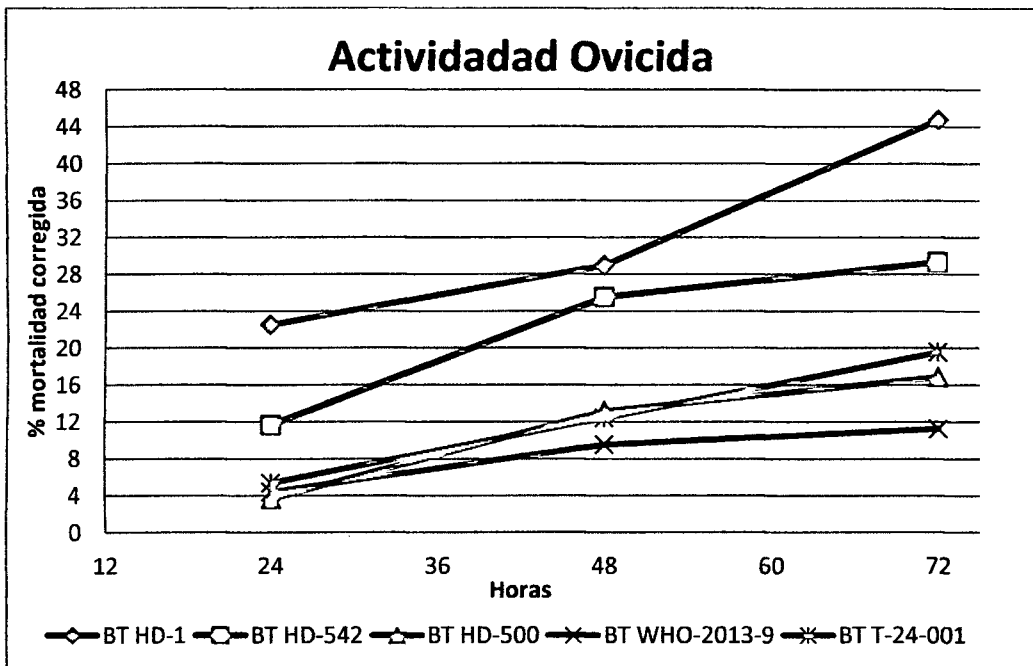


GRÁFICO N° 3.7: Comparación del porcentaje de mortalidad de huevos de *Nematodirus spathiger* frente al extracto proteico total de las variedades de *Bacillus thuringiensis*.

CUADRO ESTADISTICO N° 3.1

**ANÁLISIS PARA EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD OVICIDA DEL
EXTRACTO PROTÉICO TOTAL DE *Bacillus thuringiensis* A LAS 24
HORAS DE EXPOSICIÓN.**

ANVA Efecto Ovicida 24 horas							
FUENTE DE VARIACIÓN	GL	SC	CM	FC	FT		Nv Sig
					0.05	0.01	
Entre Tratamientos	5	558.333	111.667	71.277	2.394	3.391	**
Dentro de tratamientos	54	84.600	1.567				
Total	59	642.933					
CV	32.371						

- F.V. Fuente de Variación
- G.L. Grados de Libertad
- S.C. Suma de Cuadrados
- C.M. Cuadrado Medio
- FC Estadístico de Prueba
- FT Prueba de significancia
- ** Altamente significativo (α 0.05, α 0.01)
- * Significativo (α 0.05)
- N.S. No significativo

**PRUEBA DE TUKEY (P<0.05) PARA LA COMPARACIÓN DE
PROMEDIOS DE ACTIVIDAD OVICIDA DEL EXTRACTO PROTÉICO
TOTAL DE *Bacillus thuringiensis* A LAS 24 HORAS DE EXPOSICIÓN.**

Tratamiento	Promedios				
HD-1	22.5	a			
HD-542	11.6	b			
T-24-001	5.3		c		
WHO-2013-9	4.3		c	d	
HD-500	3.6			d	
Control	0.0				e

CUADRO ESTADISTICO N° 3.2

ANÁLISIS PARA EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD OVICIDA DEL EXTRACTO PROTÉICO TOTAL DE *Bacillus thuringiensis* A LAS 48 HORAS DE EXPOSICIÓN.

ANVA Efecto Ovicida 48 horas							
FUENTE DE VARIACIÓN	GL	SC	CM	FC	FT		Nv Sig
					0.05	0.01	
Entre Tratamientos	5	965.333	193.067	86.448	2.394	3.391	**
Dentro de tratamientos	54	120.600	2.233				
Total	59	1085.933					
CV	21.248						

- F.V. Fuente de Variación
 G.L. Grados de Libertad
 S.C. Suma de Cuadrados
 C.M. Cuadrado Medio
 FC Estadístico de Prueba
 FT Prueba de significancia
 ** Altamente significativo (α 0.05, α 0.01)
 * Significativo (α 0.05)
 N.S. No significativo

PRUEBA DE TUKEY (P<0.05) PARA LA COMPARACIÓN DE PROMEDIOS DE ACTIVIDAD OVICIDA DEL EXTRACTO PROTÉICO TOTAL DE *Bacillus thuringiensis* A LAS 48 HORAS DE EXPOSICIÓN.

Tratamiento	Promedios				
HD-1	29.0	a			
HD-542	25.5	b			
HD-500	13.1		c		
T-24-001	12.4		c		
WHO-2013-9	9.5			d	
Control	0.0				e

CUADRO ESTADISTICO N° 3.3

**ANÁLISIS PARA EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD OVICIDA DEL
EXTRACTO PROTÉICO TOTAL DE *Bacillus thuringiensis* A LAS 72
HORAS DE EXPOSICIÓN.**

ANVA Efecto Ovicida 72 horas							
FUENTE DE VARIACIÓN	GL	SC	CM	FC	FT		Nv Sig
					0.05	0.01	
Entre Tratamientos	5	1983.200	396.640	108.613	2.394	3.391	**
Dentro de tratamientos	54	197.200	3.652				
Total	59	2180.400					
CV	20.330						

- F.V. Fuente de Variación
- G.L. Grados de Libertad
- S.C. Suma de Cuadrados
- C.M. Cuadrado Medio
- FC Estadístico de Prueba
- FT Prueba de significancia
- ** Altamente significativo (α 0.05, α 0.01)
- * Significativo (α 0.05)
- N.S. No significativo

**PRUEBA DE TUKEY (P<0.05) PARA LA COMPARACIÓN DE
PROMEDIOS DE ACTIVIDAD OVICIDA DEL EXTRACTO PROTÉICO
TOTAL DE *Bacillus thuringiensis* A LAS 72 HORAS DE EXPOSICIÓN.**

Tratamiento	Promedios				
HD-1	44.7	a			
HD-542	29.3		b		
T-24-001	19.6			c	
HD-500	16.9				d
WHO-2013-9	11.2				e
Control	0.0				f

3.3.2. Efecto larvicida *in vitro* de *Bacillus thuringiensis*.

Las larvas L3 infectivas de *Nematodirus spathiger* muertas durante el enfrentamiento con el extracto proteico total de *Bacillus thuringiensis* se observaron inmóviles en forma de línea recta o semicurvas (López y col., 2002), cuando reportan inmovilidad larvaria en posición de línea recta de larvas L3 infectivas de *Haemonchus contortus* expuestos a las toxinas de *Bacillus thuringiensis* tripsinizadas y solubilizadas.

Las tablas nos muestran la mortalidad obtenida de las larvas L3 infectivas frente al extracto proteico total de *Bacillus thuringiensis*, a las 24, 48 y 72 horas.

TABLA N° 3.10: MORTALIDAD DE LARVAS L3 INFECTIVAS DE *Nematodirus spathiger* EN EL GRUPO CONTROL.

Grupo Control (Larvas L3 infectivas)			
	Horas		
Repeticiones	24	48	72
1	3	3	3
2	2	2	3
3	3	3	4
4	3	3	3
5	1	2	2
6	2	2	2
7	4	5	5
8	2	3	3
9	2	3	3
10	2	2	2
Promedio	2.4	2.8	3
Mortalidad (%)	1.8	2.1	2.2

n = 136

3.3.2.1. Mortalidad de larvas L3 infectivas de *Nematodirus spathiger* frente al extracto proteico total de *Bacillus thuringiensis* variedad *kurstaki* HD-1.

TABLA N° 3.11: MORTALIDAD DE LARVAS L3 INFECTIVAS DE *Nematodirus spathiger* FRENTE AL EXTRACTO PROTEICO TOTAL DE *Bacillus thuringiensis* VARIEDAD *kurstaki* HD-1.

Larvas L3 infectivas Frente a BT HD-1			
Repeticiones	Horas		
	24	48	72
1	43	76	82
2	38	77	81
3	41	58	63
4	40	59	65
5	32	52	59
6	36	48	52
7	39	51	55
8	37	53	58
9	42	64	69
10	39	48	53
Promedio	38.7	58.6	63.7
Mortalidad Absoluta (%)	28.5	43.1	46.8
Mortalidad Corregida (%)	27.2	41.9	45.6

n = 136

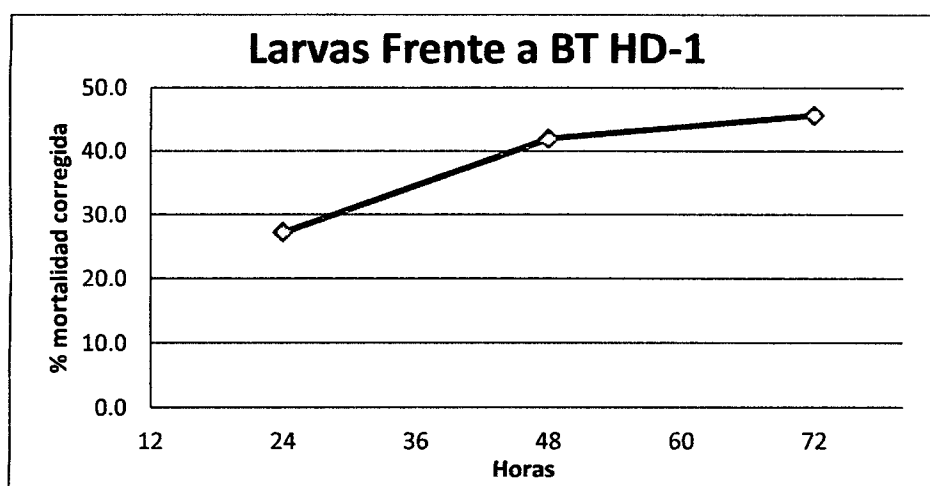


GRÁFICO N° 3.8: Mortalidad de larvas L3 infectivas de *Nematodirus spathiger* frente al extracto proteico total de *Bacillus thuringiensis* variedad *kurstaki* HD-1

Para el caso de los resultados de las Tablas N° 3.11 y 3.16 sobre la actividad larvicida del extracto proteico total de la variedad Bt *kurstaki* HD-1, nos muestran que se presenta una mortalidad corregida de larvas L3 infectivas de *Nematodirus spathiger* de 27.2 % a las 24 h, y esta mortalidad se incrementa hasta 41.9 y 45.6 % a las 48 y 72 h respectivamente. La actividad larvicida de esta variedad es la de mayor efectividad de las cinco variedades en estudio; hallándose diferencias estadísticas significativas de la variedad Bt *kurstaki* HD-1 sobre Bt variedad *thompsoni* (HD-542), Bt variedad *neoleonensis* (T-24-001), Bt variedad *israeliensis* (WHO-2013-9), Bt variedad *israeliensis* (HD-500) y también sobre el grupo control (Cuadros estadísticos N° 3.4, 3.5 y 3.6). Estos resultados observados no presentan similitud con otros resultados obtenidos (López y col., 2002) cuando reportan actividad larvicida de 70.8, 74.5 y 90 % a las 24, 48 y 72 h respectivamente, con toxinas de *Bacillus thuringiensis* tripsinizadas y solubilizadas sobre larvas L3 infectivas de *Haemonchus contortus*.

