

# Hongos nematófagos de huevos de *Toxocara canis* en un paseo público de La Plata, Argentina

Cecilia Gortari<sup>1,2</sup>, Cecilia Cazau<sup>3</sup> y Roque Hours<sup>2</sup>

<sup>1</sup>CIC-PBA. <sup>2</sup>CINDEFI (CONICET-UNLP). Facultad de Ciencias Exactas. <sup>3</sup>Instituto de Botánica "Carlos Spegazzini". Facultad de Ciencias Naturales y Museo. UNLP. La Plata, Argentina

## Resumen

Los hongos tienen gran potencial en el control biológico de nematodos. Sin embargo, no han sido estudiados en el control de parásitos de animales y/o del hombre que se transmiten a través del suelo contaminado con huevos. La contaminación ambiental con huevos de *Toxocara* spp. origina un problema para la salud pública. La ingestión accidental de huevos de *Toxocara canis*, un nematodo del perro, produce una zoonosis (toxocarosis). Los objetivos de este trabajo fueron los siguientes: 1) Comprobar la existencia de hongos antagonistas sobre huevos de *T. canis* en el suelo de un paseo público de La Plata infectado con huevos de este parásito, y 2) determinar la posible asociación entre factores bióticos y abióticos del suelo con la presencia de hongos ovoparásitos.

En cada muestra de suelo se determinó el tipo de textura, el porcentaje de materia orgánica, valor de pH, la presencia de hongos ovoparásitos, y la presencia de larvas y huevos de nematodos, en particular de *Toxocara* spp. El área estudiada presentó las siguientes características: pH: 6,6-8,0; materia orgánica: 1,2-70% y un predominio de textura franca. Se identificaron los siguientes géneros de hongos antagonistas: *Acremonium*, *Aspergillus*, *Chrysosporium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mortierella*, *Paecilomyces* y *Penicillium*. Se detectó una prevalencia del 70% para huevos de nematodos, 33% para huevos de *Toxocara* spp. y 90% para larvas. No se encontraron asociaciones entre la presencia de hongos ovicidas y los factores considerados. Son necesarios más estudios con el fin de conocer el fenómeno de antagonismo natural sobre huevos de *T. canis* para su control biológico *in situ*.

## Palabras clave

Hongos nematófagos, *Toxocara canis*, Antagonismo

## Nematophagous fungi of *Toxocara canis* eggs in a public place of La Plata, Argentina

## Summary

Fungi have showed a great potential for the biological control of nematodes. However, they have not been evaluated for the control of animal and/or human parasites transmitted by egg contaminated soils. Environmental contamination with *Toxocara* spp. eggs is a public health problem. Accidental swallowing of *Toxocara canis* eggs (a nematode of dogs) usually results on a zoonotic infection (toxocarosis). The objectives of this research were: 1) To test the presence of antagonistic fungi against *T. canis* in the soil in public places of "La Plata city, Argentina", infected with eggs of this parasite, 2) To determine the possible association between biotic and abiotic factors of the soil with the presence of fungal parasites of egg nematodes.

Soil samples were tested for: textural type, organic matter (%), pH, presence of egg-parasite fungi, of larvae and of nematode eggs, in particular of *Toxocara* spp.

The studied area showed the following characteristics: pH: 6.6-8.0, organic matter: 1.2-70%, with a predominantly loam texture. The following antagonistic fungal genera were identified: *Acremonium*, *Aspergillus*, *Chrysosporium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mortierella*, *Paecilomyces* and *Penicillium*. A prevalence of 70% was detected for nematode eggs, of 33% for *Toxocara* spp. eggs and of 90% for larvae. No association between the presence of egg-parasite fungi and the considered factors was found.

More studies are necessary to know the natural antagonism factors to *T. canis* eggs for its *in situ* biological control.

