

# SUSCEPTIBILIDAD DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS A TIABENDAZOL

Ruiz Negrete Karla Paola (1), Barrón Bravo Oscar Guadalupe (2), Ángel Sahagún César Andrés\* (3)

1 [Programa Educativo en Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Guanajuato] | [karlaprn.18@gmail.com]

2 [Departamento de Veterinaria y Zootecnia, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato Salamanca, Universidad de Guanajuato] | [oscarbarronb@hotmail.com]

3 [Departamento de Veterinaria y Zootecnia, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato Salamanca, Universidad de Guanajuato] | [csahagun@ugto.mx]

\*Autor de correspondencia.

## Resumen

El suelo es un entorno rico en especies, entre los organismos presentes están los nematodos entomopatógenos. Estos nematodos pertenecen a las familias *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae* y provocan altos índices de mortalidad en insectos. Uno de los antiparasitarios utilizados contra nematodos tanto de animales como de plantas es el tiabendazol. El objetivo del presente estudio fue evaluar la susceptibilidad de los nematodos entomopatógenos a tiabendazol al 5%. Los resultados de susceptibilidad variaron de 0 a 85.70%. El estudio mostró que existe susceptibilidad de los NEPs al tiabendazol al 5%, diferenciándose los porcentajes de mortalidad por la cepa de nematodo utilizado.

## Abstract

Soil is a numerous environment in species, among the present organisms are the entomopathogenic nematodes. These nematodes belong to the families *Steinernematidae* and *Heterorhabditidae* and cause high mortality rates in insects. The antiparasitic drugs used against nematodes of both animals and plants is the thiabendazole. The goal of this study was to evaluate the susceptibility of entomopathogenic nematodes to 5% to thiabendazole. In the laboratory was reproduced *in vivo* nematodes and once obtained the infective juvenile, collected and determined the concentration, by dilution was adjusted to the amount required for the bioassay. 200  $\mu$ L were placed in each well with approximately 50 nematodes. It had three treatments, two were witnesses, one with water (negative) and the other with 5% DMSO (positive) and one with the 5% of TBZ total volume of fluid in the well. Counts were carried out of the living and the dead at 0, 24 and 48 hours of having initiated the experiment. The results of susceptibility varied from 0 to 85.70%. The study showed that there is susceptibility of the NEPs to thiabendazole to 5%, differing percentages of mortality due to the nematode strain used.

## Palabras Clave

Antihelmíntico; contaminación; suelo; migración larvaria; *in vitro*.

## INTRODUCCIÓN

Los profesionales del sector pecuario tienen la responsabilidad de cuidar los factores que dan vida como lo son el aire, el agua, el paisaje, la calidad del ambiente y el suelo [1]. El suelo es un entorno complejo y rico en especies que se co-relacionan competitivamente o con un fin mutuo. Entre los organismos que están presentes, están los nematodos entomopatógenos, los cuales se alimentan gracias a relaciones de antagonismo con otros organismos que también pertenecen a este entorno. La presencia de nematodos entomopatógenos (NEPs) en el suelo, hace que los microorganismos habitantes de éste se conviertan en sustrato de los NEPs, al mismo tiempo, su presencia, afecta la microbiota del suelo [2].

El suelo también es afectado por los productos químicos antiparasitarios excretados por animales. El uso de antiparasitarios en los animales y su relación con el medio ambiente es de gran importancia, ya que al salir del animal por estiércol u orina, se ve afectada la fertilidad del suelo, viabilidad y rendimiento de los organismos, por ejemplo la fauna coprófaga [3].

Uno de los antiparasitarios utilizados contra nematodos tanto de animales como de plantas es el tiabendazol, es un antihelmíntico bencimidazólico, con significativa resistencia y propiedades dermatofíticas. Éste, al alcanzar sus niveles máximos en los animales, se metaboliza en el hígado y se distribuye por todos los tejidos corporales. Su forma de excreción es por orina y heces: 90% por orina en forma de metabolitos y 5% en heces [4].