3.3.2.2. Mortalidad de larvas L3 infectivas de *Nematodirus spathiger* frente al extracto proteico total de *Bacillus thuringiensis* variedad *thompsoni* HD-542

TABLA N° 3.12: MORTALIDAD DE LARVAS L3 INFECTIVAS DE *Nematodirus spathiger* FRENTE AL EXTRACTO PROTEICO TOTAL DE *Bacillus thuringiensis* VARIEDAD *thompsoni* HD-542

Larvas L3 infectivas Frente a BT HD-542			
Repeticiones	Horas		
	24	48	72
1	17	24	28
2	15	26	27
3	17	34	36
4	20	36	41
5	19	21	21
6	16	22	23
7	15	23	31
8	21	32	35
9	18	21	24
10	19	31	39
Promedio	17.7	27	30.5
Mortalidad Absoluta (%)	13.0	19.9	22.4
Mortalidad Corregida (%)	11.5	18.2	20.7

n = 136

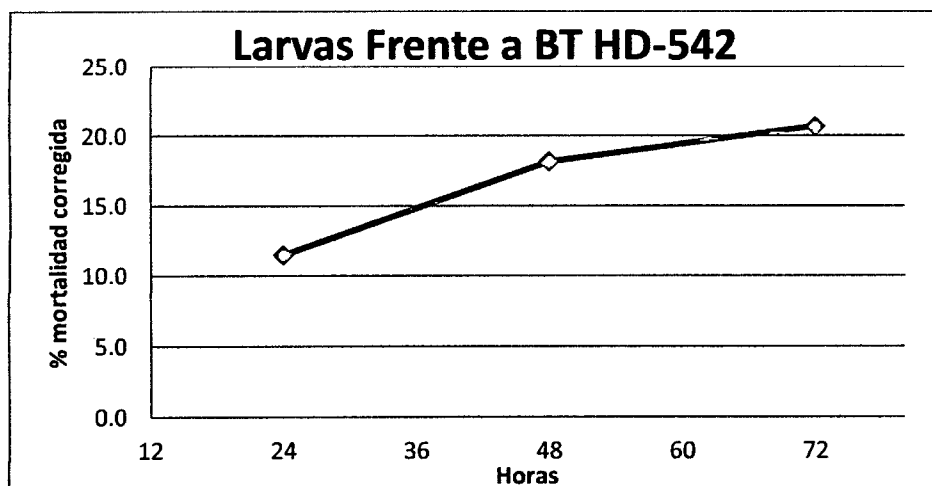


GRÁFICO N° 3.9: Mortalidad de larvas L3 infectivas de *Nematodirus spathiger* frente al extracto proteico total de *Bacillus thuringiensis* variedad *thompsoni* HD-542

Los resultados de las Tablas N° 3.12 y 3.16 sobre la actividad larvica del extracto proteico total de la variedad Bt *thompsoni* HD-542, muestran que se presenta mortalidad corregida de larvas L3 infectivas de *Nematodirus spathiger* de 11.5 % a las 24 h, 18.2 % a las 48 h y 20.7 % a las 72 h. La actividad larvica presentada por esta variedad es la segunda en efectividad luego de Bt variedad *kurstaki* HD-1 con diferencia estadística significativa. También se halló diferencias estadísticas significativas de Bt variedad *thompsoni* HD-542 sobre Bt variedad *israeliensis* (WHO-2013-9), Bt variedad *israeliensis* (HD-500), Bt variedad *neoleonensis* (T-24-001) y el grupo control (Cuadros estadísticos N° 3.4, 3.5 y 3.6).

Estos resultados son inferiores a los obtenidos por la variedad Bt *kurstaki* HD-1 y distan mucho de otros resultados obtenidos (López y col., 2002) cuando reportan actividad larvica de 70.8, 74.5 y 90 % a las 24, 48 y 72 h respectivamente, con toxinas de *Bacillus thuringiensis* tripsinizadas y solubilizadas sobre larvas L3 infectivas de *Haemonchus contortus*.

3.3.2.3. Mortalidad de larvas L3 infectivas de *Nematodirus spathiger* frente al extracto proteico total de *Bacillus thuringiensis* variedad *neoleonensis* T-24-001

TABLA Nº 3.13: MORTALIDAD DE LARVAS L3 INFECTIVAS DE *Nematodirus spathiger* FRENTE AL EXTRACTO PROTEICO TOTAL DE *Bacillus thuringiensis* VARIEDAD *neoleonensis* T-24-001

Larvas L3 infectivas Frente a BT T-24-001			
Repeticiones	Horas		
	24	48	72
1	2	8	13
2	3	9	12
3	3	7	11
4	2	5	11
5	2	8	14
6	5	8	12
7	4	7	13
8	2	6	9
9	3	9	11
10	3	5	9
Promedio	2.9	7.2	11.5
Mortalidad Absoluta (%)	2.1	5.3	8.5
Mortalidad Corregida (%)	0.4	3.3	6.4

n = 136

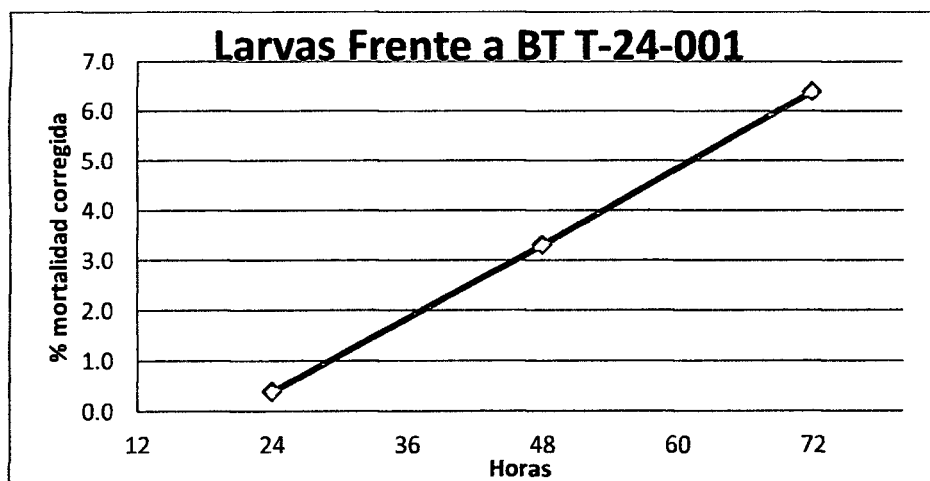


GRÁFICO Nº 3.10: Mortalidad de larvas L3 infectivas de *Nematodirus spathiger* frente al extracto proteico total de *Bacillus thuringiensis* variedad *neoleonensis* T-24-001

Los resultados de las Tablas N° 3.13 y 3.16, sobre la actividad larvicida del extracto proteico total de Bt variedad *neoleonensis* (T-24-001), muestran que se presenta menor mortalidad de larvas L3 infectivas de *Nematodirus spathiger* en comparación a Bt variedad *kurstaki* (HD-1) y Bt variedad *thompsoni* (HD-542) con diferencia estadística significativa, siendo una mortalidad corregida de 0.4 % a las 24 h, 3.3 % a las 48 h y 6.4 % a las 72 h. Esta variedad presenta menor mortalidad en comparación a Bt variedad *israeliensis* (HD-500) con diferencia estadística significativa a las 48 y 72 h, pero no a las 24 h. Con respecto a Bt variedad *israeliensis* (WHO-2013-9) no presenta diferencia estadística significativa a 24, 48 y 72 h. Por último Bt variedad *neoleonensis* (T-24-001) presenta diferencia estadística significativa sobre el grupo control sólo a las 72 h (Cuadros estadísticos N° 3.4, 3.5 y 3.6).

Estos resultados son inferiores a los obtenidos por la variedad Bt *kurstaki* HD-1 y Bt variedad *thompsoni* (HD-542), distando mucho de otros resultados obtenidos (López y col., 2002) cuando reportan actividad ovicida de hasta 98 y 99 % a las 24 y 48 h respectivamente, con toxinas de *Bacillus thuringiensis* tripsinizadas y solubilizadas sobre huevos de *Haemonchus contortus*.

3.3.2.4. Mortalidad de larvas L3 infectivas de *Nematodirus spathiger* frente al extracto proteico total de *Bacillus thuringiensis* variedad *israelensis* HD-500

TABLA N° 3.14: MORTALIDAD DE LARVAS L3 INFECTIVAS DE *Nematodirus spathiger* FRENTE AL EXTRACTO PROTEICO TOTAL DE *Bacillus thuringiensis* VARIEDAD *israelensis* HD-500

Larvas L3 infectivas Frente a BT HD-500			
Repeticiones	Horas		
	24	48	72
1	5	23	24
2	4	15	16
3	4	18	20
4	5	21	23
5	5	22	23
6	3	15	15
7	6	15	16
8	3	18	20
9	8	15	16
10	6	13	15
Promedio	4.9	17.5	18.8
Mortalidad Absoluta (%)	3.6	12.9	13.8
Mortalidad Corregida (%)	1.9	11.0	11.9

n = 136

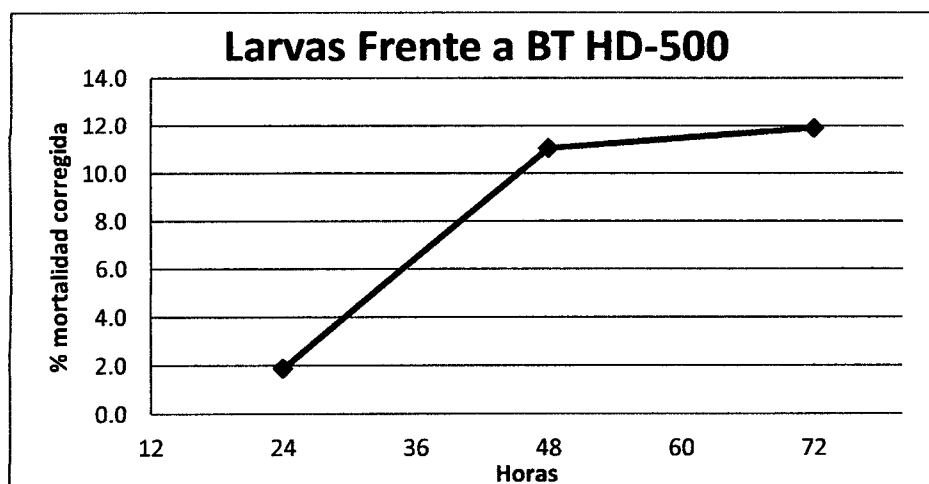


GRÁFICO N° 3.11: Mortalidad de larvas L3 infectivas de *Nematodirus spathiger* frente al extracto proteico total de *Bacillus thuringiensis* variedad *israelensis* HD-500

Los resultados de las Tablas N° 3.14 y 3.16, sobre la actividad larvicida del extracto proteico total de Bt variedad *israeliensis* (HD-500), muestran menor mortalidad corregida de larvas L3 infectivas de *Nematodirus spathiger* en comparación a Bt variedad *kurstaki* (HD-1) y Bt variedad *thompsoni* (HD-542) con diferencia estadística significativa, siendo una mortalidad corregida de 1.9 % a las 24 h, 11.0 % a las 48 h y 11.9 % a las 72 h. Esta variedad también presenta mortalidad sobre Bt variedad *neoleonensis* (T-24-001) siendo no significativa a las 24 h pero significativa a las 48 y 72 h, también presenta mayor mortalidad sobre Bt variedad *israeliensis* (WHO-2013-9) estadísticamente no significativa a las 24 h, pero significativa a las 48 y 72 horas. Por último Bt variedad *israeliensis* (HD-500) presenta diferencia estadística significativa sobre el grupo control a las 24, 48 y 72 h (Cuadros estadísticos N° 3.4, 3.5 y 3.6).

Estos resultados son inferiores a los obtenidos por la variedad Bt *kurstaki* HD-1 y Bt variedad *thompsoni* (HD-542), distando mucho de otros resultados obtenidos (López y col., 2002) cuando reportan actividad ovicida de hasta 98 y 99 % a las 24 y 48 h respectivamente, con toxinas de *Bacillus thuringiensis* tripsinizadas y solubilizadas sobre huevos de *Haemonchus contortus*.

3.3.2.5. Mortalidad de larvas L3 infectivas de *Nematodirus spathiger* frente al extracto proteico total de *Bacillus thuringiensis* variedad *israelensis* WHO-2013-9

TABLA N° 3.15: MORTALIDAD DE LARVAS L3 INFECTIVAS DE *Nematodirus spathiger* FRENTE AL EXTRACTO PROTEICO TOTAL DE *Bacillus thuringiensis* VARIEDAD *israelensis* WHO-2013-9

Larvas L3 infectivas Frente a BT WHO-2013-9			
Repeticiones	Horas		
	24	48	72
1	4	9	10
2	5	6	8
3	5	10	12
4	4	8	9
5	6	8	8
6	5	10	12
7	5	6	7
8	5	7	7
9	6	9	9
10	6	10	11
Promedio	5.1	8.3	9.3
Mortalidad Absoluta (%)	3.8	6.1	6.8
Mortalidad Corregida (%)	2.0	4.1	4.7

n = 136

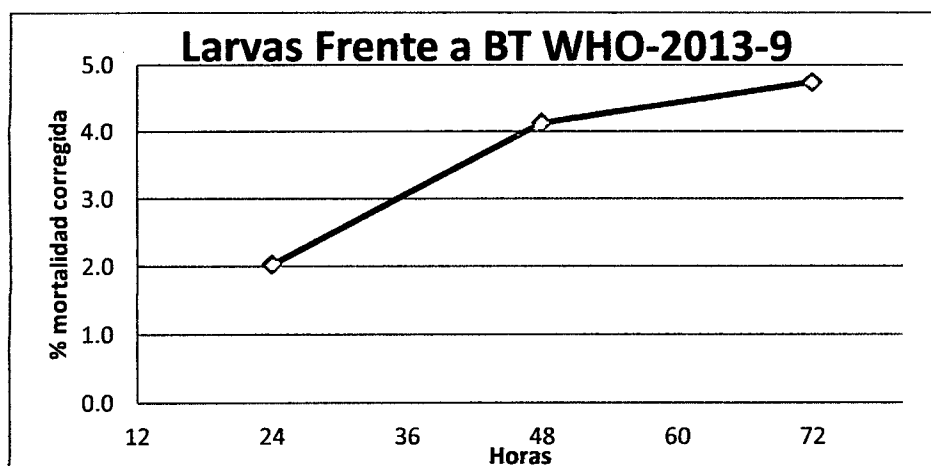


GRÁFICO N° 3.12: Mortalidad de larvas L3 infectivas de *Nematodirus spathiger* frente al extracto proteico total de *Bacillus thuringiensis* variedad *israelensis* WHO-2013-9.