## Key words

Nematophagous fungi, *Toxocara canis*, Antagonism

## Dirección para correspondencia:

Dr. Roque A. Hours  
CINDEFI, Facultad de Ciencias Exactas (UNLP)  
47 y 115, (1900) La Plata, Argentina  
Tel./Fax: +54 221 483-3794  
E-mail: hours@biotec.org.ar

Aceptado para publicación el 31 de marzo de 2006

©2007 Revista Iberoamericana de Micología  
Apdo. 699, E-48080 Bilbao (Spain)  
1130-1406/01/10.00 €

Los nematodos parásitos de plantas y animales producen enfermedades responsables de grandes pérdidas económicas. Desde hace muchos años, el control de estas parasitosis se realiza con nematocidas químicos. Actualmente existe una marcada tendencia al desarrollo de una actividad agropecuaria sostenible que preserve los recursos y el medio ambiente buscando nuevas alternativas al uso de productos químicos. Esto tiene un origen multifactorial, pero entre las razones de mayor importancia cabe mencionar a las políticas dirigidas a una disminución de los residuos tóxicos en los alimentos, el auge de los sistemas de producción orgánica, una mayor conciencia social ante el deterioro del medio ambiente y la aparición de resistencia a los antihelmínticos. En este contexto, aparece el control integral de las enfermedades parasitarias, que promueve el uso racional de un conjunto de medidas biológicas, biotecnológicas, químicas, prácticas culturales y sistemas de producción propios de la actividad agrícola y ganadera con la finalidad de disminuir el uso de agentes químicos de control manteniendo los niveles de productividad [1,16,18,36].

Entre estas medidas, el estudio, comprensión y la disminución de la población de nematodos con antagonistas naturales aparece como una alternativa para el control de las parasitosis [1,18]. En el suelo existe una gran diversidad de organismos (virus, bacterias, hongos, nematodos, artrópodos y otros invertebrados) que son enemigos naturales de los nematodos parásitos de plantas y animales. Sin embargo, muy pocos organismos antagonísticos presentan cualidades para actuar como agentes de control. Los hongos tienen un gran potencial para el control biológico, no sólo de nematodos sino también de insectos y de otros hongos debido a una alta capacidad reproductiva (ciclo de vida corto), especificidad (en el caso de endoparásitos), producción de esporas de resistencia o desarrollo de fases saprofitas ante la ausencia de sus hospedadores, actividad antagonista sólo sobre el organismo diana y posibilidad de ser modificados y producidos a gran escala [7,19].

Los hongos nematófagos están representados por los depredadores y los endoparásitos de estadios vermiformes, y los oportunistas que atacan especialmente huevos y quistes [7,27,29]. Este último grupo tiene la capacidad de colonizar hembras, quistes y huevos, por lo que constituyen el grupo con mayor potencial en el control de fitonematodos [20]. Fueron encontrados en suelos agrícolas asociados al fenómeno de supresión de dichos nematodos, por lo que su estudio está directamente relacionado con el control biológico [28,29,30]. La mayoría de los estudios sobre actividad ovicida de hongos nematófagos se ha realizado sobre fitonematodos e incluso algunas cepas han sido usadas como agentes de control biológico de estos parásitos. Estas investigaciones no evolucionaron de igual forma en relación con nematodos parásitos de animales y/o del hombre que se transmiten por contacto con suelos contaminados con huevos (geohelmintiasis).

La toxocarosis es una zoonosis parasitaria producida fundamentalmente por la ingestión accidental de huevos de *Toxocara canis*, un nematodo que infecta frecuentemente al perro. Estos huevos se tornan infectantes después de una incubación de dos a cinco semanas en el ambiente. Sin embargo, la gran resistencia estructural de su cubierta los mantiene viables durante periodos prolongados en el ambiente. La alta prevalencia de esta parasitosis en perros y gatos, más la contaminación ambiental con huevos de *Toxocara* spp., facilitan la exposición del hombre a la toxocarosis, originando un problema para la salud pública de distribución mundial. En los ambientes contaminados con huevos de *T. canis*, la presencia del parásito no es uniforme ni constante, dependiendo de múltiples factores tales como tenencia de mascotas (incumplimiento de pla-

nes sanitarios, hábito de llevar los animales a defecar a la vía pública), falta de control sobre la presencia de animales vagabundos, nivel de educación sanitaria, etc. [2,6,12]. Esto determina marcadas diferencias epidemiológicas con los ecosistemas agrícolas donde ha sido estudiado el fenómeno de supresión debido a hongos oviparásitos.

