



EN

Use of edible mushrooms as a sustainable alternative for the control of gastrointestinal nematodes in sheep

ES

Uso de hongos comestibles como alternativa sustentable en el control de nematodos gastrointestinales en ovinos

Tomás Escobar-Espinosa¹; Virginia Guadalupe García-Rubio²; Pedro Abel Hernández García²; Juan José Ojeda-Carrasco^{2*}

¹Universidad Autónoma del Estado de México, Centro Universitario UAEM, Maestría en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales Amecameca, km 2.5 carretera Amecameca-Ayapango, Amecameca, Estado de México, C. P. 56900, México.

²Universidad Autónoma del Estado de México, Centro Universitario UAEM Estudios Multidisciplinarios sobre Desarrollo Endógeno para la sustentabilidad territorial Amecameca, km 2.5 Carretera Amecameca-Ayapango, Amecameca, Estado de México, C. P. 56900, México.

Abstract

*Corresponding author:

jjjedac@uaemex.mx

ORCID ID: 0000-0002-4262-9224

Received: Novembre 29, 2024

Accepted: April 21, 2025

Published online: June 11, 2025

The high prevalence of parasitic infections caused by gastrointestinal nematodes (GIN) negatively impacts production parameters, the availability of animal protein, and the global sheep farming economy. The growing resistance of parasites to commercial anthelmintics tends to worsen this problem. Consequently, cost-effective and sustainable control strategies are needed that can target the various developmental stages of these parasites. The objective of this study was to evaluate the ovicidal and larvicidal effects of mushrooms and spent substrate from two strains of *Pleurotus ostreatus* against GIN in sheep. To obtain GIN eggs and larvae, fecal samples were collected from 20 animals in a previously diagnosed flock from the municipality of Ayapango, Estado de México. The *in vitro* effect of four concentrations of mushrooms and spent substrate (1.2 %, 2.25 %, 4.50 %, and 9 %) was evaluated in triplicate. Distilled water was used as a negative control and 1 % ivermectin as a positive control. Exposure times were 72 hours for eggs and 24 and 48 hours for larvae. Statistical analysis was performed using ANOVA. The highest average mortality rate in egg hatch inhibition was observed at the 9 % concentration, with 78.3 % for mushrooms and 69.3 % for the spent substrate. For larvae, the same 9 % concentration after 48 hours resulted in average mortalities of 65.6 % and 65.2 %, respectively. The use of *P. ostreatus* and its spent substrates represent a viable option for reducing reliance on commercial anthelmintics, minimizing environmental damage, and promoting sustainable sheep farming.

Keywords: Parasitosis, *Pleurotus ostreatus*, spent substrate (Thesaurus); and anthelmintic resistance.

Resumen

La alta prevalencia de parasitosis asociadas a nematodos gastrointestinales (NGI), afecta los parámetros productivos, disponibilidad de proteína animal y economía del sector ovino mundial. La creciente resistencia de los parásitos a los antihelmínticos comerciales, tiende a agudizar esta problemática. Ante esto, son necesarias estrategias de control rentables y sustentables, capaces de actuar sobre las diferentes fases de desarrollo de los parásitos. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto ovicida y larvicida de hongos y sustrato agotado de dos cepas de *Pleurotus ostreatus* contra NGI de ovinos. Para la obtención de huevos y larvas de NGI, fueron colectadas heces de 20 animales de un rebaño previamente diagnosticado del municipio de Ayapango, Estado de México. Se evaluó el efecto *in vitro* de cuatro concentraciones del hongo y el sustrato

agotado (12, 2.25, 4.50 y 9 %) por triplicado; como controles: negativo, agua destilada y positivo, ivermectina al 1 %; a tiempos de exposición de 72 h para los huevos; 24 y 48 h para las larvas. El análisis estadístico fue mediante ANOVA. La máxima mortalidad promedio en la inhibición de eclosión de huevos, se observó en la concentración de 9 %, con 78.3 % para los hongos y 69.3 %, para el sustrato agotado. Para las larvas, misma concentración (9 %) a 48 h con promedios de 65.6 y 65.2 %, respectivamente. El uso de *P. ostreatus* y sus sustratos agotados, representan una opción viable para reducir el uso de antihelmínticos comerciales, daños al ambiente e impulsar la ovinocultura sustentable.

Palabras clave: Parasitosis, *Pleurotus ostreatus*, sustrato agotado (Tesauros); y resistencia antihelmíntica.

Introduction

In some rural areas of Mexico, sheep farming is becoming a key sector in addressing issues related to poverty (Chávez-Espinoza et al., 2022). Despite this, it faces serious challenges in increasing its growth rate, with significant implications for social, economic, and environmental sustainability (López-Rojas et al., 2024). This situation is partly explained by the widespread use of extensive systems, which depend on natural vegetation and local agricultural by-products (Vázquez-Martínez et al., 2018). However, the biggest impacts are caused by the high incidence of gastrointestinal nematodes (GIN), which affect sheep at various stages of production, leading to impaired development, reduced weight gain, and poor animal health (Arsenopoulos et al., 2021). Although commercial anthelmintics remain the most common method of control, their indiscriminate and improper use has led to increased parasite resistance. In addition, the high prevalence and adaptability of these parasites raise concerns about the continued reliance on chemical control under such conditions (Claerebout et al., 2020). While strategies implemented in recent decades—such as pasture management, dietary modifications, and selective deworming—have contributed to parasite control, they remain insufficient to achieve the desired outcomes (Reyes-Guerrero et al., 2021).

Recently, alternative intervention capable of targeting different stages of the parasites' biological cycle have been explored, including the use of secondary metabolites derived from plants and mushrooms (Rivero-Perez et al., 2019). Studies conducted with extracts from both wild and cultivated mushrooms have demonstrated their anthelmintic efficacy. Among these, *Pleurotus ostreatus* has been reported for its nutraceutical properties, particularly its ability to produce secondary metabolites with anthelmintic activity—highlighting its potential as a sustainable alternative for parasite control (Páez-León et al., 2022; Valdez-Uriostegui et al., 2021).