Los nematodos conforman el mayor número de parásitos de los animales y del ser humano; son gusanos existentes en gran variedad de hábitats, parasitan a plantas y animales vertebrados e invertebrados. Son gusanos de cuerpo cilíndrico y alargado, y se componen de sistema digestivo, nervioso, reproductor y excretor [5]. Los nematodos entomopatógenos son agentes de control biológico utilizados a nivel mundial. Éstos principalmente pertenecen a las familias *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae*, de la orden *Rhabditida*. Tienen una relación simbiótica con bacterias *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* [6], la simbiosis con estas bacterias les permite infectar al hospedero (insectos), liberándolas en su interior para provocar septicemia y la muerte. Estos nematodos poseen un amplio número de hospederos y provocan altos índices de mortalidad en insectos [2, 7].

El tercer estadio juvenil infectivo de los NEPs está adaptado para vivir por largos periodos de tiempo en el suelo, ya que no tienen la necesidad de alimentarse de un insecto. Adicionalmente, presentan alta resistencia a los productos químicos (antihelmínticos) y resisten a varios tipos de condiciones climáticas [1, 3]. Campos-Herrera *et al.* (2008) [8] realizaron un estudio en el que se analizaron los productos químicos que afectan a los NEPs existentes en el suelo; los residuos de pesticidas y la presencia de metales pesados contribuyen al 42% de mortalidad de los NEPs.

Existe menor consideración hacia los nematodos para el control biológico de plagas que otros entomopatógenos [9], sobre todo en el área pecuaria, pero los convierte en un monitor en el cuidado del medio ambiente y disminución del uso de productos químicos, bienestar del suelo, su fertilidad y la fauna no objetivo. Esta situación ayuda igualmente a tener menos pérdidas económicas por la importancia que tienen los insectos coprófagos enterrando y degradando las heces en el suelo contribuyendo a aumentar la fertilidad del suelo y el control nocivo de fauna coprófaga [3]. Hasta el momento en la literatura consultada no se cuenta con información publicada en la que se haya evaluado la susceptibilidad de NEP al antihelmíntico tiabendazol por lo que el objetivo del presente estudio fue evaluar la susceptibilidad de los nematodos entomopatógenos a tiabendazol al 5%.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ubicación del estudio

Laboratorio de parasitología y control biológico de la Universidad de Guanajuato (LPCB-UG).

## Realización del estudio

Para obtener la cantidad de nematodos suficientes para realizar los bioensayos, en laboratorio se cultivó el insecto trampa, *Galleria melonella*, para producir los nematodos *in vivo*, tal y como lo indica McMullen y Stock (2014) [10]. En total se utilizaron tres cepas de nematodos entomopatógenos de suelos de granjas pecuarias, M18 del municipio de León y, M13 y M40 del municipio de Irapuato, en el insecto trampa. Una vez que se observaron nematodos en el cuerpo del insecto, se trasladaron a trampas de White, las cuales sirvieron para coleccionar los nematodos infectivos juveniles, posteriormente se determinó la concentración y por dilución se ajustó a la concentración utilizada en el bioensayo.

Después de haber determinado la concentración de nematodos entomopatógenos, se colocaron 200  $\mu\text{L}$  en cada pozo con una cantidad aproximada de 50 nematodos, se verificó en cada pozo la cantidad de nematodos vivos y muertos (primer conteo). En total se tuvieron tres tratamientos por muestra de nematodo, de los cuales dos fueron testigos, uno con agua (negativo) y el otro con DMSO al 5% (positivo), y finalmente, uno con el TBZ al 5% del volumen total de líquido presente en el pozo. Posteriormente que se colocaron y mezclaron los tratamientos en el pozo, se incubaron en oscuridad a una temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 horas, después del tiempo de incubación se realizó el segundo conteo de nematodos vivos y muertos y posteriormente se pasaron a otra placa con un filtro de polipropileno de 25  $\mu\text{m}$ . A las 48 horas de iniciado el experimento se realizó el tercer conteo en la placa que contenía el filtro. Los nematodos que pasaron el filtro se consideraron vivos [11, 12].