Los geohelmintos son parásitos cosmopolitas relativamente endémicos cuya permanencia en el ambiente depende de múltiples factores que permitan el desarrollo del ciclo evolutivo del parásito. Un suelo con huevos infectantes es la fuente principal de infecciones provocadas por geohelmintos tanto en el hombre como en los animales. Uno de los factores que condiciona el desarrollo y permanencia de los huevos en el suelo es su destrucción por organismos antagonísticos, como los hongos ovicidas [22,27].

Los estudios sobre los procesos naturales de destrucción de huevos de geohelmintos están en sus etapas iniciales, pero representan una alternativa interesante que, usada en combinación con otras medidas profilácticas, puede contribuir al control de especies de importancia epidemiológica. Así, resulta indispensable avanzar en la comprensión de todos los aspectos que determinan el fenómeno natural de antagonismo sobre huevos de *T. canis*, como un primer paso en la utilización potencial de hongos como agentes de control de esta zoonosis.

Los objetivos de este trabajo fueron: 1) Comprobar la existencia de hongos antagonísticos sobre huevos de *T. canis* potencialmente patógenos para el hombre, en el suelo del Paseo del Bosque de La Plata, un espacio público naturalmente infectado con huevos de *Toxocara* spp. 2) Estudiar la posible asociación entre factores bióticos (presencia de huevos y larvas de nematodos) y abióticos (pH, porcentaje de materia orgánica, textura) del suelo con la presencia de hongos antagonísticos sobre huevos de *Toxocara* spp.

## Material y métodos

**Características del área de estudio.** El Paseo del Bosque de La Plata ocupa un área de 70 ha de espacio verde, circundado por las calles 50 a 60 y 1 a 122. Es el pulmón verde más grande de la ciudad, con 8700 ejemplares de plantas pertenecientes a 123 especies entre las que destacan los robles y los eucaliptos. Es el paseo tradicional de la ciudad y constituye un espacio en el que se desarrollan actividades recreativas, culturales y deportivas. También es un lugar frecuentado por mascotas y animales callejeros.

**Obtención de muestras de suelo.** Se tomaron 30 muestras de suelo del sector sur. El muestreo se realizó entre los meses de noviembre y diciembre, con una temperatura promedio cada mes de 17,8 °C y 21,1 °C, y un porcentaje de humedad relativa de 81,3% y 75,6%, respectivamente. Las muestras, de 1 kg cada una, se tomaron hasta una profundidad de 10 cm, apartando la capa superior del suelo, se mezclaron convenientemente y se conservaron en bolsas plásticas, a temperatura ambiente, por un período máximo de 21 días hasta su procesamiento.

**Factores abióticos.** Aproximadamente la mitad de cada muestra fue utilizada para los análisis físico-químicos de textura (porcentaje de arena, limo y arcilla), pH y porcentaje de materia orgánica, conforme a las técnicas habituales para este tipo de determinaciones [14,21].