Los resultados de las Tablas N° 3.15 y 3.16, sobre la actividad larvicida del extracto proteico total de Bt variedad *israeliensis* (WHO-2013-9), muestran menor mortalidad corregida de larvas L3 infectivas de *Nematodirus spathiger* en comparación a Bt variedad *kurstaki* (HD-1) y Bt variedad *thompsoni* (HD-542) con diferencia estadística significativa, siendo una mortalidad corregida de 2.0 % a las 24 h, 4.1 % a las 48 h y 4.7 % a las 72 h. La actividad larvicida de esta variedad es inferior a Bt variedad *israeliensis* (HD-500), siendo estadísticamente no significativa a las 24 h, pero significativa a las 48 y 72 h. Bt variedad *neoleonensis* (T-24-001) presenta mayor actividad larvicida, pero no presenta diferencia estadística significativa a las 24, 48 y 72 h. Por último Bt variedad *israeliensis* (WHO-2013-9) presenta diferencia estadística significativa sobre el grupo control sólo a las 24 h, mientras que a las 48 y 72 h no presenta diferencia estadística significativa (Cuadros estadísticos N° 3.4, 3.5 y 3.6).

Estos resultados son inferiores a los obtenidos por la variedad Bt *kurstaki* HD-1 y Bt variedad *thompsoni* (HD-542), distando mucho de otros resultados obtenidos (López y col., 2002) cuando reportan actividad ovicida de hasta 98 y 99 % a las 24 y 48 h respectivamente, con toxinas de *Bacillus thuringiensis* tripsinizadas y solubilizadas sobre huevos de *Haemonchus contortus*.

TABLA N° 3.16: PORCENTAJE DE MORTALIDAD CORREGIDA DE LARVAS L3 INFECTIVAS DE *Nematodirus spathiger* FRENTE AL EXTRACTO PROTEICO TOTAL DE LAS VARIEDADES DE *Bacillus thuringiensis*.

MORTALIDAD CORREGIDA (%)			
VARIEDAD	24 horas	48 horas	72 horas
HD-1	27.2	41.9	45.6
HD-542	11.5	18.2	20.7
T-24-001	0.4	3.3	6.4
HD-500	1.9	11.0	11.9
WHO-2013-9	2.0	4.1	4.7
PROMEDIO	8.6	15.7	17.9

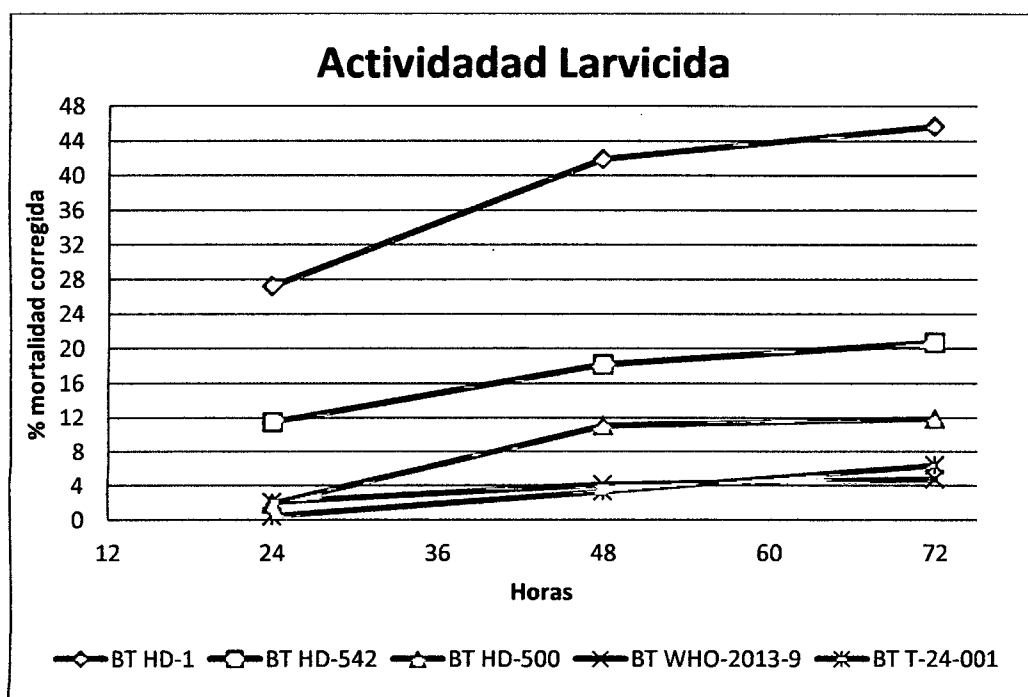


GRÁFICO N° 3.13: Comparación del porcentaje de mortalidad de larvas L3 infectivas de *Nematodirus spathiger* frente al extracto protéico total de las variedades de *Bacillus thuringiensis*.

CUADRO ESTADISTICO N° 3.4

**ANÁLISIS PARA EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA DEL
EXTRACTO PROTÉICO TOTAL DE *Bacillus thuringiensis* A LAS 24
HORAS DE EXPOSICIÓN.**

ANVA Efecto Larvicida 24 horas							
FUENTE DE VARIACIÓN	GL	SC	CM	FC	FT		Nv Sig
					0.05	0.01	
Entre Tratamientos	5	10183.550	2036.710	642.045	2.394	3.391	**
Dentro de tratamientos	54	171.300	3.172				
Total	59	10354.850					
CV	14.904						

- F.V. Fuente de Variación
- G.L. Grados de Libertad
- S.C. Suma de Cuadrados
- C.M. Cuadrado Medio
- FC Estadístico de Prueba
- FT Prueba de significancia
- ** Altamente significativo (α 0.05, α 0.01)
- * Significativo (α 0.05)
- N.S. No significativo

**PRUEBA DE TUKEY (P<0.05) PARA LA COMPARACIÓN DE
PROMEDIOS DE ACTIVIDAD LARVICIDA DEL EXTRACTO PROTÉICO
TOTAL DE *Bacillus thuringiensis* A LAS 24 HORAS DE EXPOSICIÓN.**

Tratamiento	Promedios				
HD-1	27.2	a			
HD-542	11.5		b		
WHO-2013-9	2.0			c	
HD-500	1.9			c	d
T-24-001	0.4			c	d e
Control	0.0				e

CUADRO ESTADISTICO N° 3.5

ANÁLISIS PARA EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA DEL EXTRACTO PROTÉICO TOTAL DE *Bacillus thuringiensis* A LAS 48 HORAS DE EXPOSICIÓN.

ANVA Efecto Larvicida 48 horas							
FUENTE DE VARIACIÓN	GL	SC	CM	FC	FT		Nv Sig
					0.05	0.01	
Entre Tratamientos	5	21414.533	4282.907	156.247	2.394	3.391	**
Dentro de tratamientos	54	1480.200	27.411				
Total	59	22894.733					
CV	25.876						

- F.V. Fuente de Variación
 G.L. Grados de Libertad
 S.C. Suma de Cuadrados
 C.M. Cuadrado Medio
 FC Estadístico de Prueba
 FT Prueba de significancia
 ** Altamente significativo (α 0.05, α 0.01)
 * Significativo (α 0.05)
 N.S. No significativo

PRUEBA DE TUKEY (P<0.05) PARA LA COMPARACIÓN DE PROMEDIOS DE ACTIVIDAD LARVICIDA DEL EXTRACTO PROTÉICO TOTAL DE *Bacillus thuringiensis* A LAS 48 HORAS DE EXPOSICIÓN.

Tratamiento	Promedios			
HD-1	41.9	a		
HD-542	18.2		b	
HD-500	11.0			c
WHO-2013-9	4.1			d
T-24-001	3.3			d
Control	0.0			d

CUADRO ESTADISTICO N° 3.6

ANÁLISIS PARA EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA DEL EXTRACTO PROTÉICO TOTAL DE *Bacillus thuringiensis* A LAS 72 HORAS DE EXPOSICIÓN.

ANVA Efecto Larvicida 72 horas							
FUENTE DE VARIACIÓN	GL	SC	CM	FC	FT		Nv Sig
					0.05	0.01	
Entre Tratamientos	5	24500.800	4900.160	158.562	2.394	3.391	**
Dentro de tratamientos	54	1668.800	30.904				
Total	59	26169.600					
CV	24.382						

- F.V. Fuente de Variación
 G.L. Grados de Libertad
 S.C. Suma de Cuadrados
 C.M. Cuadrado Medio
 FC Estadístico de Prueba
 FT Prueba de significancia
 ** Altamente significativo (α 0.05, α 0.01)
 * Significativo (α 0.05)
 N.S. No significativo

PRUEBA DE TUKEY ($P < 0.05$) PARA LA COMPARACIÓN DE PROMEDIOS DE ACTIVIDAD LARVICIDA DEL EXTRACTO PROTÉICO TOTAL DE *Bacillus thuringiensis* A LAS 72 HORAS DE EXPOSICIÓN.

Tratamiento	Promedios				
HD-1	45.6	a			
HD-542	20.7		b		
HD-500	11.9			c	
T-24-001	6.4				d
WHO-2013-9	4.7				d e
Control	0.0				e

TABLA N° 3.17: PORCENTAJE DE MORTALIDAD CORREGIDA DE HUEVOS DE *Nematodirus spathiger* A LAS 72 HORAS Y CONCENTRACIÓN (mg/ml) DEL EXTRACTO PROTEICO TOTAL DE LAS CINCO VARIEDADES DE *Bacillus thuringiensis*.

VARIEDAD	Concentración. (mg/ml)	Mortalidad Corregida (%) a las 72 horas
BT HD-1	5.042	44.74
BT HD-542	3.172	29.34
BT HD-500	3.019	16.87
BT WHO-2013-9	3.076	11.25
BT T-24-001	2.256	19.56

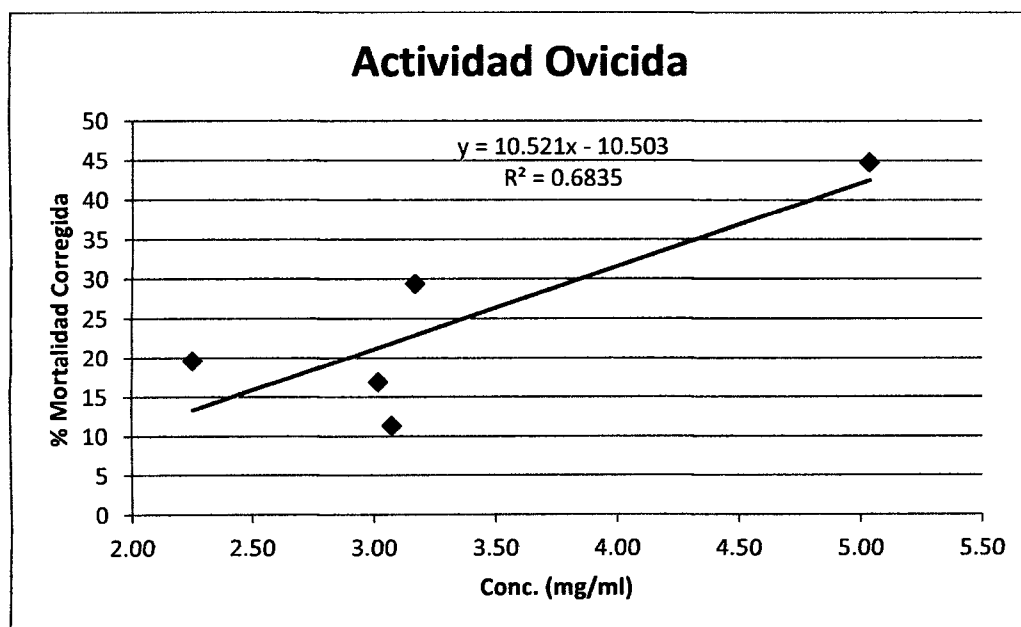


GRÁFICO N° 3.14: Comparación del porcentaje de mortalidad corregida de huevos de *Nematodirus spathiger* a las 72 horas frente a la concentración (mg/ml) del extracto proteico total de las cinco variedades de *Bacillus thuringiensis*.