In addition to promoting the sustainable use of available natural resources, the aim is to implement

Introducción

En algunas zonas rurales de México, la ovinocultura se está convirtiendo en un sector clave para enfrentar los problemas asociados a la pobreza (Chávez-Espinoza et al., 2022). A pesar de ello, enfrenta serios problemas para incrementar su tasa de crecimiento con las consecuentes repercusiones para la sostenibilidad social, económica y ambiental (López-Rojas et al., 2024). En parte, esto se debe a que el sistema de producción más utilizado es el de tipo extensivo, el cual está basado en la utilización de la vegetación nativa y los subproductos agrícolas disponibles en cada región (Vázquez-Martínez et al., 2018). Sin embargo, las mayores afectaciones son causadas por la alta incidencia de nematodos gastrointestinales (NGI), que afecta a los ovinos en las diferentes etapas productivas, provocando afectaciones en el desarrollo, ganancia de peso y estado de salud de los animales (Arsenopoulos et al., 2021). Aunque el tratamiento con antihelmínticos comerciales es el método de control más común, su uso indiscriminado e inadecuado, ha trascendido al incrementar la resistencia de los parásitos, aunado a ello, la alta prevalencia y gran adaptabilidad de estos, cuestionan el uso del control químico bajo estas circunstancias (Claerebout et al., 2020). Aunque existen estrategias empleadas en las últimas décadas como el manejo del pastoreo, modificaciones en la alimentación y desparasitación selectiva, entre otros; han contribuido con el control de las parasitosis, estas estrategias resultan aún insuficientes para alcanzar los resultados esperados (Reyes-Guerrero et al., 2021).

Recientemente, están en estudio otras alternativas de intervención, capaces de actuar sobre diferentes fases del ciclo biológico de los parásitos, en las que se incluyen el uso de los metabolitos secundarios de plantas y hongos (Rivero-Perez et al., 2019). Investigaciones realizadas con extractos de hongos silvestres y cultivados, han mostrado su eficacia antihelmíntica; se ha reportado el empleo de *Pleurotus ostreatus*, cuyas propiedades nutraceuticas asociadas a la producción de metabolitos secundarios con actividad antihelmíntica, destacan su potencial como alterna-

integrated management and biological control of parasitic infections, thereby significantly reducing the use of conventional anthelmintics (Ortiz et al., 2022). The objective of the present study was to evaluate the *in vitro* ovicidal and larvicidal effects of mushrooms and their spent substrate from two strains of *P. ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kumm (Basidiomycota, Agaricales) against gastrointestinal nematodes in sheep.

Methodological Approach

Study area

The study was carried out in the municipality of Ayapango, located in Region I “Amecameca,” in the southeastern part of Estado de México, between 19° 06' and 19° 10' N and 98° 46' and 98° 51' W, at an elevation of 2 450 MASL. The predominant climate is temperate subhumid with summer rainfall, with an average annual temperature of 14.7°C and average annual precipitation of 900 mm. Soils are mainly regosol (61.7 %) and arenosol (16.6 %). Of the 50.8 km² of land area, 84.1 % is used for agricultural and livestock activities, which is the municipality's primary economic activity. In the livestock sector, cattle, sheep, and pig farming are prominent, as well as poultry farming, particularly broiler chickens (COPLADEM, 2022).

Type of Research

This is a qualitative-quantitative, experimental, and cross-sectional study. The independent variables were the concentrations of *P. ostreatus* basidiomes and their spent substrate, established by percentage duplication (1.12 %, 2.25 %, 4.5 %, and 9 %); exposure times were 72 hours for the eggs and 24 and 48 hours for the larvae. Distilled water was used as the negative control, and a commercial anthelmintic (Ivermectin, 5µg·50µl⁻¹) was used as the positive control. The dependent variables were egg hatch inhibition and larval mortality of GIN in sheep, in bioassays performed *in vitro*.

Qualitatively, egg hatch inhibition (EHI) was determined by counting eggs that did not develop into larvae, or that developed larvae but did not hatch. For the effect on larvae, live larvae were those showing movement, including those that were curled but moved when stimulated. Dead larvae were those that remained extended or showed no movement even when stimulated.

Methodological Process

a) Collection and Processing of Mushrooms and Spent Substrate

Samples of 500 g of basidiomes and spent substrate (organic material that has lost its original nutrients

tiva sustentable para el control (Páez-León et al., 2022; Valdez-Uriostegui et al., 2021).

Además de impulsar el aprovechamiento sustentable de los recursos naturales disponibles, se busca lograr el manejo integral y el control biológico de la parasitosis, reduciendo de forma significativa la aplicación de los antihelmínticos convencionales (Ortiz et al., 2022). El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto ovicida y larvicida *in vitro* de hongos y su sustrato agotado de dos cepas de *P. ostreatus* (Jacq. Ex Fr.) Kumm (Basidiomycota, Agaricales), contra nematodos gastrointestinales de ovinos.

Enfoque Metodológico

Área de estudio

El estudio se realizó en el municipio de Ayapango, ubicado en la Región I “Amecameca”, al suroriente del Estado de México, entre los paralelos 19° 06' y 19° 10' de latitud norte y los meridianos 98° 46' y 98° 51' de longitud oeste, a 2450 msnm. El clima predominante es templado subhúmedo con lluvias en verano, con una temperatura media anual de 14.7 °C y una precipitación media anual de 900 mm. Predominan los suelos tipo regosol (61.7 %) y arenosol (16.6 %). De la superficie territorial de 50.8 km² con que cuenta, el 84.1 % se destina para actividades agropecuarias, siendo la principal actividad económica del municipio. En el sector pecuario destaca la crianza de ganado bovino, ovino y porcino, así como de aves de corral, principalmente de pollo de engorda (COPLADEM, 2022).

Tipo de Investigación

Es un estudio cuali-cuantitativo, experimental y transversal. Las variables independientes fueron las concentraciones establecidas por duplicación porcentual (1.12, 2.25, 4.5 y 9 %) de basidiomas de *P. ostreatus* y su sustrato agotado; los tiempos de confrontación fueron 72 h para los huevos; 24 y 48 h para las larvas. Como control negativo, se empleó agua destilada y como positivo un antihelmíntico comercial (Ivermectina, 5µg·50µl⁻¹). Las variables dependientes fueron la no eclosión de huevos y la mortalidad de larvas de NGI de ovinos, en bioensayos realizados *in vitro*. Cualitativamente, la inhibición de eclosión de huevos (IEH), se consideró por el conteo de huevos en los que no se desarrolló una larva o bien que larvaron pero no eclosionaron. Para el caso del efecto sobre las larvas, se determinaron como larvas vivas aquellas que mostraban movimiento, también las que al estar enroscadas y al estimularlas se movían; por su parte, las muertas, correspondieron a aquellas elongadas, o sin movimiento aun cuando fueran estimuladas.