**Factores bióticos.** Los hongos fueron aislados mediante la técnica selectiva de espolvoreado (*sprinkling*) [4,9], adaptada para el aislamiento de hongos con actividad ovicida. Se utilizaron placas de Petri conteniendo agar agua al 2%, con estreptomycin (100 ppm) y clortetraciclina

(50 ppm). Los huevos fueron obtenidos de hembras adultas de *T. canis* por desparasitación de cachorros naturalmente infectados [3]. La superficie del medio de cultivo fue inoculada con 1 ml de una suspensión de huevos de *T. canis* ( $\cong 1 \times 10^3/\text{ml}$ ) e inmediatamente espolvoreada con una fracción de tierra de 0,5 g. Las placas fueron mantenidas a 25 °C, en oscuridad, envueltas en bolsas plásticas durante tres semanas. La presencia de los hongos nematófagos fue determinada por observación microscópica. En aquellas zonas donde se detectó la interacción hongo-huevo, el agar agua fue marcado, cortado y retirado bajo condiciones asépticas para realizar el aislamiento fúngico mediante técnicas microbiológicas tradicionales. Las colonias fueron subcultivadas en agar papa glucosado y los aislamientos fueron conservados en suspensión de agua destilada estéril a temperatura ambiente, a -20 °C y a -70 °C [24,31]. La identificación taxonómica de los aislamientos se realizó sobre la base de las características macroscópicas y microscópicas utilizando diferentes medios de cultivo de acuerdo a las referencias bibliográficas correspondientes a cada género.

El análisis parasitológico se realizó mediante una técnica modificada de flotación-centrifugación [13,25]: las muestras de suelo se lavaron con dos partes de agua destilada. La mezcla fue centrifugada (10 min, 1000 × g). Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se mezcló con solución saturada de sacarosa. Se centrifugó (5 min, 1000 × g) y el sobrenadante se pasó por un filtro MicronKlear Osmomics de 8 µm. El filtro fue observado al microscopio. Se registró el número de huevos y larvas de nematodos por 100 g de suelo, destacando la presencia de huevos de *Toxocara* spp.

**Análisis estadístico.** La distribución del número de unidades formadoras de colonias (UFC) de hongos ovicidas con relación a clase textural, a la presencia de huevos de nematodos y de huevos de *Toxocara* spp. Se analizó mediante ANOVA y test-T, respectivamente. La asociación entre UFC de hongos ovicidas y pH, porcentaje de materia orgánica, de arcilla, de arena, de limo y número de larvas se analizó mediante el coeficiente de correlación correspondiente según la variable [5].

## Resultados

La caracterización física, química y biológica del área estudiada se muestra en la tabla 1. Se identificaron los siguientes tipos de textura de suelo: franco (17/30), franco limoso (3/30), franco arenoso (7/30) y franco arcilloso (3/30). La identificación taxonómica de los hongos con actividad ovicida se detalla en la tabla 2. El análisis de

**Tabla 1.** Factores físicos, químicos y biológicos del suelo del Paseo del Bosque de la Ciudad de La Plata.

Factor	Rango	Valor central y dispersión
pH	6,6-8,0	7,35 ± 0,46
Arena (%)	22-77	40,77 ± 13,25
Limo (%)	4-54	38,70 ± 10,15
Arcilla (%)	9-29	20,53 ± 5,22
Materia orgánica (%)	1,2-70	6,05 (3,7 - 9,6)*
UFC** / muestra	1-8	3,5 ± 1,76
Huevos totales / 100 g de suelo	0-900	10 (0 - 25)*
Huevos de <i>Toxocara</i> spp. / 100 g de suelo	0-50	0 (0 - 10)*
Larvas / 100 g de suelo	0-2710	265 (115 - 650)*

\* Me (Q<sub>1</sub> - Q<sub>3</sub>)

\*\* De hongos oviparásitos.

**Tabla 2.** Géneros y especies de hongos con actividad ovicida sobre *Toxocara canis* aislados del suelo del Paseo del Bosque de la Ciudad de La Plata.