CUADRO ESTADISTICO N° 3.7

REGRESIÓN LINEAL DE LA ACTIVIDAD OVICIDA EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO PROTÉICO TOTAL DE *Bacillus thuringiensis* A LAS 72 HORAS DE EXPOSICIÓN.

Conc. (mg/ml)	X	5.042	3.172	3.019	3.076	2.256
Acitividad Ovicida	Y	44.74	29.34	16.87	11.25	19.56

Nº	X _i	Y _i	X ²	Y ²	X _i Y _i	Y _i	Y _i -Y	Y _i -Y	Error	SC (TOT)	SC (Regre)	SC (Error)
1	2.26	19.56	5.09	382.59	44.12	13.2	-4.79	-11.12	6.33	22.96	123.71	40.07
2	3.08	11.25	9.46	126.49	34.60	21.9	-13.11	-2.49	-10.62	171.74	6.19	112.70
3	3.02	16.87	9.11	284.61	50.93	21.3	-7.48	-3.09	-4.39	55.98	9.56	19.28
4	3.17	29.34	10.06	860.83	93.06	22.9	4.99	-1.49	6.47	24.88	2.21	41.90
5	5.04	44.74	25.42	2001.96	225.59	42.5	20.39	18.19	2.20	415.80	330.94	4.84
Σ	16.56	121.76	59.15	3656.48	448.31	121.76	0.00	0.00	0.00	691.36	472.60	218.79
Prom	3.31	24.35										

ANVA Actividad Ovicida						
FV	GL	SC	CM	FC	FT	
					0.05	0.01
Regresión	1	472.60	472.60	6.48	10.13	34.12
Error	3	218.79	72.93		n.s.	n.s.
Total	4	691.36				

n.s.	No significativo
**	Altamente Significativo
*	Significativo

F_c < F_T

Se acepta la hipótesis

No existe regresión

No existe relación funcional entre la concentración (mg/ml) con la actividad ovicida

TABLA N° 3.18: PORCENTAJE DE MORTALIDAD CORREGIDA DE LARVAS L3 INFECTIVAS DE *Nematodirus spathiger* A LAS 72 HORAS Y CONCENTRACIÓN (mg/ml) DEL EXTRACTO PROTEICO TOTAL DE LAS CINCO VARIEDADES DE *Bacillus thuringiensis*.

VARIEDAD	Concentración. (mg/ml)	Mortalidad Corregida (%) a las 72 horas
BT HD-1	5.042	45.64
BT HD-542	3.172	20.68
BT HD-500	3.019	11.88
BT WHO-2013-9	3.076	4.74
BT T-24-001	2.256	6.39

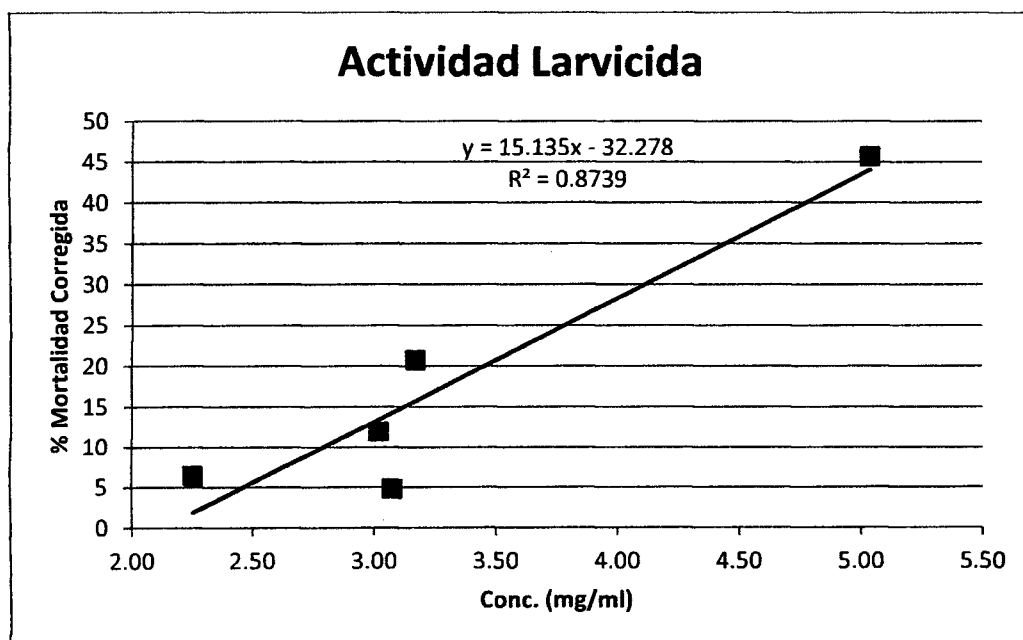


GRÁFICO N° 3.15: Comparación del porcentaje de mortalidad corregida de larvas L3 infectivas de *Nematodirus spathiger* a las 72 horas frente a la concentración (mg/ml) del extracto proteico total de las cinco variedades de *Bacillus thuringiensis*.

CUADRO ESTADISTICO N° 3.8

REGRESIÓN LINEAL DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO PROTÉICO TOTAL DE *Bacillus thuringiensis* A LAS 72 HORAS DE EXPOSICIÓN.

Conc. (mg/ml)	X	5.042	3.172	3.019	3.076	2.256
Acitividad Larvicida	Y	45.64	20.68	11.88	4.74	6.39

							Total	Regresión	Error	SC (TOT)	SC (Regre)	SC (Error)
Nº	X _i	Y _i	X ²	Y ²	X _i Y _i	Y _i	Y _i -Y	Y _i -Y	Y _i -Y _i	(Y _i -Y) ²	(Y _i -Y) ²	(Y _i -Y _i) ²
1	2.26	6.39	5.09	40.84	14.42	1.9	-11.47	-16.00	4.53	131.65	256.07	20.51
2	3.08	4.74	9.46	22.44	14.57	14.3	-13.13	-3.58	-9.55	172.34	12.83	91.12
3	3.02	11.88	9.11	141.13	35.87	13.4	-5.98	-4.45	-1.54	35.82	19.79	2.36
4	3.17	20.68	10.06	427.53	65.58	15.7	2.81	-2.14	4.95	7.91	4.57	24.50
5	5.04	45.64	25.42	2082.93	230.11	44.0	27.77	26.17	1.61	771.42	684.75	2.58
Σ	16.56	89.32	59.15	2714.86	360.55	89.32	0.00	0.00	0.00	1119.13	978.02	141.07
Prom	3.31	17.86										

ANVA Actividad Larvicida						
FV	GL	SC	CM	FC	FT	
					0.05	0.01
Regresión	1	978.02	978.02	20.8	10.13	34.12
Error	3	141.07	47.02		*	n.s.
Total	4	1119.13				

n.s.	No significativo
**	Altamente Significativo
*	Significativo

0.05	Fc > FT	Se rechaza la hipótesis, Si existe regresión
0.01	Fc < FT	Se acepta la hipótesis, No existe regresión

Existe relación funcional significativa entre la concentración (mg/ml) con la actividad larvicida

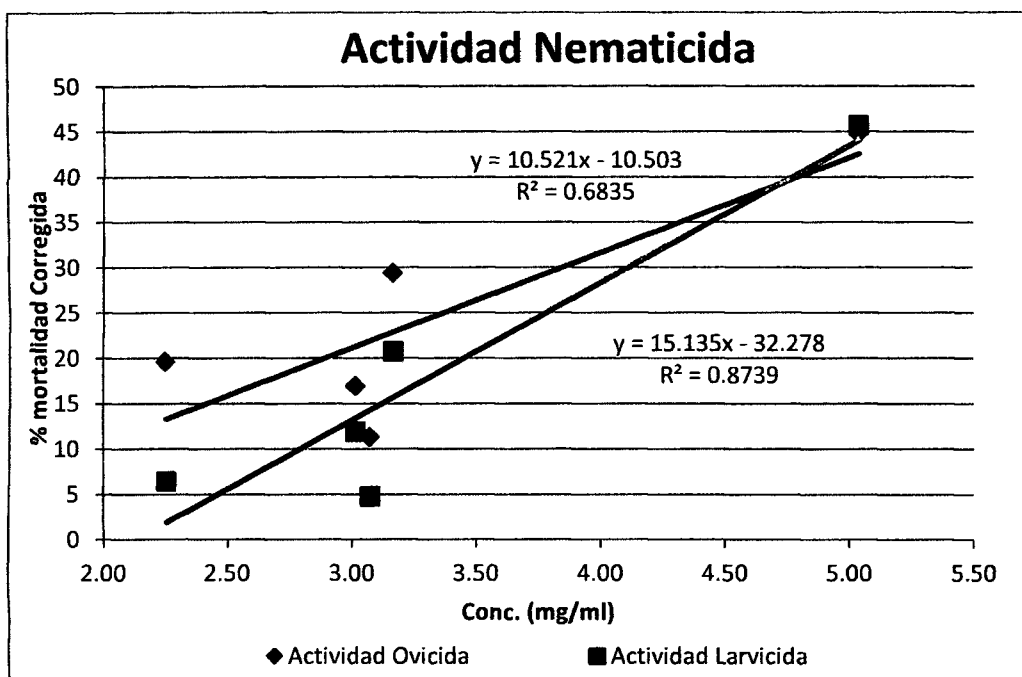


GRÁFICO N° 3.16: Comparación del porcentaje de mortalidad corregida de huevos y larvas L3 infectivas de *Nematodirus spathiger* a las 72 horas frente a la concentración (mg/ml) del extracto proteico total de las cinco variedades de *Bacillus thuringiensis*.

En las Tablas N° 3.1, 3.17 y 3.18 se puede apreciar los valores de absorvancia y la concentración de proteínas en mg/ml de las cinco variedades de *Bacillus thuringiensis*. Analizando los resultados obtenidos, se puede mencionar que las cinco variedades en estudio presentan diferente concentración proteica, observándose que la variedad *Bt kurstaki* HD-1 es la de mayor concentración de proteínas con 5.042 mg/ml, seguida de la variedad *Bt thompsoni* HD-542 con 3.172 mg/ml, *Bt israelensis* WHO-2013-9 con 3.076 mg/ml, *Bt israelensis* HD-500 con 3.019 mg/ml y por último la variedad *Bt neoleonensis* T-24-001 con 2.256 mg/ml con la menor concentración observada. Estos resultados se sometieron a un análisis de regresión lineal para establecer la relación funcional entre la concentración (mg/ml) con la actividad nematicida, en este sentido el presente trabajo no guarda similitud al análisis de dosis mortalidad (Flores y col., 2010) donde se determinó los niveles de

susceptibilidad de *Anopheles pseudopunctipennis* y *Culex spp* frente a diferentes concentraciones letales de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus sphaericus*.

La actividad tóxica de la bacteria *Bacillus thuringiensis* está íntimamente relacionada con la presencia de las proteínas Cry; sin embargo, la actividad nematocida específica se relaciona con la presencia de proteínas Cry 5, Cry 6, Cry 12, Cry 13 y Cry 14 reportadas (Shin et al., 1995; y Yadav, 2007) (Anexos N° 03 y 04).

***Bacillus thuringiensis* variedad *kurstaki* HD-1**

En concordancia con las Tablas N° 3.17 y 3.18, es la variedad que presentó la mayor concentración proteica, 5.042 mg/ml y el mayor efecto ovicida y larvicida, siendo no significativa el ANVA de la regresión para la relación funcional entre la concentración proteica de Bt con la actividad ovicida (Cuadro estadístico N° 3.7), pero significativa el ANVA de la regresión para la relación funcional entre la concentración proteica de Bt con la actividad larvicida (Cuadro estadístico N° 3.8). Este análisis no es comparable con otros trabajos realizados con *Bacillus thuringiensis*.

La actividad ovicida y larvicida de Bt variedad *kurstaki* HD-1 guarda relación con otros trabajos (Shin et al., 1995; y Yadav, 2007), donde se menciona que esta variedad presenta las proteínas Cry 5, Cry 6 y Cry 12 con actividad nematocida.

***Bacillus thuringiensis* variedad *thompsoni* (HD-542)**

En concordancia con las Tablas N° 3.17 y 3.18, es la variedad con la segunda mayor concentración proteica, 3.172 mg/ml, el segundo mayor efecto ovicida 29.34 % y el segundo mayor efecto larvicida 20.68 %, siendo no significativa el ANVA de regresión para la relación funcional entre la concentración proteica de Bt con la actividad ovicida (Cuadro estadístico N° 3.7), pero significativa el ANVA de regresión para la relación funcional entre la concentración proteica de Bt con la actividad larvicida (Cuadro estadístico N° 3.8). Como se mencionó anteriormente,

este análisis no es comparable con otros trabajos realizados con *Bacillus thuringiensis*.