but still contains residual mycelium and basidiomes after mushroom cultivation) of *P. ostreatus* were collected from two producers in the municipalities of Tenango del Aire and Amecameca, in Estado de México. These samples were identified and transported to the laboratory, where they were placed on trays lined with absorbent paper, kept away from direct sunlight, and left at room temperature for dehydration. The absorbent paper was changed periodically until complete desiccation was achieved. Once dehydrated, 50 g of each sample were weighed using an analytical balance (Model VE-2610, VELAB brand), cut into smaller pieces with scissors, and then ground using an electric grinder (Hamilton Beach 80350R) to a particle size < 2 mm. Each sample was labeled and stored at room temperature in sterile 50 mL plastic conical tubes, sealed with Parafilm (PM992) to prevent rehydration, and wrapped in aluminum foil to block light exposure.

b) *In Vitro* Simulation of Rumen Digestion and Preparation of Treatments with Basidiomes and Spent Substrate

Maize silage (*Zea mays* L.) (Poaceae) was used as the base forage for *in vitro* digestion. It was dried in an oven (Binder Series 12-08177) at 70 °C for 72 hours and subsequently ground to a particle size of 1 mm. Using an analytical balance (Model GA200, OHAUS brand), the dried materials—basidiomes, spent substrate, and maize silage (MS)—were weighed according to the designated proportions to prepare a total mixture of 20 g per treatment.

The proportions of basidiomes (B) or spent substrate (SS) and maize silage for the four treatments were as follows: 9 % (B or SS = 1.8 g; MS = 18.2 g), 4.5 % (B or SS = 0.9 g; MS = 19.1 g), 2.25 % (B or SS = 0.45 g; MS = 19.55 g) and 1.12 % (B or SS = 0.22 g; MS = 19.78 g); respectively for the samples from the municipalities of Tenango del Aire and Amecameca.

To conduct an *in vitro* evaluation of the nematicidal effect of B and SS that closely resembles *in vivo* conditions, the treatments were prepared by simulating the conditions of the ruminal environment. Maize silage and rumen fluid saturated with CO₂ were used to ensure anaerobic fermentation, as occurs in the rumen.

Rumen inoculum was collected preprandially from donor sheep using an esophageal probe. The rumen content was filtered through four layers of cheesecloth to recover only the liquid portion, including dissolved and suspended components (Bayne & Edmondson, 2021). The rumen fluid was then maintained in a thermos at 39 °C during transport to the laboratory. A reduced mineral solution was added to the rumen fluid

Proceso metodológico

a) Obtención y procesamiento de hongos y sustrato agotado

Se obtuvieron muestras de 500 g de basidiomas y sustrato agotado (material orgánico que ha perdido sus nutrientes originales, pero que integra el micelio y basidiomas residuales después del cultivo de los hongos) de *P. ostreatus*, de dos productores de los municipios de Tenango del Aire y Amecameca, en el Estado de México; las cuales fueron identificadas y trasladadas al laboratorio donde se colocaron sobre charolas con papel absorbente, sin exposición directa al sol y a temperatura ambiente para su deshidratación, realizando cambios periódicos del papel absorbente hasta su desecado. Una vez deshidratados, fueron pesadas 50 g de cada muestra, con una balanza granataria (Modelo VE-2610, marca VELAB) y fraccionados con tijeras, para triturarlos posteriormente con un molino eléctrico (Hamilton Beach 80350R) a un tamaño de partícula < 2 mm. Cada muestra fue rotulada y almacenada a temperatura ambiente en tubos cónicos estériles de plástico de 50 mL, sellados con papel Parafilm (PM992) para evitar la rehidratación y forradas con papel aluminio, para impedir el contacto con la luz.

b) Simulación de la digestión en el ambiente ruminal *in vitro* y preparación de los tratamientos con los basidiomas y el sustrato agotado

Fue utilizado ensilado de maíz (*Zea mays* L.) (Poaceae), como forraje base para la digestión *in vitro*, el cual fue secado en una estufa (Blinder serie 12-08177) a 70 °C por 72 h; posteriormente molido a un tamaño de partícula de 1 mm. Con una balanza analítica (Modelo GA200, marca OHAUS), fue pesado el material deshidratado: basidiomas, sustrato agotado y ensilado de maíz (EM), de acuerdo con las proporciones correspondientes, para una mezcla total de 20 g por tratamiento. Las proporciones de basidioma (B) o sustrato agotado (SA) y ensilado de maíz, para los cuatro tratamientos fueron: 9 % (B o SA = 1.8 g; EM = 18.2 g), 4.5 % (B o SA = 0.9 g; EM = 19.1 g), 2.25 % (B o SA = 0.45 g; EM = 19.55 g) y 1.12 % (B o SA = 0.22 g; EM = 19.78 g); respectivamente para las muestras de los municipios de Tenango del Aire y Amecameca.

Con el propósito de realizar una evaluación *in vitro* del efecto nematicida de los B y SA más cercana a la que se presenta en condiciones *in vivo*, los tratamientos fueron elaborados simulando las condiciones del ambiente ruminal, empleando EM y líquido ruminal gasificado con CO₂, para garantizar la fermentación anaerobia como sucede en el rumen. La extracción

at a 1:9 ratio and saturated with CO₂ to maintain anaerobic conditions, following the method described by Theodorou et al. (1994). In 120 mL amber glass bottles, 20 g of each treatment were placed and mixed with 90 mL of the standardized rumen fluid, while maintaining a constant CO₂ flow. The bottles were sealed hermetically. Two bottles containing only standardized rumen fluid were included as blanks. Both the blanks and treatment bottles were monitored for gas pressure to confirm that the *in vitro* fermentation was taking place. Incubation was carried out at 39 °C in a water bath, and gas pressure was measured using a digital manometer (SSI Technologies, Inc. MG-15-A-9V-R). After 72 hours, the contents of the bottles were filtered to determine the *in vitro* dry matter disappearance. The collected liquid was stored at 4 °C it was used in the bioassays.

c) Obtaining Eggs

The study was conducted in accordance with animal use and care standards for research, as approved by the Bioethics Committee of the Centro Universitario UAEM Amecameca and following the Mexican Official Standard NOM-024-ZOO-1995 (DOF, 1995). A preliminary random sampling was carried out in a flock of 250 creole sheep owned by a collaborating farmer. Feces were collected directly from the rectum of the animals, and a coprological examination confirmed the presence of gastrointestinal nematode (GIN) eggs.