<i>Acremonium</i> aff. <i>strictum</i> W. Gams
<i>Aspergillus parvulus</i> Smith
<i>Aspergillus terreus</i> Thom
<i>Aspergillus viride-nutans</i> Ducker & Thrower
<i>Chrysosporium</i> aff. <i>merdarium</i> (Link e Grev) Carn
<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht.
<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.
<i>Fusarium</i> spp.
<i>Humicola fuscoatra</i> Traaen
<i>Mortierella</i> spp.
<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer
<i>Paecilomyces lilacinus</i> (Thom) Samson
<i>Penicillium</i> spp.
Micelio hialino estéril

correlación del número de colonias fúngicas como variable dependiente con las variables mencionadas no presentó valores significativos en ningún caso ( $p > 0,05$ ). La prevalencia (muestras positivas/total de muestras) para los elementos parasitarios considerados fue del 33,3% (10/30) para huevos de *Toxocara* spp., 70% (21/30) para huevos totales y 90% (27/30) para larvas de nematodos. La distribución de las UFC de hongos oviparásitos en función de la presencia de huevos totales, huevos de *Toxocara* spp. y de la textura del suelo se indica en las figuras 1, 2 y 3, respectivamente. En ningún caso se detectaron diferencias significativas en la distribución ( $p > 0,05$ ).

## Discusión

En el presente estudio se demostró la presencia de hongos con actividad antagonista sobre huevos de *Toxocara* spp. en el suelo del Paseo del Bosque de La Plata. No se han encontrado estudios previos de aislamientos selectivos de hongos con huevos de *Toxocara* spp. Algunos de los géneros fúngicos identificados (*Acremonium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mortierella*, *Paecilomyces* y *Penicillium*) han sido citados por otros investigadores como antagonistas de huevos de fitonematodos en distintos suelos agrícolas [30,35]. Dichos géneros también han sido mencionados en estudios sobre geohelmintos realizados en distintos tipos de ambientes utilizando huevos de *Ascaris lumbricoides* [22,23]. *Paecilomyces lilacinus*, mencionado en los estudios citados y aislado en el presente, mostró actividad ovicida independientemente del ecosistema y de la clase de nematodo considerada. Este hongo es uno de los más estudiados por su actividad antagonista sobre huevos de nematodos [3,30,35].

Los hongos nematófagos están ampliamente distribuidos, pudiéndose aislar una gran diversidad de especies de diferentes ecosistemas. Sólo algunos parecen estar restringidos geográficamente; sin embargo, los factores que determinan esta restricción no han sido estudiados en profundidad [8,11]. Se ha analizado la influencia de factores ambientales en su distribución con el objetivo de establecer si los hongos nematófagos son ubicuos o si están limitados a un hábitat particular. Estos estudios se refieren mayoritariamente a hongos depredadores y endoparásitos. Gray [10] encontró que la presencia de hongos endoparásitos es influenciada por el porcentaje de humedad y de materia orgánica, en tanto que la de depredadores está asociada al pH y al porcentaje de humedad, existiendo variaciones individuales entre las diferentes especies encontradas. Existe una gran variabilidad en los resultados descritos.

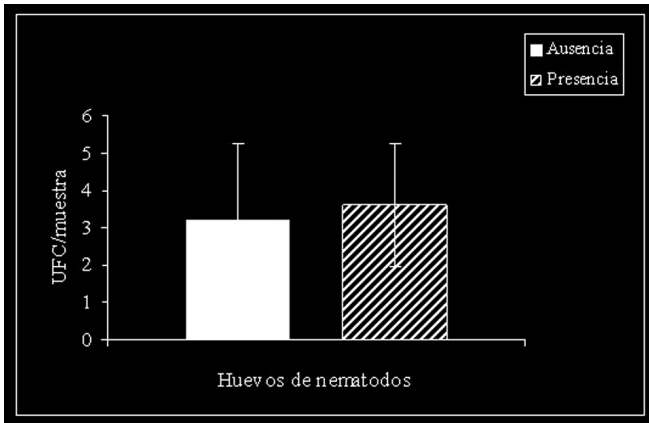


Figura 1. Distribución de UFC de hongos oviparásitos según presencia/ausencia de huevos de nematodos en el Paseo del Bosque de la ciudad de La Plata.