La actividad ovicida y larvicida de Bt variedad *thompsoni* (HD-542) guarda relación con otros trabajos (Shin et al., 1995; y Yadav, 2007), donde se menciona que esta variedad presenta la proteína Cry 5 con actividad nematocida.

***Bacillus thuringiensis* variedad *neoleonensis* (T-24-001)**

En concordancia con las Tablas N° 3.17 y 3.18, es la variedad con la menor concentración proteica, 2.256 mg/ml, actividad ovicida corregida de 19.56 % y actividad larvicida corregida de 6.39 %, siendo no significativa el ANVA de regresión para la relación funcional entre la concentración proteica de Bt con la actividad ovicida (Cuadro estadístico N° 3.7), pero significativa el ANVA de regresión para la relación funcional entre la concentración proteica de Bt con la actividad larvicida (Cuadro estadístico N° 3.8). Como se mencionó anteriormente, este análisis no es comparable con otros trabajos realizados con *Bacillus thuringiensis*.

La actividad ovicida y larvicida de Bt variedad *neoleonensis* (T-24-001) guarda relación con otros trabajos (Shin et al., 1995; y Yadav, 2007), donde se menciona que esta variedad presenta la proteína Cry 6 con actividad nematocida.

***Bacillus thuringiensis* variedad *israeliensis* (HD-500)**

En concordancia con las Tablas N° 3.17 y 3.18, esta variedad presenta una concentración proteica de 3.019 mg/ml, actividad ovicida corregida de 16.87 % y actividad larvicida corregida de 11.88 %, siendo no significativa el ANVA de regresión para la relación funcional entre la concentración proteica de Bt con la actividad ovicida (Cuadro estadístico N° 3.7), pero significativa el ANVA de regresión para la relación funcional entre la concentración proteica de Bt con la actividad larvicida (Cuadro estadístico N° 3.8). Como se mencionó anteriormente, este análisis no es comparable con otros trabajos realizados con *Bacillus thuringiensis*.

La actividad ovicida y larvicida de Bt variedad *israeliensis* (HD-500) guarda relación con otros trabajos (Shin et al., 1995; y Yadav, 2007), donde se menciona que esta variedad presenta la proteína Cry 14 con actividad nematocida.

***Bacillus thuringiensis* variedad *israeliensis* (WHO-2013-9)**

En concordancia con las Tablas N° 3.17 y 3.18, esta variedad presenta una concentración proteica de 3.076 mg/ml, actividad ovicida corregida de 11.25 % y actividad larvicida corregida de 4.74 %, siendo no significativa el ANVA de regresión para la relación funcional entre la concentración proteica de Bt con la actividad ovicida (Cuadro estadístico N° 3.7), pero significativa el ANVA de regresión para la relación funcional entre la concentración proteica de Bt con la actividad larvicida (Cuadro estadístico N° 3.8). Como se mencionó anteriormente, este análisis no es comparable con otros trabajos realizados con *Bacillus thuringiensis*.

La actividad ovicida y larvicida de Bt variedad *israeliensis* (WHO-2013-9) guarda relación con otros trabajos (Shin et al., 1995; y Yadav, 2007), donde se menciona que esta variedad presenta la proteína Cry 14 con actividad nematocida.

CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES

1. Se obtuvo el extracto proteico total de las cinco variedades de *Bacillus thuringiensis* y luego se determinó la concentración de cada suspensión proteica, siendo la mayor concentración proteica observada *Bacillus thuringiensis* variedad *kurstaki* HD-1.
2. Se obtuvieron huevos y las larvas L3 infectivas de *Nematodirus spathiger* para luego ser enfrentadas al extracto proteico total de las cinco variedades de *Bacillus thuringiensis* a 25°C por 24, 48 y 72 h.
3. Producto de la evaluación de la actividad letal *in vitro* del extracto proteico total de *Bacillus thuringiensis* sobre huevos y larvas (L3) infectivas de *Nematodirus spathiger*, se encontró efecto ovicida y larvicida por parte de las cinco variedades en estudio de *Bacillus thuringiensis*, a las a las 24, 48 y 72 h de la exposición, siendo el mayor efecto ovicida y larvicida ofrecido por *Bacillus thuringiensis* variedad *kurstaki* HD-1.
4. Se determinó el porcentaje de eficiencia antihelmíntica *in vitro* del extracto proteico total de *Bacillus thuringiensis* sobre huevos y larvas (L3) infectivas de *Nematodirus spathiger*. *Bacillus thuringiensis* variedad *Kurstaki* HD-1, ofreció el mayor porcentaje de eficiencia antihelmíntica, 44.7 % de actividad ovicida y 45.6 % de actividad larvicida a las 72 horas de la exposición.

CAPÍTULO V: RECOMENDACIONES

Luego de la ejecución del presente trabajo de investigación se recomienda:

1. Realizar bioensayos de actividad letal sobre huevos y larvas L3 infectivas, determinando la concentración óptima para ocasionar mortalidad tanto de huevos como de larvas con cada cepa de la bacteria trabajada y teniendo en cuenta la temperatura y el tiempo de efecto antes de realizar pruebas en el campo.
2. Realizar trabajos de actividad letal sobre las formas libres de otros nemátodos gastrointestinales de rumiantes existentes en la región, para una mejor confirmación de las cepas a trabajar.
3. Seguir en la búsqueda de cepas de bacterias u otros microorganismos con potencial nematicida para la conformación de un cepario de microorganismos controladores de nemátodos y a futuro ser considerados en programas de control de las parasitosis gastrointestinales
4. Realizar trabajos donde se pueda probar formulaciones líquidas o en solución frente a preparaciones en polvo u otras formulaciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Abbott, A., Taylor, M. y Stubbings, A.** 2009. Sustainable worm control strategies for sheep. A technical manual for veterinary surgeons and advisers. 3rd Edition. Worcestershire – UK.
2. **Cabello, T.** 2006. Entomopatógenos y sus características. Control biológico. UPS/UAL.
3. **Colditz, I.** 2008. Challenges to the development of new tests for diagnosis of infection and prediction of resistance of sheep to gastrointestinal nematodes. Cooperative Research Centre for Sheep Industry Innovation. University of New England. Armidale - Australia.
4. **Cundia, O.** 2009. Efecto patogénico de la cepa *Bacillus sphaericus* sobre larvas de *Anopheles pseudopunctipennis*. Iguain, Huanta – Ayacucho 2250 msnm. Tesis - UNSCH. Facultad de Ciencias Biológicas. Ayacucho – Perú.
5. **Errecalde, J.** 2004. Uso de antimicrobianos en animales de consumo, Incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina. FAO Producción y Sanidad Animal. Roma.
6. **FAO.** 2003. Resistencia a los Antiparasitarios: Estado actual con énfasis en América Latina. Dirección de Producción y Salud Animal. Roma.
7. **Flores, A., Woolcott, J., Egusquiza, R., Patiño, A., Huerta, D. y García, F.** 2010. Biodiversidad de *Bacillus thuringiensis* patotipos II y IV y *Bacillus sphaericus* aislados de suelos agrícolas peruanos. UNMSM. Lima.
8. **Gomez, D.** 1983. Identificación de nemátodos intestinales en ovinos criollos de acuerdo a la edad, sexo y época, beneficiados en el camal de Ayacucho (2800 m.s.n.m.) Enero – Setiembre. Tesis – UNSCH. Facultad de Ciencias Biológicas. Ayacucho – Perú.
9. **Herrera, D., Liéban, E., Lopez, M., Mendoza, P. y Vázquez V.** 2004. Diagnóstico y control de los nemátodos gastrointestinales de los

- rumiantes en México. INIFAP – CENID – PAVET. Jiutepec, Morelos – México.
10. **Hidalgo, D.** 2004. Parásitos gastrointestinales y *Fasciola Hepatica* en ovinos de pequeños agricultores mapuches de la Comuna de Padre las Casas IX Región, Chile. Tesis – Universidad Católica de Temuco. Facultad de Acuicultura y Ciencias Veterinarias. Temuco – Chile.
 11. **Kassai, T.** 2002. Helminología Veterinaria. Primera Edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza – España.
 12. **Lecuona, R.** 1995. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. IMYZA – CICA – INTA Castelar - Argentina.
 13. **Leguía, P. y Casas, E.** 1999. Enfermedades parasitarias y atlas parasitológico de camélidos sudamericanos. Editorial de Mar. Lima.
 14. **López, P., Rojas, A., Ospina, S. y Cerón, J.** 2009. Activity of *Bacillus thuringiensis* hybrid protein against a lepidopteran and a coleopteran pest. Fems Microbiology Letters. Inglaterra.
 15. **López, A., Flores, C., Mendoza, G., Bravo, P., Herrera, R., Liéban, H., Vázquez, P. y Vargas, U.** 2002. *In vitro* lethal activity of *Bacillus Thuringiensis* toxins against *Haemonchus contortus* eggs and infective larvae. Proyecto Control Biológico. Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria (CENID – PAVET) INIFAP. Morelos – México.
 16. **López, A., Flores, C., Mendoza, G., Vázquez, P., Liéban, H., Bravo, P., Herrera, R., Godines, E., Vargas, U. y Zamudio, F.** 2006. Use of *Bacillus thuringiensis* toxins as an alternative method of control against *Haemonchus contortus*. Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria (CENID – PAVET) INIFAP. Morelos – México.
 17. **Lumaret, J. y Martínez, M.** 2005. El impacto de productos veterinarios sobre insectos coprófagos: consecuencias sobre la degradación del estiércol en pastizales. Acta Zoológica Mexicana. 21 (3): 137-148.

18. **Márquez, D.** 2007. Resistencia a los antihelmínticos en nemátodos de rumiantes y estrategias para su control. Grupo de Salud Animal. Corpoica - Ceisa. Bogotá.
19. **Mendoza, P.** 2000. Control alternativo de las helmintosis en rumiantes. Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria. INIFAP-SAGAR. Morelos - México.
20. **Mujica, F. y Chuchón S.** 1996. Bioensayos de toxicidad de *Bacillus thuringiensis* Variedad *Kurstaki* en larvas de polilla de la papa. UNSCH, Ayacucho – Perú.
21. **Olaechea, F.** 2005. Ecto y Endoparásitos, Epidemiología y Control. Seminario de Actualización en Ovinos - INTA. Sitio Argentino de Producción Animal. Bariloche – Argentina.
22. **Prado, M.** 1995. Determinación de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus sphaericus* en muestras de agua y suelo de las provincias de Huamanga y Huanta. Tesis – UNSCH. Facultad de Ciencias Biológicas. Ayacucho – Perú.
23. **Radostits, O., Gay, C., Blood, D. y Hinchcliff, K.** 1999. Medicina Veterinaria, Tratado de las Enfermedades del Ganado Bovino, Ovino, Porcino, Caprino y Equino. Vol. II. Novena Edición. McGraw - Hill. Interamericana, S.A.U. Madrid.
24. **Shin, S., Park, H., Choi, K., Koo, T., Lee, T. y Kim, I.** 1995. Distribution of *cry V* – Type insecticidal protein genes in *Bacillus thuringiensis* and cloning of *cry V* – Type genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *Entomocidus*. Genetic Engineering Research Institute, Korea Institute of Science and Technology and Department of Biotechnology. Taejon - Korea.
25. **Urquhart, G., Armour, J., Duncan, J., Dunn, A. y Jennings F.** 2001. Parasitología Veterinaria. Departamento de Parasitología y Enfermedades Parasitarias. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza - España.

26. Yadav, B. 2007 Molecular characterization of *cry / vip* genes and efficacy of native *Bacillus thuringiensis* isolates. Department of Plant Biotechnology College of Agriculture. University of Agricultural Sciences. Dharwad – India.

ANEXOS

Anexo N° 01

DIAS QUE SE TOMARON LAS MUESTRAS DE HECES DE OVINO EN EL CAMAL DE QUICAPATA.