Subsequently, a non-probabilistic convenience sampling was performed to select 20 adult ewes, aged between 2 and 4 years, with an average body weight of 51.2 ± 6.52 kg. From each animal, 2 to 10 g of feces were collected using plastic palpation gloves, labeled, and kept refrigerated (4–5 °C) for immediate transport to the laboratory. Complementary procedures for the flotation and McMaster coprological techniques were followed for the identification of GIN-positive animals and quantification of eggs (Figueroa et al., 2015). The feces were manually homogenized by mashing them inside the glove, then 2 g from each sample were resuspended in 100 mL of a 40 % saturated NaCl solution. The mixture was filtered using cheesecloth to let it rest in plastic containers for 20 minutes. Finally, from the samples with the highest number of eggs per gram of feces (EPG), the supernatant was collected and centrifuged (Centrifugal Machine 800-1) at 1500 rpm for 5 minutes in Vacutainer tubes. The ring formed by the eggs was collected using a micropipette (Labnet BioPette Plus) and washed three times with distilled water to remove the sodium chloride. The eggs were then concentrated at the bottom of the tube and stored in 3 mL Eppendorf tubes with isotonic saline solution (0.9%) at 4 °C until use in the bioassay.

de inóculo ruminal fue realizada preprandial de ovinos donadores, con una sonda esofágica, filtrándolo con cuatro capas de tela gasa, para recuperar solo la porción líquida, así como los componentes presentes en solución y suspensión (Bayne & Edmondson, 2021); finalmente se conservó en un termo a 39 °C para su traslado al laboratorio. Al líquido ruminal se agregó una solución mineral reducida en una relación 1:9 y se gasificó con CO₂ para mantener las condiciones anaerobias, según la técnica descrita por Theodorou et al. (1994). En frascos ámbar de 120 mL, se colocaron 20 g de cada tratamiento y agregando 90 ml de líquido ruminal estandarizado con un flujo constante de CO₂, cerrándolos herméticamente. Fueron incluidos dos frascos como blancos (líquido ruminal estandarizado), tanto a los blancos como a los tratamientos se les midió la presión de gas para garantizar que se estuviera llevando la fermentación *in vitro*; la incubación fue a 39 °C en baño maría, y la medición del gas se hizo con un manómetro digital (SSI Technologies, Inc MG-15-A-9V-R). Transcurridas 72 h, el contenido de los frascos fue filtrado para determinar la desaparición *in vitro* de la materia seca, el líquido colectado se mantuvo en refrigeración a 4 °C hasta el empleo en los bioensayos.

c) Obtención de huevos

El estudio se llevó a cabo de acuerdo con los estándares de uso y cuidado de animales destinados a la investigación emitido por el Comité de Bioética del Centro Universitario UAEM Amecameca y atendiendo la Norma Oficial Mexicana NOM-024-ZOO-1995 (DOF, 1995). De forma preliminar, se realizó un muestreo al azar en un rebaño de 250 ovinos criollos de un productor cooperante, colectando las heces directamente del recto de los ovinos; a través de un examen coproparasitológico, se confirmó la existencia de huevos de NGL.

Posteriormente, a través de un muestreo no probabilístico por conveniencia, fueron seleccionados 20 borregas adultas de entre 2 y 4 años con un peso promedio de 51.2 ± 6.52 kg. De cada animal fueron colectados de 2 a 10 g de heces, empleando guantes de palpación de plástico, se identificaron y mantuvieron a temperatura de refrigeración (4-5 °C) para su traslado inmediato al laboratorio. Se siguieron por complementación los procedimientos para las técnicas coproparasitológicas de flotación y McMaster para identificación de los animales positivos a NGL así como para la cuantificación de huevos (Figueroa et al., 2015); las heces fueron homogenizadas manualmente macerando dentro del guante; para después, resuspender 2 gr de cada muestra con 100 mL de solución saturada de NaCl al 40 %; el homogenizado fue filtrado con gasas para dejarlo reposar en recipientes de plástico por 20 min. Finalmente, de las muestras con mayor número

d) Obtaining Larvae

Using the remaining feces collected, a coproculture was carried out following the procedure reported by Liébano et al. (2011). The feces were placed in a plastic tray and mixed with distilled water until a pasty consistency was achieved. Fragments of polyurethane foam (1.5x1.5x0.5 cm) were added, and the container was covered with aluminum foil, leaving a small ventilation opening. The mixture was incubated for 12 days at 27 °C in a bacteriological incubator (Blinder serie 12-08177). At the end of the incubation period, the Baermann technique was used to recover L3 larvae, 24 hours after the start of the procedure. The collected larvae were transferred to plastic Vacutainer tubes and centrifuged at 1500 rpm for 5 minutes. The larvae at the bottom of the tube were recovered using a micropipette (CE-50). To remove detritus, the larvae were resuspended in a 40 % NaCl saline solution and subsequently washed three times with distilled water. Finally, the larvae were stored in 3 mL Eppendorf tubes with isotonic saline solution (0.9 %) at 4 °C until use in the corresponding bioassay.

e) Experimental design

A completely randomized design was used with four inclusion levels (1.12 %, 2.25 %, 4.5 %, and 9 %), with three replicates for each treatment involving basidiomes and spent substrate collected from the municipalities of Tenango del Aire and Amecameca. For egg assays, readings were taken after 72 hours, while for larval assays, two replicates were prepared, and observations were made at 24 and 48 hours after exposure.

f) Bioassays

Bioassays were conducted at the Laboratorio Multidisciplinario de Investigación and the Laboratorio de la Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia del Centro Universitario UAEM Amecameca, located at Km 2.5 Carretera Amecameca-Ayapango, Estado de México,

• Estimation of Egg Hatch Inhibition (EHI) of GIN

With the previously preserved GIN eggs, a sufficient volume was prepared to achieve an approximate dilution of 100 eggs in 50 µL using a 10–100 µL micropipette (CE-50). A 96-well round-bottom polystyrene microplate with a 360 µL capacity per well (Corning®) was used. In each test well, 50 µL of the *in vitro* digestion solution corresponding to each treatment—basidiomes (B) and spent substrate (SS)—were added, followed by 50 µL of the prepared egg dilution, for a final volume of 100 µL per well. Each treatment and concentration was clearly labeled. Distilled water was used as the negative control, while ivermectin at 5 µg·50 µL⁻¹ was used as the

de huevos por gramo de heces (HPG), el sobrenadante colectado fue centrifugado (Centrifugal Machine 800-1) a 1500 rpm por 5 min en tubos de Vacutainer. El anillo formado por los huevos fue recolectado utilizando una micropipeta (Labnet BioPette Plus) y lavado con agua destilada en tres ocasiones, para eliminar el cloruro de sodio y concentrar los huevos en el fondo del tubo para conservarlos en tubos Eppendorf de 3 mL, con solución salina isotónica (0.9 %) a 4 °C hasta su empleo en el bioensayo.