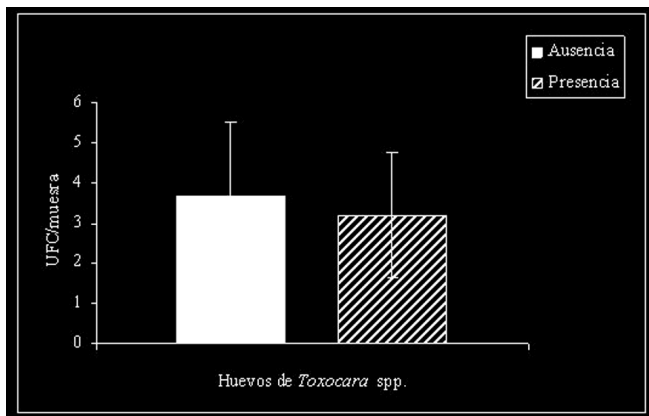


Figura 2. Distribución de UFC de hongos oviparásitos según presencia/ausencia de huevos de *Toxocara* spp. en el Paseo del Bosque de la ciudad de La Plata.

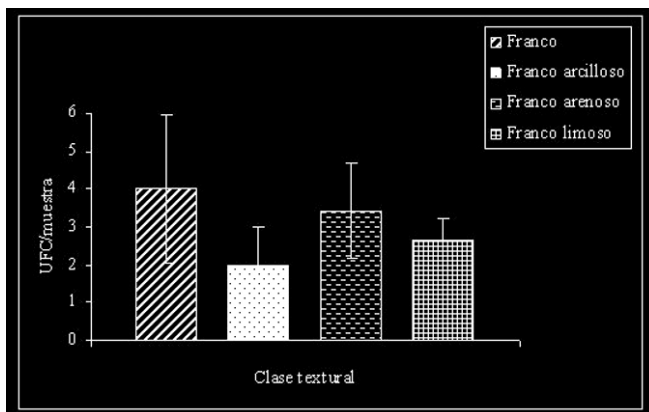


Figura 3. Distribución de UFC de hongos oviparásitos según la clase textural del suelo del Paseo del Bosque de la ciudad de La Plata.

Algunos estudios han demostrado asociaciones entre la presencia de hongos y ciertos factores abióticos en ecosistemas particulares. Pero estas asociaciones no pueden generalizarse, por lo que se relativiza la importancia de los factores del suelo como determinantes de la presencia de hongos nematófagos [1,11,15,32,34]. En nuestro estudio no se encontraron asociaciones entre hongos con efecto antagonístico sobre huevos de *Toxocara* spp. y los factores edáficos analizados.

El número de nematodos en el suelo puede variar ampliamente según el ecosistema, dependiendo de factores físicos (tipo de suelo, humedad y temperatura) y de factores biológicos como organismos antagonistas densidad-independientes (hongos parásitos de huevos y hongos trampa) y densidad-dependientes (hongos endoparásitos y otros parásitos obligados) [13,33]. La dependencia del huésped ha sido observada en hongos nematófagos, fundamentalmente para hongos-trampa y endoparásitos [10,32]. Recientemente se ha encontrado algún grado de dependencia para hongos asociados a hembras, quistes y huevos de nematodos, generalmente considerados oportunistas, indicando su adaptación a los microambientes representados por estas estructuras [4].

Los nematodos parásitos de animales son los menos comunes en el suelo. Su presencia es muy variable dependiendo de múltiples factores, fundamentalmente el nivel de educación sanitaria y las conductas de la población [2,6]. Los valores de prevalencia y densidad obtenidos en nuestro trabajo son similares a los descritos sobre contaminación de suelo por geohelminthos [2,6,12,26]. Con estos valores no encontramos dependencia de la población fúngica con ninguna de las formas parasitarias consideradas (larvas, huevos totales y huevos de *Toxocara* spp.). Estos resultados podrían deberse a lo siguiente: 1) Nuestro estudio fue realizado en un hábitat completamente diferente a un agroecosistema, y 2) el grupo de hongos analizado presenta actividad sobre huevos de geohelminthos cuya distribución en el suelo es extremadamente variable en extensión e intensidad [23].