### Análisis estadísticos

Una vez terminado el experimento, se obtuvieron los porcentajes de control y se aplicó la fórmula de Sun-Shepard's para corregir los porcentajes de mortalidad natural respecto al testigo y posteriormente se realizó una transformación angular (Arc Sen-1) para normalizar los datos. Posteriormente, se realizó el análisis de varianza con un arreglo factorial donde el factor A: Tratamiento de producto químico, factor B: Muestra de nematodo y factor C: el tiempo de evaluación, posteriormente se realizó una prueba de Tukey con el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI.I.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a las condiciones en que se realizó el presente estudio se encontró que los resultados de susceptibilidad variaron de 0 a 85.70%.

La cepa más sobresaliente a las 24 horas fue la M13 con 73.53% con el tratamiento de  $\text{H}_2\text{O} + \text{DMSO} + \text{TBZ}$  5% y a las 48 horas después de haber iniciado el bioensayo fue la M18 con el mismo tratamiento (Tabla 1). En el tratamiento con  $\text{H}_2\text{O} + \text{DMSO}$  5% se encontró mortalidades en todas las cepas de nematodos y en la cepa M13 presentó hasta un 67.99% (Tabla 1).

El análisis de varianza mostró que existen diferencias estadísticas significativas entre los factores tratamiento, tiempo de evaluación y muestra de nematodo, además de la interacción Muestra de nematodo y tiempo de evaluación.

Respecto al factor tratamiento se observaron diferencias estadísticas significativas y la prueba de Tukey formó tres grupos, el primero y más sobresaliente por los resultados de susceptibilidad fue el tratamiento formado por  $\text{H}_2\text{O} + \text{DMSO} + \text{TBZ}$  5%, el segundo se formó con el tratamiento  $\text{H}_2\text{O} + \text{DMSO}$  5% y el tercer grupo lo formó el tratamiento testigo.

Respecto al factor de muestra de nematodo se encontraron diferencias estadísticas significativas y la prueba de Tukey formó dos grupos donde la cepa M13 y la M18 fueron estadísticamente iguales y diferentes con la M40.

Respecto al factor de tiempo de evaluación se encontraron diferencias estadísticas significativas y la prueba de Tukey formó dos grupos donde el primer grupo se formó por el tiempo de evaluación a las 48 horas y el segundo grupo y menos sobresaliente el tiempo de evaluación a las 24 horas.

Respecto a la interacción entre los factores factor de tiempo de evaluación y el factor muestra de nematodo se encontraron diferencias estadísticas significativas.

**Tabla 1. Porcentaje de mortalidad de nematodos entomopatógenos a tiabendazol al 5% a las 24 y 48 horas.**

| Tratamiento/Cepa                      | M13a       |             | M18a       |             | M40b       |             |
|---------------------------------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|
|                                       | 24h b      | 48h a       | 24 h b     | 48 h a      | 24 h b     | 48 h a      |
| H <sub>2</sub> O + DMSO + TBZ 5%<br>a | 73.53±3.84 | 59.76±6.90  | 72.13±5.37 | 85.70 ±7.77 | 47.22±5.19 | 46.93±28.68 |
| H <sub>2</sub> O + DMSO 5% b          | 67.99±3.94 | 64.00±10.77 | 60.59±3.83 | 64.53±0.52  | 47.22±5.19 | 80.84±23.96 |
| Testigo c                             | 0.00±0.00  | 0.00±0.00   | 0.00±0.00  | 0.00±0.00   | 0.00±0.00  | 0.00±0.00   |

DMSO: dimetil sulfóxido; TBZ: tiabendazol; literales diferentes en la columna de tratamiento son estadísticamente diferentes; literales diferentes en la fila de muestras de nematodos son estadísticamente diferentes; literales diferentes en la fila de tiempo son estadísticamente diferentes.

Los pesticidas y metales pesados llegan a provocar hasta un 42% de mortalidad de NEPs en el suelo (Campos-Herrera *et al.*, 2008) [8], en el presente estudio se encontraron resultados superiores e inferiores, probablemente la susceptibilidad a los productos químicos depende del tipo de producto, la cepa del nematodo y el medio ambiente del que son aislados.