d) Obtención de larvas

Con el resto de las heces colectadas, se procedió a efectuar un coprocultivo, de acuerdo con el procedimiento reportado por Liébano et al. (2011). Fueron colocadas en una charola de plástico y mezcladas con agua destilada hasta que la consistencia fue pastosa, se añadieron fragmentos de espuma de poliuretano (1.5 x 1.5 x 0.5 cm), cubriendo el recipiente con papel aluminio, dejando una pequeña ventana de ventilación para incubarlas por 12 días a 27 °C en una estufa bacteriológica (Blinder serie 12-08177). Al término del tiempo de incubación, se aplicó la técnica de Baerman para recuperar las larvas L3 a las 24 h posteriores. Una vez colectadas en tubos Vacutainer de plástico, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min, para obtener las larvas del fondo del tubo se empleó una micropipeta (CE-50). Con el fin de eliminar los detritus, las larvas fueron resuspendidas en solución salina (NaCl) al 40 % y consecutivamente, se procedió a realizar tres lavados con agua destilada. Las larvas se conservaron en tubos Eppendorf de 3 mL con solución salina isotónica (0.9 %) a 4 °C hasta su empleo en el bioensayo correspondiente.

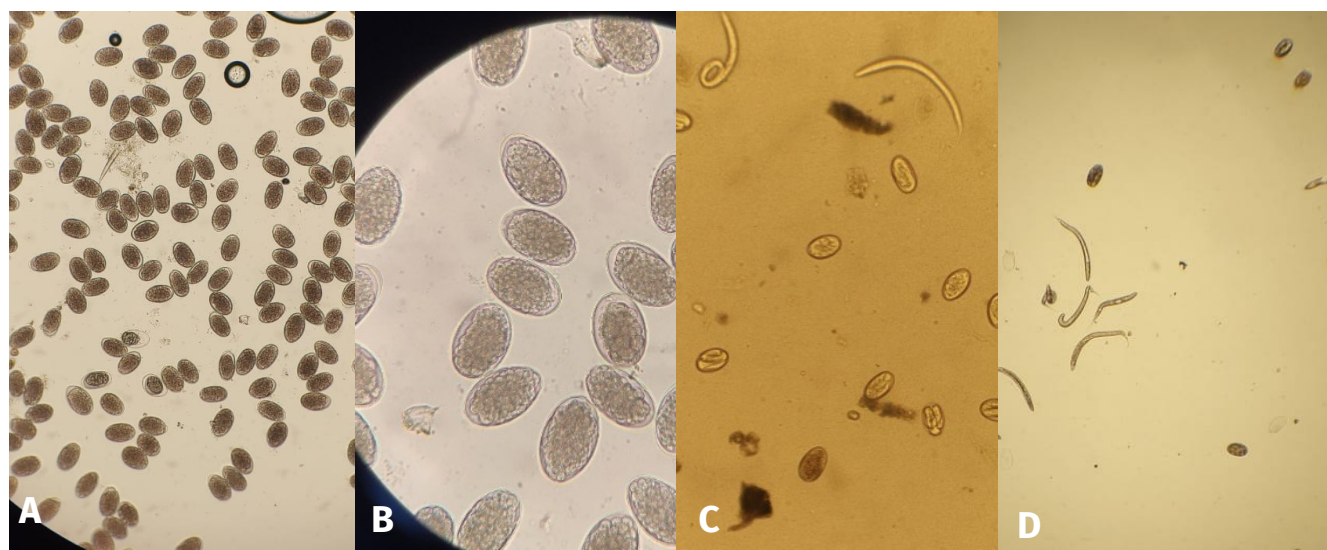
e) Diseño experimental

Se empleó un diseño completamente al azar con cuatro niveles (1.12, 2.25, 4.5 y 9 %) con tres repeticiones para cada tratamiento de basidiomas y sustrato agotado de los municipios de Tenango del Aire y Amecameca. Para los huevos la lectura se realizó a las 72 horas y en el caso de las larvas, se prepararon dos réplicas para hacer la lectura a las 24 y 48 horas posteriores a la confrontación.

f) Realización de bioensayos

Se realizaron en el Laboratorio Multidisciplinario de Investigación y el Laboratorio de la Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia del Centro Universitario UAEM Amecameca, km 2.5 Carretera Amecameca-Ayapango, Estado de México.

• Estimación de la inhibición de la eclosión de huevos (IEH) de NGI



Note: Microphotographs of gastrointestinal parasite eggs obtained from sheep feces (A and B); eggs and larvae from the bioassay (C and D). Microphotographs taken by the authors.
Nota: Microfotografías de huevos de parásitos gastrointestinales obtenidos de las heces de ovinos (A y B); huevos y larvas derivadas del bioensayo (C y D). Tomadas por los autores.

Figure 1. Sheep gastrointestinal nematode eggs.
Figura 1. Huevos de nematodos gastrointestinales de ovinos.

positive control. The plates were incubated at 27 °C for 72 h and then refrigerated for 4 h to slow down metabolism before reading. For reading, unhatched eggs and larvae (alive or dead) were counted as hatched. Observations were conducted using an optical microscope at 40x magnification (Velab VE-B6 binocular) (Figure 1). The egg hatch inhibition percentage was calculated using the formula reported by Pineda-Alegría (2017):

$$\% \text{ of egg hatch inhibition} = \frac{\text{Treatment average} - \text{Control average} (-)}{\text{Treatment average}}$$

For the larval assay, two exposure times were used: 24 and 48 hours. The same homogenization and dilution procedure used for the egg assay was followed, preparing approximately 100 larvae in 50 µL. In each well corresponding to a treatment, 50 µL of the *in vitro* digestibility solution were added, followed by 50 µL of the diluted larvae in physiological saline solution (0.9 %), resulting in a final volume of 100 µL per well.

Microscopic evaluation was carried out at 40x magnification using an optical microscope. The criteria for determining live larvae were that they showed movement or were coiled, and moved when stimulated; for dead larvae, those that were elongated and showed no movement even when stimulated were considered dead (Figure 2).