En la mayoría de los suelos estudiados (agrícolas) la supresión de los nematodos es debido a la presencia de hongos parásitos de huevos y hembras [30]. La comprensión de cuál/es factor/es tiene/n más influencia sobre el control natural de nematodos puede proporcionar información clave para el control biológico *in situ*, pero son necesarios más estudios de campo para confirmar e identificar estas asociaciones, conocer la dinámica poblacional de los hongos y su efecto sobre la población de nematodos. La existencia de hongos oviparásitos autóctonos es importante en el campo del control biológico, ya que para la elección de un posible agente de control debería tomarse como base la adaptabilidad al ambiente en el que va ser incorporado más que la facilidad de su aislamiento y mantenimiento en condiciones de laboratorio [7,8,30,35]. En este sentido, las cepas fúngicas aisladas en el presente estudio podrían ser potenciales agentes para el control biológico de *T. canis*.

## Bibliografía

1. Akhtar M, Malik A. Roles of organic soil amendments and soil organisms in the biological control of plant-parasitic nematodes: a review. *Biores Tech* 2000; 74: 35-47.
2. Alonso JM, Stein M, Chamorro MC, Bojanich MV. Contamination of soils with eggs of *Toxocara* in a subtropical city in Argentina. *J Helminthol* 2001; 75: 165-168.
3. Araujo JV, Santos MA, Ferraz S. Efeito ovicida de fungos nematófagos sobre ovos embrionados de *Toxocara canis*. *Arq Bras Med Vet Zootec* 1994; 7: 37-42.
4. Chen F, Chen S. Mycoflora in cyst, females, and eggs of the soybean cyst nematode in Minnesota. *Appl Soil Ecol* 2002; 19: 35-50.
5. Daniel WW. Bioestadística. Base para el análisis de las Ciencias de la Salud. México, Limusa, Grupo Noriega Editores, 2002.
6. Fonrouge R, Guardis MV, Radman NE, Archelli SM. Contaminación de suelos con huevos de *Toxocara* sp. en plazas y parques públicos de la ciudad de La Plata. Buenos Aires, Argentina. *Bol Chil Parasitol* 2000; 55: 83-85.
7. Grfnvold J, Henriksen SA, Larsen M, Nansen P, Wolstrup J. Biological control. Aspects of biological control with special reference to arthropods, protozoans and helminths of domesticated animals. *Vet Parasitol* 1996; 64: 47-64.
8. Gray NF. Ecology of nematophagous fungi: distribution and habitat. *Ann Appl Biol* 1983; 102: 501-509.
9. Gray NF. Ecology of nematophagous fungi: Methods of collection, isolation and maintenance of predatory and endoparasitic fungi. *Mycopathologia* 1984; 86: 143-153.
10. Gray NF. Ecology of nematophagous fungi: effect of soil moisture, organic matter, pH and nematode density on distribution. *Soil Biol Biochem* 1985; 17: 499-507.
11. Gray NF. Nematophagous fungi with particular reference to their ecology. *Biol Rev* 1987; 62: 245-304.
12. Habluetzel A, Traldi G, Ruggieri S, Attili AR, Scuppa P, Marchetti R, Menghini G, Esposito F. An estimation of *Toxocara canis* prevalence in dogs, environmental egg contamination and risk of human infection in the Marche region of Italy. *Vet Parasitol* 2003; 113: 243-252.
13. Ingham RE. Nematodes. In: Bigham JM (Ed.) *Method of Soil Analysis, Part 2. Microbiological and Biochemical Properties*. Madison, Soil Science Society of America, 1994: 459-490.