N° de Muestra	Fecha de Muestreo	N° de Muestras Colectadas
1	06/03/2011	10
2	13/03/2011	10
3	20/03/2011	10
4	27/03/2011	10
5	03/04/2011	10
6	10/04/2011	10

Anexo N° 02

INCUBACIÓN DE HUEVOS DE *Nematodirus spathiger* Y FECHA DE INOCULACIÓN AL OVINO JOVEN CON LARVAS L3 INFECTIVAS

Fecha de Muestreo	Inicio de Incubación	Fecha de Inoculación al Ovino
06/03/2011	07/03/2011	17/05/2011
13/03/2011	14/03/2011	17/05/2011
20/03/2011	21/03/2011	19/05/2011
27/03/2011	28/03/2011	19/05/2011
03/04/2011	04/04/2011	21/05/2011
10/04/2011	11/04/2011	21/05/2011

DESPARACITACIÓN DEL OVINO JOVEN: JUEVES 28 /04/2011

Anexo N° 03

TIPIFICACIÓN DE LAS 5 CEPAS BACTERIANAS DE *Bacillus thuringiensis* POR LA PRESENCIA DE ENDOTOXINAS CON ACTIVIDAD NEMATICIDA

	Cepa	cry5	cry 6	cry 12	cry 13	cry 14
1	<i>B th. kurstaki</i> HD-1	+	+	+		
2	<i>B th. israelensis</i> WHO-2013-9	-	-	-		+
3	<i>B th. israelensis</i> HD-500	-	-	-		+
4	<i>B th. thompsoni</i> HD-542	+	-	-		-
5	<i>B th. neoleonensis</i> T-24-001		+			

Fuente: Shin et al., 1995; y Yadav, 2007

Anexo N° 04

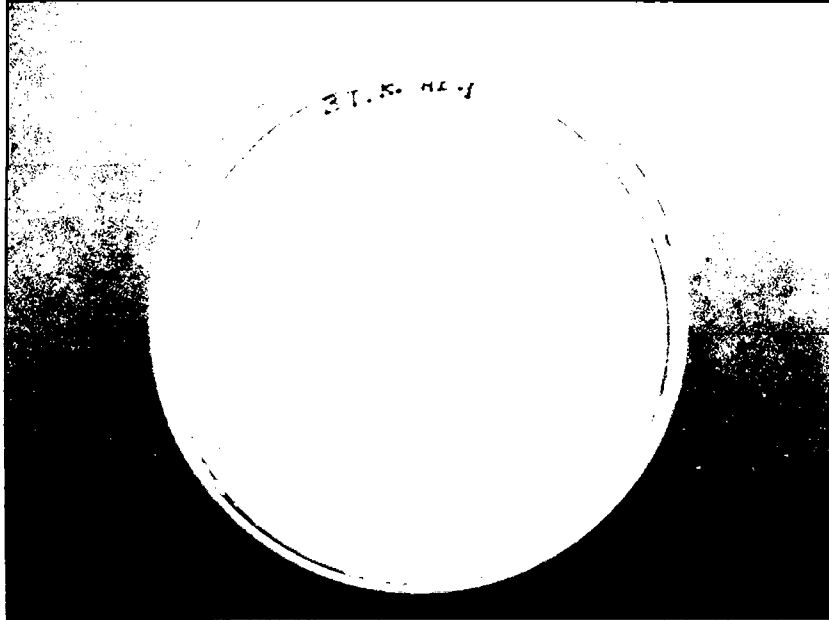
BLANCO ESPECÍFICO DE LAS PROTEÍNAS Cry DE *Bacillus thuringiensis*. (Caracterización de las proteínas Cry por método de PCR).

Proteína Cry	Blanco Específico
Cry 1	Lepidópteros
Cry 2	Dípteros y Lepidópteros
Cry 3	Coleópteros
Cry 4	Dípteros
Cry 5	Nemátodos
Cry 6	Nemátodos y Coleópteros
Cry 7	Coleópteros
Cry 8	Lepidópteros
Cry 9	Lepidópteros
Cry 10	Dípteros
Cry 11	Dípteros
Cry 12	Nemátodos
Cry 13	Nemátodos
Cry 14	Nemátodos y Dípteros
Cry 16	Dípteros
Cry 17	Dípteros
Cry 18	Coleópteros
Cry 19	Dípteros
Cry 20	Dípteros y Lepidópteros
Cry 23	Coleópteros
Cry 24	Dípteros
Cry 28	Coleópteros
Cry 33	Coleópteros

Fuente: Yadav, 2007.