The mortality percentage was calculated using the formula reported by Pineda-Alegría (2017):

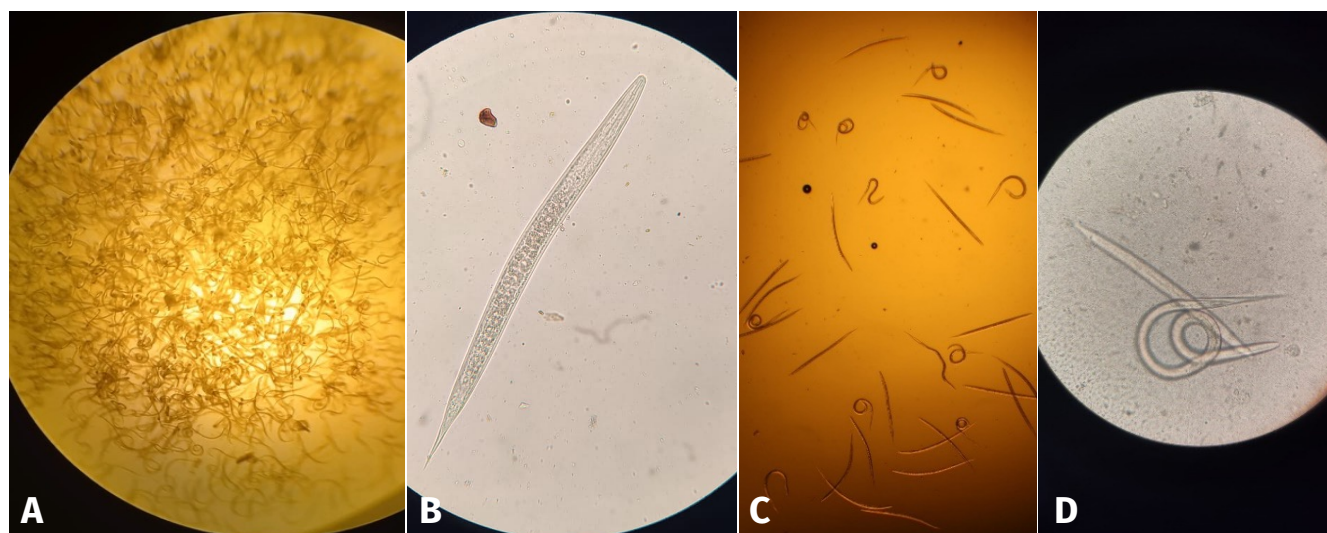
$$\% \text{ Mortality} = \frac{\text{Treatment average} - \text{Control average} (-)}{\text{Treatment average}}$$

Con los huevos de NGI previamente preservados, se preparó el volumen suficiente para conseguir una dilución aproximada de 100 huevos en 50 µL empleando una micropipeta de 10-100 µL (CE-50). Utilizando una microplaca de poliestireno de 96 pocillos de fondo redondo de 360 µL de capacidad (Corning®); en cada pocillo de prueba se colocaron 50 µL, de la solución obtenida de la digestión *in vitro* correspondiente a cada tratamiento (B) y (SA) y añadiendo 50 µL con la dilución ya mencionada de los huevos para un volumen final por pocillo de 100 µL, identificando cada tratamiento y concentración. Como control negativo se empleó agua destilada y como control positivo ivermectina 5µg:50µL⁻¹. Las placas se mantuvieron a 27 °C por 72 h, al finalizar se refrigeraron por 4 h para limitar el metabolismo y proceder a realizar la lectura, considerando los huevos que no eclosionaron y las larvas (vivas o muertas) como eclosionados; se empleó un microscopio óptico a un aumento de 40 X (Velab VE-B6 binocular) (Figura 1). El porcentaje de inhibición de la eclosión se calculó con la fórmula reportada por Pineda - Alegria (2017):

$$\% \text{ inhibición de eclosión de huevos} = \frac{\text{Promedio del Tratamiento} - \text{Promedio del control} (-)}{\text{Promedio del Tratamiento}}$$

• Estimación de la mortalidad de larvas de NGI.

Para el caso de las larvas, fueron empleados dos tiempos de confrontación (24 y 48 h). Para la homogenización y dilución, fue seguido el mismo procedimiento empleado con los huevos, con aproximadamente 100 larvas en 50 µL. Después en cada pocillo del tratamiento correspondiente, se depositaron 50 µL de la solución derivada de la digestibilidad *in vitro*



Note: Microphotographs of larvae obtained from the coproculture of sheep feces (A and B). Comparison between live and dead larvae resulting from the bioassay (C and D). Microphotographs taken by the authors.

Nota: Microfotografías de larvas obtenidas del coprocultivo de las heces de ovinos (A y B). Comparación entre larvas vivas y muertas resultado del bioensayo (C y D). Tomadas por los autores.

Figure 2. Gastrointestinal nematode larvae

Figura 2. Larvas de nematodos gastrointestinales

f) Statistical Analysis

The data on egg hatch inhibition and larval mortality of gastrointestinal nematodes were analyzed using a generalized linear model with ANOVA to examine the differences between the means of the various treatment concentrations applied to both basidiomes and spent substrate. The negative control (distilled water) was used to adjust the mortality percentage.

Results and Discussion

Spent substrates and basidiome extracts of *P. ostreatus* used in the study showed ovicidal and larvicidal effects against GIN affecting sheep.

• Egg Hatch inhibition (EHI)

The results of EHI, assessed 72 hours post-treatment, are presented in Table 1. In all cases, the highest inhibition percentages were observed at the maximum concentration tested (9 %), with the basidiomes (B) from Amecameca showing the highest value (85.7 %). Based on the average EHI per component, all treatments exhibited ovicidal activity above 50 %, with greater efficacy observed in the basidiomes: 69.4 % for Amecameca and 62.4 % for Tenango, compared to the spent substrates (SS), which showed 54.4 % and 56.8 %, respectively.

Regarding the average EHI of concentrations, there was no directly proportional correlation between these

adicionando 50 µL con las larvas diluidas en solución salina fisiológica (0.9 %), para un volumen final de 100 µL. Posteriormente, fue realizada la lectura en un microscopio óptico a un aumento de 40 X. El criterio para establecer las larvas vivas fue que mostraran movimiento o estuvieran enroscadas y al estimularlas se movían; en el caso de las muertas, aquellas que se encontraban elongadas y sin movimiento aun cuando fueran estimuladas (Figura 2).

El porcentaje de mortalidad se calculó con la fórmula reportada por Pineda-Alegría (2017):

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

f) Análisis estadístico

Los datos sobre la inhibición de la eclosión de huevos y la mortalidad de larvas de NGI, fueron analizados mediante un modelo lineal generalizado, usando un análisis de varianza (ANOVA), para examinar las diferencias entre las medias de las diferentes concentraciones de los tratamientos empleados tanto para los basidiomas como para el sustrato agotado. El control negativo (agua destilada) se utilizó para ajustar el porcentaje de mortalidad.