Tarbiat *et al.* (2017) [12] evaluaron tiabendazol como antihelmíntico en aves para *Ascaridia galli* con una concentración de 0.2%, mostrando 100% de susceptibilidad al producto químico, del mismo modo Demeler *et al.* (2009) [13] obtuvieron resultados de 100% de eficacia de los bencimidazoles contra nematodos gastrointestinales del ganado, a una concentración del 0.7%, en el presente estudio se utilizó el tiabendazol al 5% y no se lograron mortalidades cercanas al 100%, probablemente los NEPs han presentado exposición constante a dosis bajas de tiabendazol que les ha permitido desarrollar resistencia.

## CONCLUSIÓN

El estudio mostró que existe susceptibilidad de los NEPs al tiabendazol al 5%, diferenciándose los porcentajes de mortalidad por la cepa de nematodo utilizado.

## REFERENCIAS

- [1] Sáenz, A. (2005). Importancia de los nematodos entomopatógenos para el control biológico de plagas en palma de aceite. PALMAS, 26: 41-57.
- [2] Blanco-Pérez, R., Bueno-Pallero, F. A., Neto, L. y Campos-Herrera, R. (2017). Reproductive efficiency of entomopathogenic nematodes as scavengers. Are they able to fight for insect's cadavers? Journal of Invertebrate Pathology 148: 1-9.
- [3] Baena-Díaz, F., Martínez-M, I., Gil-Pérez, Y. y González-Tokman, D. (2018). Trans-generational effects of ivermectin exposure in dung beetles. Chemosphere 202: 637-643.
- [4] Plumb, D. C. (2010). Manual de farmacología veterinaria (6ta ed). Buenos Aires: Inter-médica. Pp. 1239.
- [5] Quiroz, H. (1990) Parasitología (4ta ed). México: Editorial Limusa. Pp. 876.
- [6] Kaya, H. K., Aguilera, M. M., Alumai, A., Choo, H. Y., De la Torre, M., Fodor, A., Ganguly, S., Hazir, S., Lakatos, T., Pye, A., Wilson, M., Yamanaka, S., Yang, H. y Ehlers, R. U. (2006). Status of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from select countries or regions of the world. Biological control 38: 134-155.
- [7] Rodríguez, M. G., Hernández-Ochandía, D. y Gómez, L. (2012). Nematodos entomopatógenos: elementos del desarrollo histórico y retos para su consolidación como biorreguladores en la agricultura en Cuba. Rev. Protección Veg., 27: 137-146.

- [8] Campos-Herrera, R., Gómez-Ros, J. M., Escuer, M., Cuadra, L., Barrios, L. y Gutiérrez, C. (2008). Diversity, occurrence and life characteristics of natural entomopathogenic nematode populations from La Rioja (Northern Spain) under different agricultural management and their relationships with soil factors. *Soil biology and biochemistry* 40: 1474-1484.
- [9] Perkins, S. E. y Fenton, A. (2009). Helminths as vectors of pathogens in vertebrate hosts: A theoretical approach. *International Journal for Parasitology* 36: 887-894.
- [10] McMullen, J. G. y Stock, S. P. (2014). *In vivo* and *In vitro* rearing of entomopathogenic nematodes (*Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*). *Journal of Visualized Experiments* 91: 1-7.
- [11] Demeler, J., Kuttler, U., El-Abdellati, A., Stafford, K., Rydzik, A., Varady, M., Kenyon, F., Coles, G., Hoglund, J., Jackson, F., Vercruysse, J. y von Samson-Himmelstjerna, G. (2010). Standardization of the larval migration inhibition test for the detection of resistance to ivermectin in gastro intestinal nematodes of ruminants. *Veterinary Parasitology* 174: 58-64.
- [12] Tarbiat, B., Jansson, D. S., Tydén, E. y Hoglund, J. (2017). Evaluation of benzimidazole resistance status in *Ascaridia galli*. *Parasitology* 144: 1338-1345.
- [13] Demeler, J., Van Zeveren, A.M.J., Kleinschmidt, N., Vercruysse, J., Hoglund, J., Koopmann, R., Cabaret, J., Claerebout, E., Areskog, M. y von Samson-Himmelstjerna, G. (2009). Monitoring of efficacy of ivermectin and albendazole against gastro intestinal nematodes of cattle in Northern Europe. *Veterinary Parasitology* 160: 109-115.