14. Jackson ML. Análisis químico de suelos. Barcelona, Ediciones Omega SA, 1982.
15. Jaffee BA. Soil cages for studying how organic amendments affect nematode-trapping fungi. *Appl Soil Ecol* 2002; 21: 1-9.
16. Jansson H-B, Tunlid A, Nordbring-Hertz B. Biological control. In: Anke T (Ed.). *Fungal Biotechnology*. Weinheim, Chapman & Hall, 1997: 38-50.
17. Khan A, Williams KL, Nevalainen HKM. Effects of *Paecilomyces lilacinus* protease and chitinase on the eggshell structures and hatching of *Meloidogyne javanica* juveniles. *Biol Control* 2004; 31: 346-352.
18. Larsen M. Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious micro fungi. *Parasitology* 2000; 120: 121-131.
19. López-Llorca LV. Los hongos parásitos de invertebrados y su potencial como agentes de control biológico. *Rev Iberoam Micol* 1992; 9: 17-22.
20. López-Llorca LV, Olivares-Bernabeu C, Salinas J, Jansson HB, Kolattukudy PE. Pre-penetration events in fungal parasitism of nematode eggs. *Mycol Res* 2002; 106: 499-506.
21. López Ritas J, López Mérida J. El diagnóstico de suelos y plantas. Madrid, Ediciones Mundi-Prensa, 1978.
22. Lysek H, Fassatióvá O, Pineda Cuervo N, Lorenzo Hernández N. Ovicidal fungi in soil of Cuba. *Folia Parasitol (Praha)* 1982; 29: 265-270.
23. Lysek H, Nigenda G. Capacidad de autodeshormintización del suelo. *Salud Pública Mex* 1989; 31: 763-771.
24. Mc Ginnis MR, Padhye AA, Ajello L. Storage of stock cultures of filamentous fungi; yeasts, and some aerobic actinomycetes in sterile distilled water. *Appl Microbiol* 1974; 28: 218-222.
25. Mehlhorn H, Düwel D, Raether W. *Manual de Parasitología Veterinaria*. Madrid, Grass-Iatros, 1993.
26. Mizgajska H. Eggs of *Toxocara* spp. in the environment and their public health implications. *J Helminthol* 2001; 75: 147-151.
27. Morgan-Jones G, Rodríguez-Kabana R. Phytonematode pathology: Fungal modes of action. A perspective. *Nematropica* 1985; 15: 107-114.
28. Morgan-Jones G, Rodríguez-Kabana R. Fungal biocontrol for the management of nematodes. In: Veech JA, Dickson DW (Eds.) *Vistas on Nematology*. Maryland, Society of Nematologists, 1987: 94-99.
29. Nordbring-Hertz B. Nematophagous fungi: strategies for nematode exploitation and for survival. *Microbiol Sci* 1988; 5: 108-116.
30. Olivares-Bernabeu C, López-Llorca LV. Fungal egg-parasites of plant-parasitic nematodes from Spanish soils. *Rev Iberoam Micol* 2002; 19: 104-110.
31. Pasarell L, McGinnis MR. Viability of fungal cultures maintained at -70 °C. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1000-1004.
32. Pesmark L, Marban-Mendoza N, Jansson H-B. Nematophagous fungi from agricultural soils of Central America. *Nematropica* 1995; 25: 117-124.
33. Pyrowolakis A, Westphal A, Sikora R, Becker JO. Identification of root-knot nematode suppressive soils. *Appl Soil Ecol* 2002; 19: 51-56.
34. Sayre RM, Walter DE. Factors affecting the efficacy of natural enemies of nematodes. *Ann Rev Phytopathol* 1991; 29: 149-166.
35. Siddiqui ZA, Mahmood I. Biological control of plant parasitic nematodes by fungi: a review. *Biores Tech* 1996; 58: 229-239.
36. Thamsborg SM, Roepstorff A, Larsen M. Integrated and biological control of parasites in organic and conventional production systems. *Vet Parasitol* 1999; 84: 169-186.