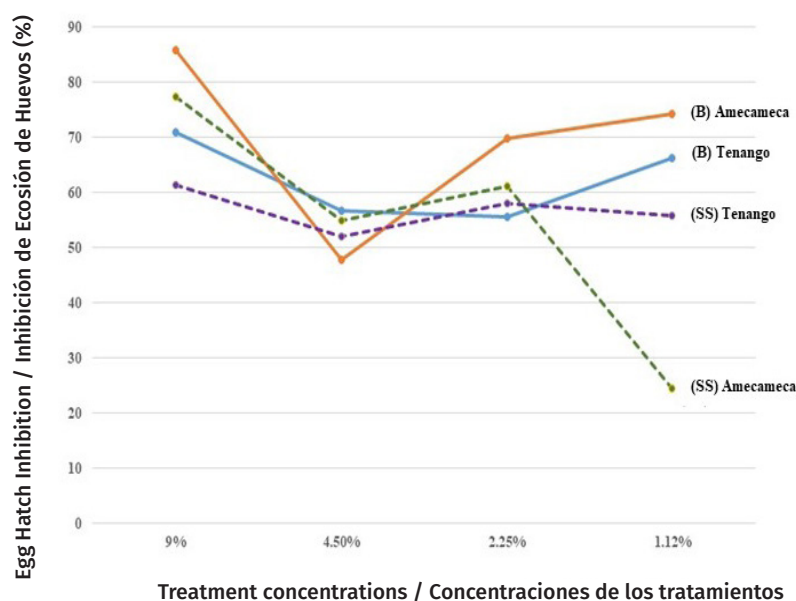
Resultados y Discusión

Los extractos de basidiomas y sustratos agotados de *P. ostreatus* empleados en los tratamientos del estudio, mostraron efectos ovicidas y larvicidas contra NGI que afectan a ovinos.

Table 1. Percentage of egg hatch inhibition 72 hours post-treatment.**Cuadro 1. Porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos a las 72 h post-tratamiento.**

CONTROLS AND CONCENTRATIONS / CONTROLES Y CONCENTRACIONES		BASIDIOMES / BASIDIOMAS			EXHAUSTED SUBSTRATE / SUSTRATO AGOTADO		
		Tenango	Amecameca	$\bar{X}$	Tenango	Amecameca	$\bar{X}$
Control (-) Water / Control (-) agua	33.7						
Control (+) Ivermectin / Control / Ivermectina	88.4						
9 %		70.9±16.0 ^b	85.7±10.71 ^b	78.3	61.3±4.7 ^b	77.3±7.5 ^b	69.3
4.50 %		56.7±2.7 ^c	47.8±8.8 ^b	52.3	52.1±14.0 ^a	55.0±6.5 ^b	53.3
2.25 %		55.6±3.1 ^b	69.8±9.1 ^b	62.7	57.9±2.6 ^c	61.1±13.8 ^b	59.5
1.12 %		66.3±7.1 ^b	74.2±12.6 ^b	70.3	55.8±3.1 ^b	24.4±6.4 ^a	40.1
Average / Promedio		62.4	69.4	65.9	56.8	54.5	55.6

$P \leq 0.05$, different letters in the same column indicate statistically significant differences. /
 $P \leq 0.05$, literales diferentes en la misma columna muestran diferencias significativas.

**Figure 3. Percentage of EHI at different treatment concentrations.****Figura 3. Porcentaje de IEH en las diferentes concentraciones de los tratamientos.**

variables (Figure 3), because the highest concentration (9 %, with $\bar{X}_c=78.3$ %); was followed by 2.25 % (61.1 %), 1.12 % (55.2 %), and 4.50 % (52.8 %). According to the ANOVA, significant differences were found among treatments.

The highest average EHI obtained ($\bar{X}=78.3$ %, for B), is comparable to that reported in a study using two fractions of hydroalcoholic extracts of *P. ostreatus*, in which EHI values of 78.8 % for the organic fraction and 76.9 % for the aqueous fraction were observed, both at a concentration of 5 mg·mL⁻¹ (Páez-León et al., 2022).

• Inhibición de la eclosión de huevos (IEH)

Los resultados de la IEH, tomados 72 h post-tratamiento, se muestran en el Cuadro 1. En todos los casos el mayor porcentaje se obtuvo a la máxima concentración empleada (9 %); correspondiendo a los basidiomas (B) de Amecameca el valor más alto (85.7 %). De acuerdo con los promedios de IEH por componente, todos los tratamientos alcanzaron valores superiores al 50 % de actividad ovicida, con mayor eficacia en B con 69.4 % para Amecameca y

Based on the average EHI per component, greater ovicidal efficacy was observed in B with 65.9 %, compared to 55.6 % in SS. These results differ notably from those reported by Magalhães de Matos et al. (2020), who observed 100 % EHI with aqueous extracts of *P. ostreatus* basidiomes at a concentration of 2.24 mg·mL⁻¹. However, it is important to highlight that in the present study, the concentrations of B and SS were based on the inclusion level used in the *in vitro* digestion assay and therefore are not directly comparable. The highest EHI was recorded in B from Amecameca (85.7%) compared to 70.9 % from Tenango. Although the same fungal species (*P. ostreatus*) was used, it has been noted that the concentration of nematicidal metabolites in fungi is linked to biogenesis processes, which are directly influenced by the composition of the cultivation substrate. In particular, the carbon-to-nitrogen (C/N) ratio and carbohydrate content tend to affect the composition and production of metabolites (Chegwin and Nieto, 2013; Sakamoto, 2018).

Similarly, the observed variations are associated with the concentrations used, extraction methods, and exposure times. In hydroalcoholic extracts, Valdez-Uriostegui et al. (2021) reported an EHI of 100 % for B at concentrations of 3.2 and 6.4 mg·mL⁻¹ at 48 h, and 98.1 % and 99.2 % at 72 h, respectively. For SS, EHI values of 77 % (48 h) and 87.2 % (72 h) were reported, both at a concentration of 25.6 µg·mL⁻¹. In comparison, the 4.5 % concentration used in the present study yielded an average EHI of 52.3 % for B and 53.3 % for SS at 72 h, indicating a significant difference in efficacy. In another study using hydroalcoholic extracts, an EHI of 97.6 % was reported for B at 1341 µg·mL⁻¹ after 72 h—only a 0.5 % difference compared to the 3.2 µg·mL⁻¹ treatment but achieved at nearly one-third of the concentration (1.34 mg·mL⁻¹) (Cuevas-Padilla et al., 2024).