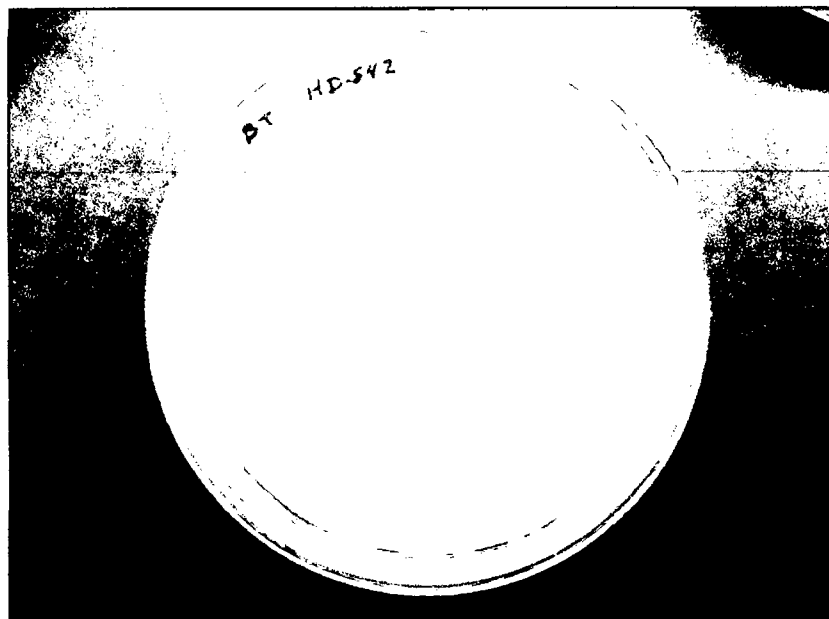
Anexo N° 05

Bacillus thuringiensis variedad *kurstaki* HD-1 en Agar Luria Bertani



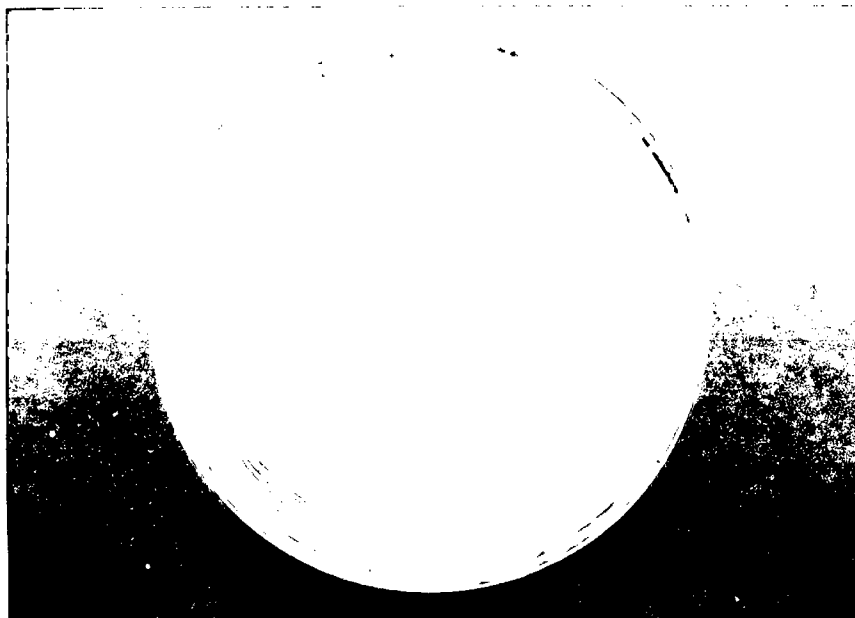
Anexo N° 06

Bacillus thuringiensis variedad *thompsoni* HD-542 en Agar Luria Bertani



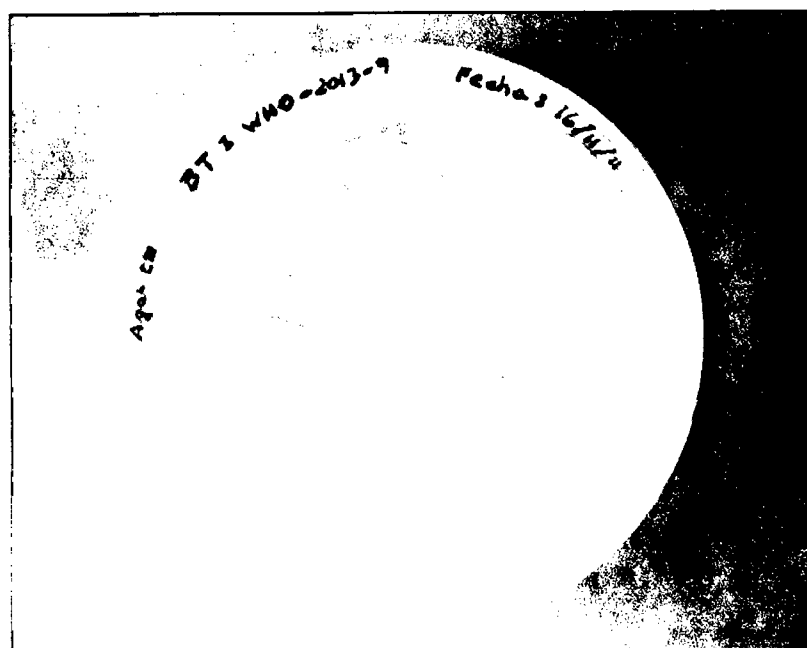
Anexo N° 07

Bacillus thuringiensis variedad *neoleonensis* T-24-001 en Agar Luria Bertani



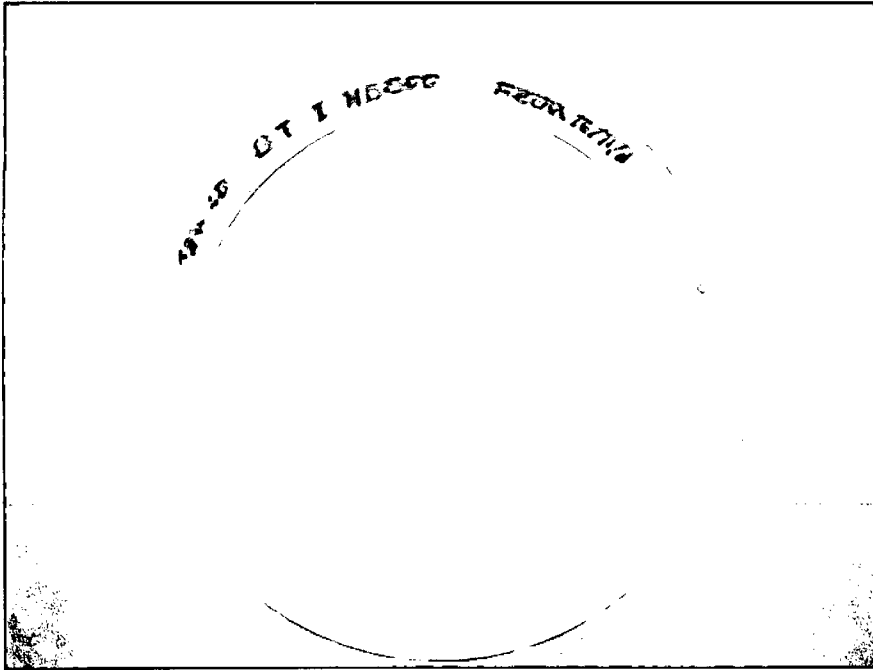
Anexo N° 08

Bacillus thuringiensis variedad *israelensis* WHO-2013-9 en Agar Luria Bertani



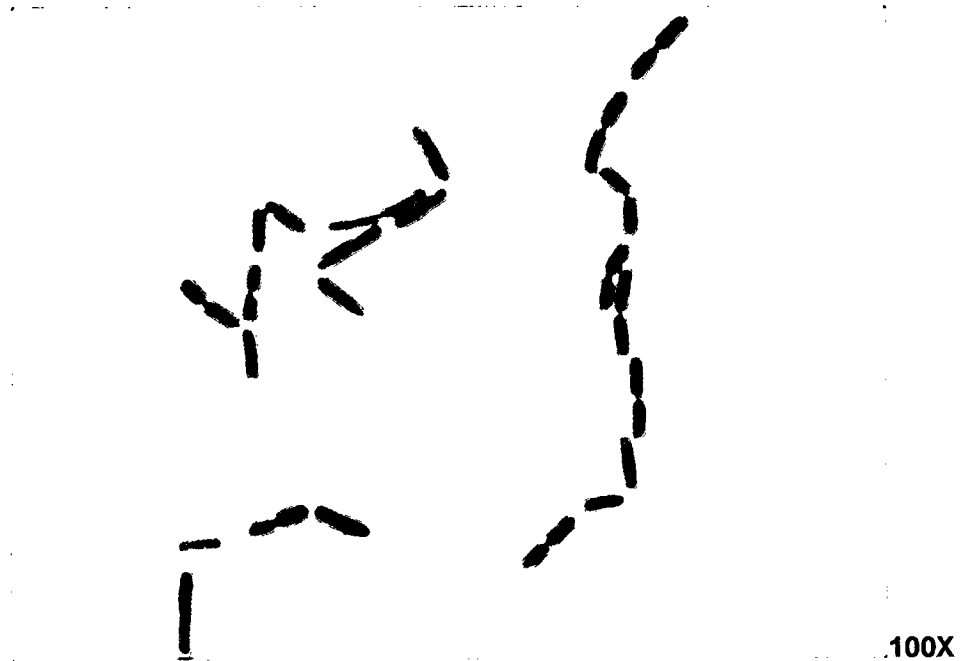
Anexo N° 09

Bacillus thuringiensis variedad *israelensis* HD-500 en Agar Luria Bertani



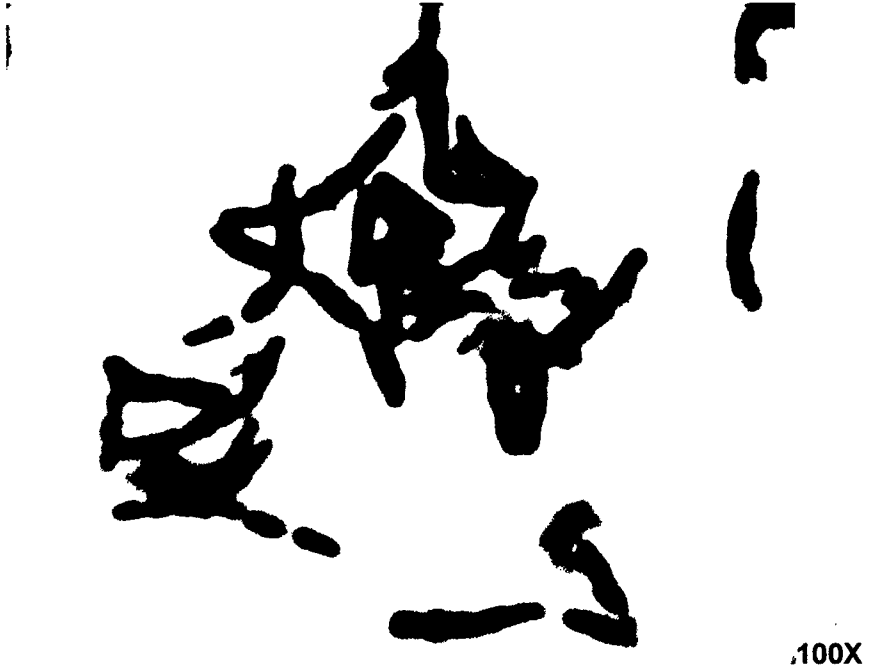
Anexo N° 10

Bacillus thuringiensis variedad *kurstaki* HD-1



Anexo N° 11

Bacillus thuringiensis variedad *thompsoni* HD-542



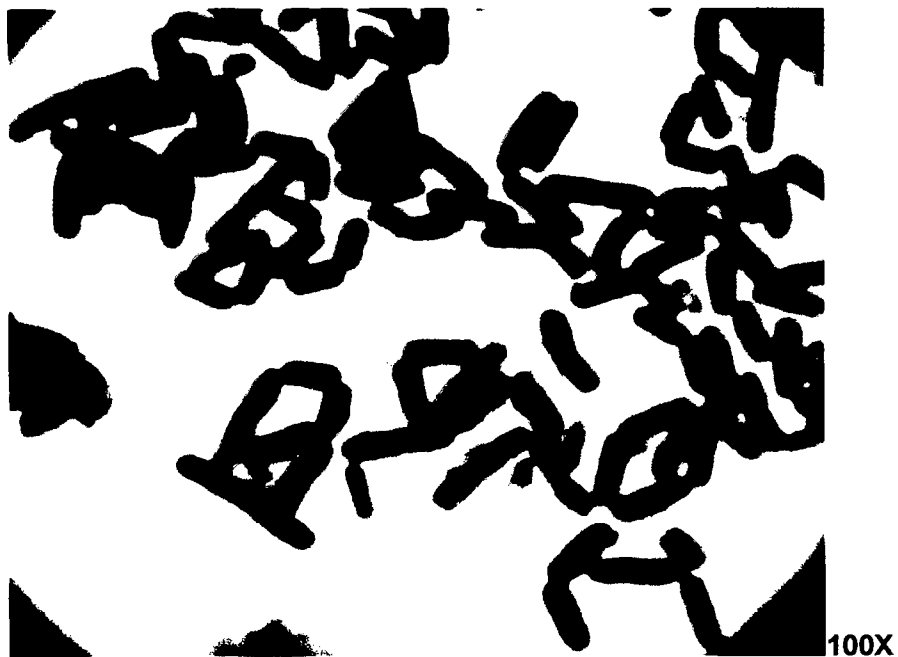
Anexo N° 12

Bacillus thuringiensis variedad *neoleonensis* T-24-001



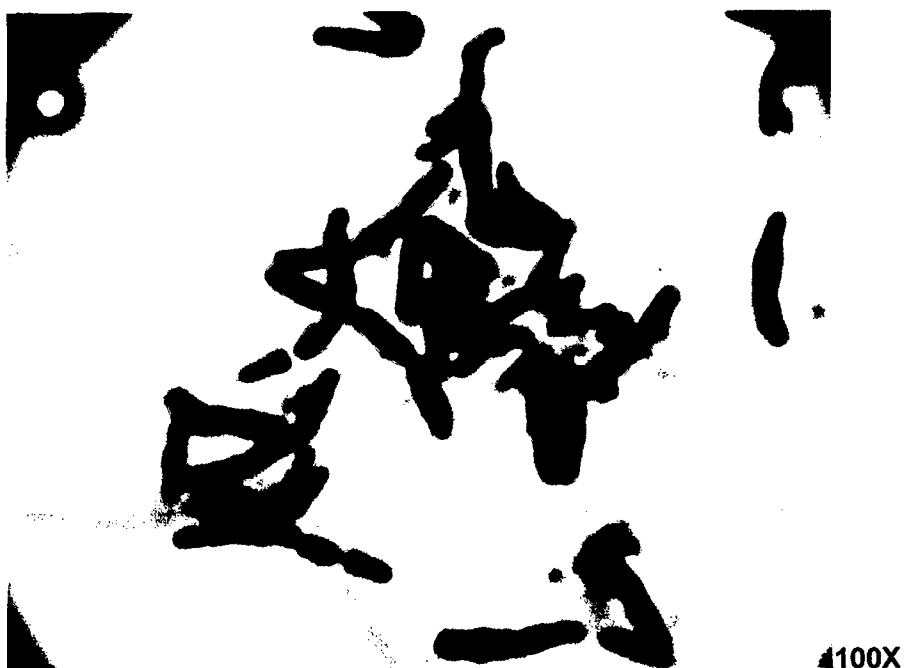
Anexo N° 13

Bacillus thuringiensis variedad *israelensis* WHO-2013-9



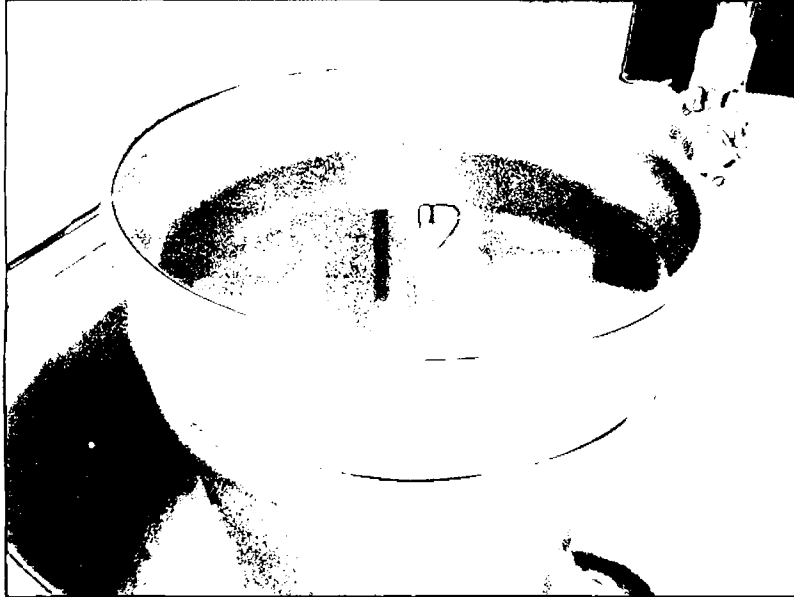
Anexo N° 14

Bacillus thuringiensis variedad *israelensis* HD-500



Anexo N° 15

AISLAMIENTO DE HUEVOS DE *Nematodirus spathiger* DE OTROS HUEVOS DE TRICHOSTRONGILOS MEDIANTE EL USO DE UN TAMIZ DE 53 μm DE ABERTURA



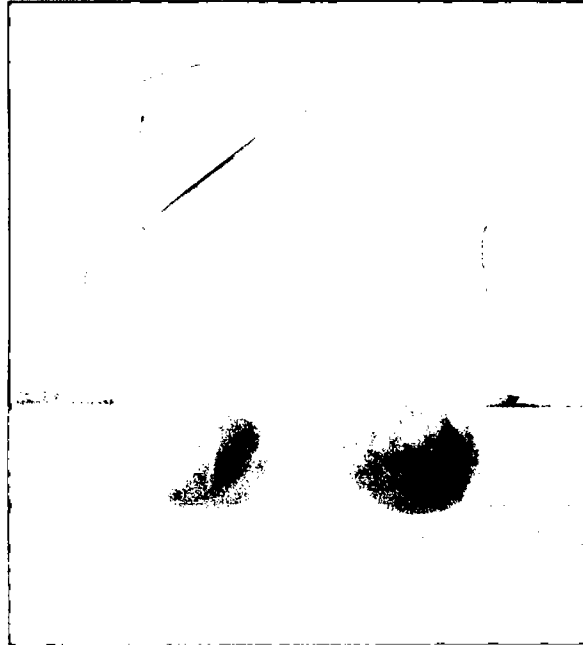
Anexo N° 16

OBTENCIÓN DE LARVAS L3 INFECTIVAS DE *Nematodirus spathiger* POR INCUBACIÓN A TEMPERATURA AMBIENTE



Anexo N° 17

COLECCIÓN DE LARVAS L3 INFECTIVAS DE *Nematodirus spathiger*
POR MIGRACIÓN LARVARIA



Anexo N° 18

HUEVOS DE *Nematodirus spathiger* CON LENTE DE 10X DE
AUMENTO



Anexo N° 19

LARVA L3 INFECTIVA DE *Nematodirus spathiger* CON LENTE DE 10X DE AUMENTO



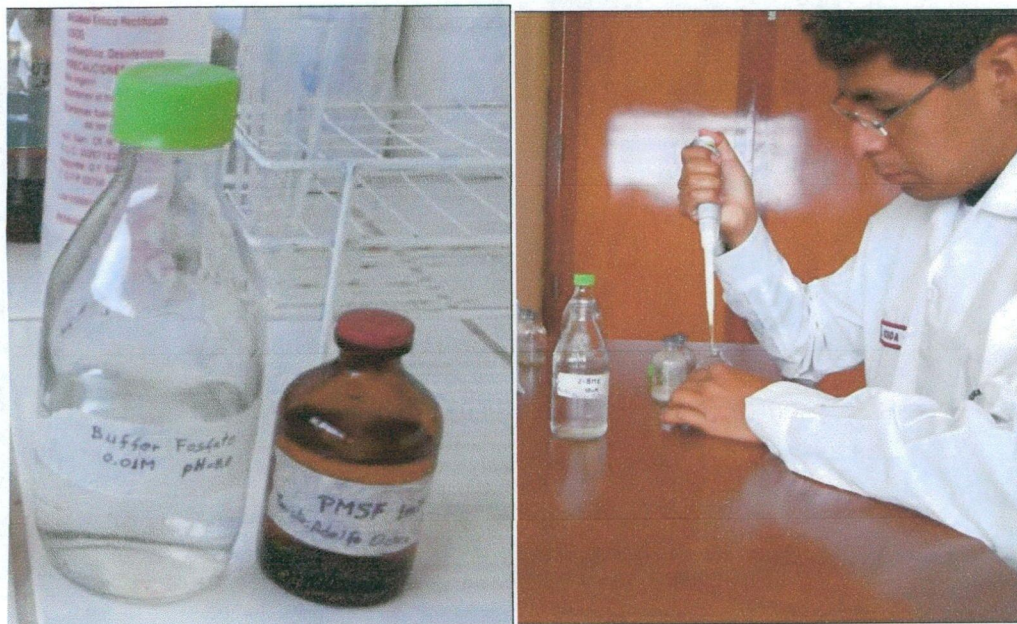
Anexo N° 20

INOCULACIÓN CON LARVAS L3 INFECTIVAS DE *Nematodirus spathiger* A UN OVINO JOVEN



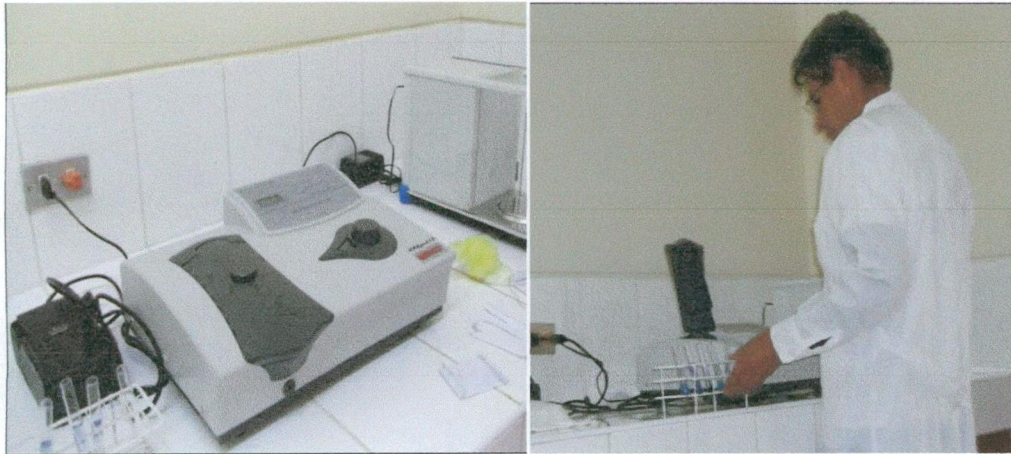
Anexo N° 21

REACTIVOS EMPLEADOS PARA LA OBTENCIÓN DEL EXTRACTO PROTÉICO TOTAL DE *Bacillus thuringiensis*



Anexo N° 22

**EVALUACIÓN DEL SOBRENADANTE CONTENIENDO LAS
PROTEINAS MEDIANTE EL MÉTODO DE BIURET PARA
DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN**



Anexo N° 23

EMPLEO DE LOS DIFERENTES TIPOS DE BALANZAS PARA LA
MEDICIÓN DE LA MASA



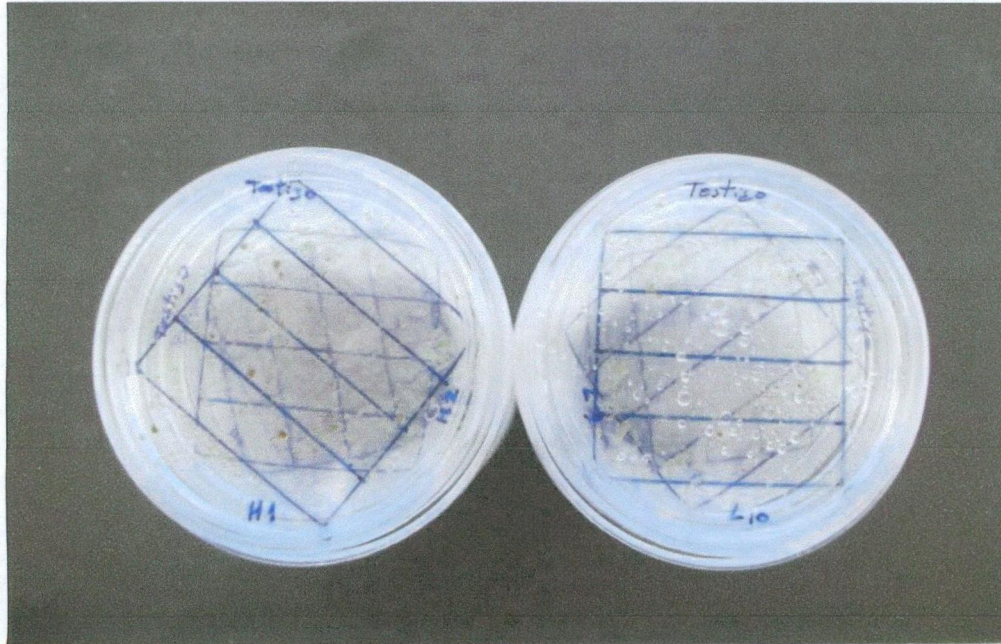
Anexo N° 24

**EMPLEO DE LAS INCUBADORAS PARA EL CRECIEMIENTO DE LAS
CEPAS DE *Bacillus thuringiensis* Y EL ENFRENTAMIENTO CONTRA
*Nematodirus spathiger***



Anexo N° 25

PLACAS DE PETRI EMPLEADAS PARA EL ENFRENTAMIENTO DEL EXTRACTO PROTÉICO TOTAL DE *Bacillus thuringiensis* FRENTE A LOS HUEVOS Y LARVAS L3 INFECTIVAS DE *Nematodirus spathiger*



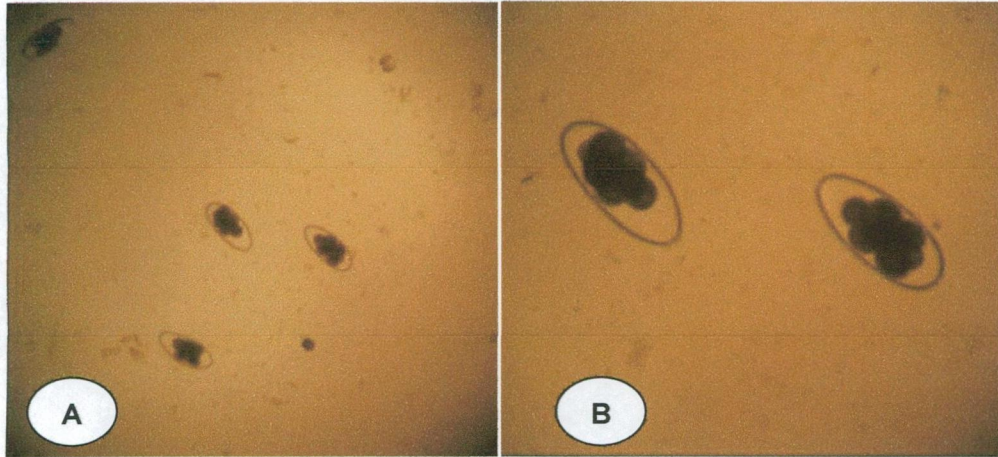
Anexo N° 26

**EVALUACIÓN DE LA MORTALIDAD DE HUEVOS Y LARVAS L3
INFECTIVAS DE *Nematodirus spathiger* EN CONDICIONES DE
LABORATORIO.**



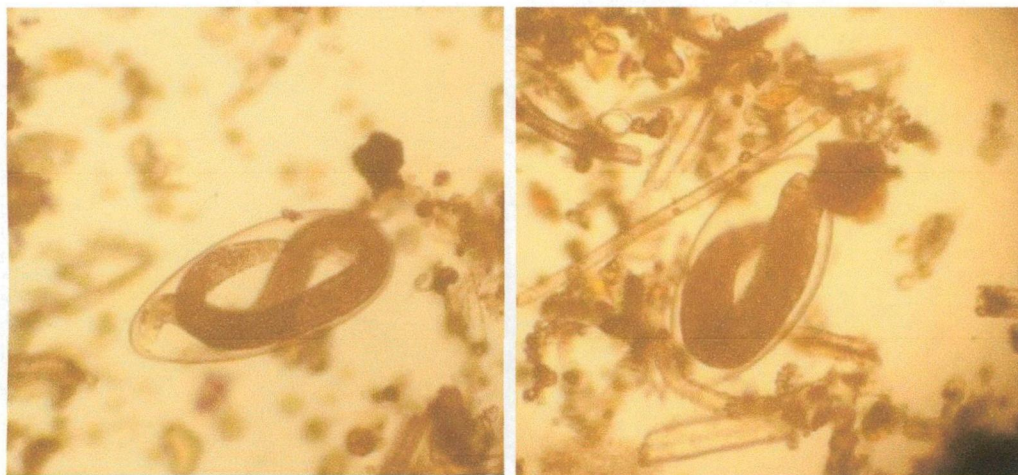
Anexo N° 27

ASPECTO DE LOS HUEVOS DE *Nematodirus spathiger* EN EL GRUPO CONTROL; (A) AUMENTO DE 5 X. (B) AUMENTO DE 10 X.



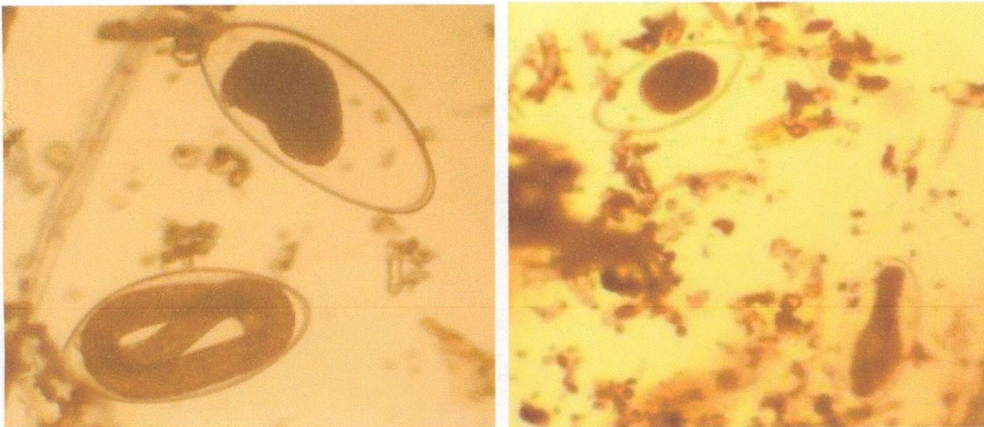
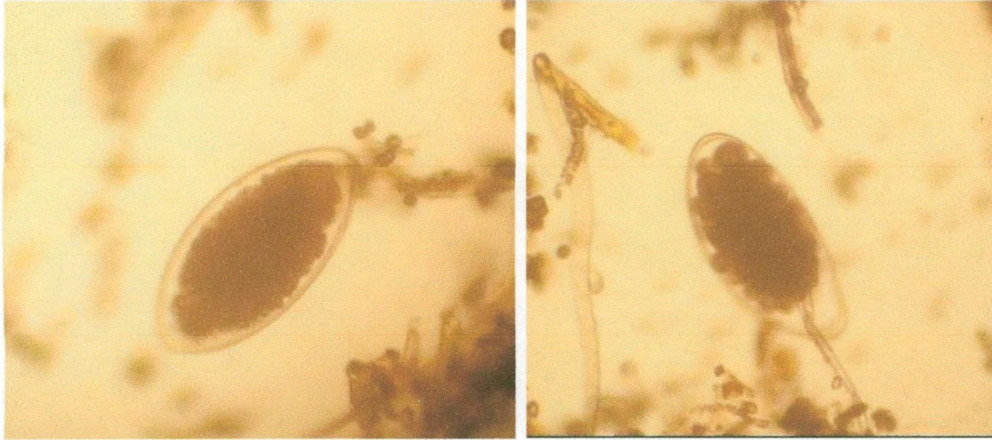
Anexo N° 28

ASPECTO DE LOS HUEVOS DE *Nematodirus spathiger* EN EL GRUPO CONTROLA LAS 72 HORAS; AUMENTO DE 40 X.



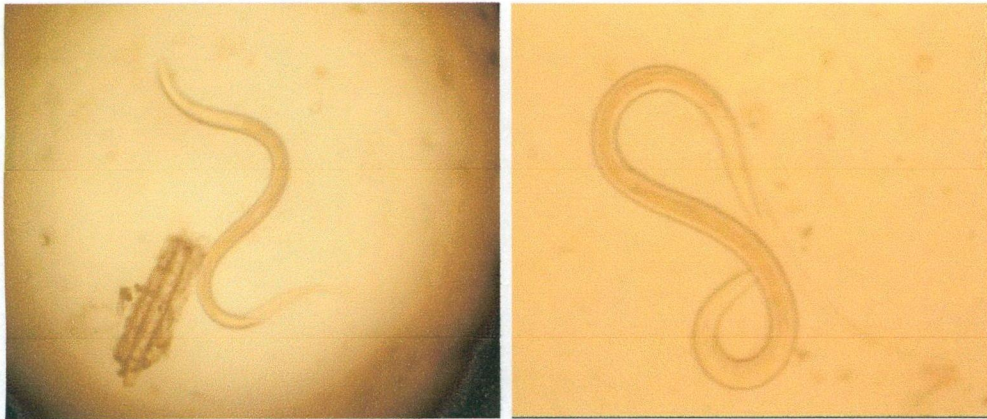
Anexo N° 29

ASPECTO DE LOS HUEVOS DE *Nematodirus spathiger* EN LOS TRATAMIENTOS FRENTE AL EXTRACTO PROTÉICO TOTAL DE *Bacillus thuringiensis* A LAS 72 HORAS; AUMENTO DE 40 X.



Anexo N° 30

ASPECTO DE LAS LARVAS L3 INFECTIVAS DE *Nematodirus*
spathiger EN EN EL GRUPO CONTROL



Anexo N° 31

ASPECTO DE LAS LARVAS L3 INFECTIVAS DE *Nematodirus*
spathiger EN LOS TRATAMIENTOS FRENTE AL EXTRACTO
PROTÉICO TOTAL DE *Bacillus thuringiensis* A LAS 72 HORAS;
AUMENTO DE 40 X.