With the positive control (Ivermectin, 5µg·50µL⁻¹), an EHI of 88.4 % was obtained. Comparatively, the highest and closest value was observed for B from Amecameca, with 85.7 % (at a concentration of 9 %), indicating good efficacy of the fungal extracts. The results for the anthelmintic are higher than those reported by Mondragón-Ancelmo et al. (2019), who observed 57 % EHI (7 days post-treatment (DPT) with Ivermectin at 0.22 mg·kg⁻¹ body weight), and by Toro et al. (2014), who reported 77 % (15 DPT at 0.2 mg·kg⁻¹). These results are also similar to those obtained by González-Garduño et al. (2014), with 86.7 % EHI (7 DPT with Ivermectin at 0.2 mg·kg⁻¹ body weight). However, the EHI observed is lower than that reported by Collazo-Preciado et al. (2023) in sheep treated with Ivermectin at 4 % (10.2 mg·kg⁻¹), which reached a maximum of 98.4 % at 14 days, as well as by Bosco et al. (2020), with 99.1 % EHI (7 DPT with Ivermectin at 0.2 mg·kg⁻¹ body weight), among

62.4 % para Tenango, en comparación con los sustratos agotados (SA) con 54.4 y 56.8 %, respectivamente.

Respecto a la IEH promedio de las concentraciones, no hubo correlación directamente proporcional entre estas variables (Figura 3), ya que la máxima (9 % con $\bar{X}_c=73.8$ %); fue seguida por la de 2.25 % (61.1 %), 1.12 % (55.2 %) y 4.50 % (52.8 %). De acuerdo con el ANOVA, existieron diferencias significativas entre los tratamientos.

La máxima IEH promedio obtenida ($\bar{X}=78.3$ %, para B), se aproxima a la reportada en el estudio realizado con dos fracciones de extractos hidroalcohólicos de *P. ostreatus*, en donde se informa una IEH para la fracción orgánica de 78.8 % y para la acuosa de 76.9 %, ambas a una concentración de 5 mg·mL⁻¹ (Páez-León et al., 2022).

Con base en la IEH promedio por componente, se obtuvo una mayor eficacia ovicida para B con 65.9 %, en comparación con el 55.6 % de SA. Estos resultados presentan una notable diferencia con los de Magalhães de Matos et al., (2020) quienes reportan una IEH del 100 % en extractos acuosos de B de *P. ostreatus* a una concentración de 2.24 mg·mL⁻¹. No obstante, es importante resaltar que en este estudio las concentraciones de B y SA correspondieron a la inclusión empleada en la digestión *in vitro*, por lo que no es comparable en forma directa; la mayor IEH correspondió a los B de Amecameca (85.7 %) contra el 70.9 % de Tenango. A pesar de tratarse de la misma especie de hongo (*P. ostreatus*). Se ha señalado que las concentraciones de los metabolitos presentes en los hongos con efectos nematocidas, tienen que ver con los procesos de biogénesis directamente influenciados por la composición del sustrato de cultivo. En particular, la relación en el contenido C/N y el contenido de carbohidratos tienden a modificar la composición y producción de metabolitos (Chegwin y Nieto, 2013; Sakamoto, 2018).

Así mismo, las variaciones se relacionan con las concentraciones, tipos de extracción y tiempos de exposición empleados. En extractos hidroalcohólicos, Valdez-Uriostegui et al., (2021) reportan una IEH de B = 100 % a concentraciones de 3.2 y 6.4 mg·mL⁻¹ a 48 h y B = 98.1 y 99.2 % a 72 h, respectivamente. Para SA = 77 % (48 h) y 87.2 % (72 h) ambas a 25.6 mg·mL⁻¹. Entre estas concentraciones, la de 4.5 % empleada en el estudio, registró una IEH promedio de B = 52.3 % y SA = 53.3 % a 72 h, con una diferencia significativa en términos de eficacia. Comparativamente, en otro estudio con extractos hidroalcohólicos, se reporta una IEH de B = 97.6 % (1341 µg·mL⁻¹) a 72 h con una diferencia de 0.5 % a la reportada para 3.2 mg·mL⁻¹, pero a una concentración de casi un tercio (1.34 mg·mL⁻¹) (Cuevas-Padilla et al., 2024).

Table 2. Larval mortality (%) of GIN at 24 and 48 hours post-treatment at different concentrations of fungal extracts and spent substrate.**Cuadro 2. Porcentaje de mortalidad de larvas de NGI a las 24 y 48 h post-tratamiento a diferentes concentraciones de hongos y sustrato agotado**

CONTROLS AND CONCENTRATIONS / CONTROLES Y CONCENTRACIONES			BASIDIOMES / BASIDIOMAS			EXHAUSTED SUBSTRATE / SUSTRATO AGOTADO			
			Tenango	Amecameca	$\bar{X}$	Tenango	Amecameca	$\bar{X}$	$\bar{X}_c$
24 h / 24 hrs	Control (-) Water / Control (-) Agua	35.9							
	Control (+) Ivermectin Control (+) Ivermectina	99.5							
	9 %		60.6±0.9 ^b	60.7±1.9 ^a	60.7	61.1±1.1 ^b	61.0±0.8 ^c	61.1	60.9
	4.50 %		60.2±1.0 ^b	59.1±1.9 ^a	59.7	59.6±1.6 ^a	57.5±1.3 ^b	58.6	59.1
	2.25 %		57.2±1.8 ^a	55.4±3.1 ^a	56.3	55.1±3.2 ^a	54.5±2.1 ^a	54.8	55.6
	1.12 %		56.5±2.1 ^a	53.4±5.1 ^a	55.0	52.7±4.9 ^a	54.1±3.9 ^a	53.4	54.2
	Average / Promedio		58.6	57.1	57.9	57.1	56.8	56.9	
48 h / 48 hrs	Control (-) Water / Control (-) Agua	33.5							
	Control (+) Ivermectin / Control (+) Ivermectina	97.5							
	9 %		65.4±0.5 ^c	65.7±0.3 ^b	65.6	64.9±0.5 ^c	65.5±0.3 ^a	65.2	65.4
	4.50 %		64.9±0.5 ^c	64.8±0.9 ^b	64.9	64.5±0.7 ^c	63.6±0.8 ^c	64.1	64.5
	2.25 %		62.1±0.962 ^b	62.9±1.1 ^b	62.5	63.0±1.4 ^b	64.3±0.7 ^c	63.7	63.1
	1.12 %		63.1±1.4 ^b	62.1±3.1 ^a	62.6	61.5±1.3 ^b	61.1±1.9 ^a	61.3	62.0
	Average / Promedio		63.9	63.9	63.9	63.5	63.6	63.6	

$P \leq 0.05$, different letters in the same column indicate statistically significant differences /
 $P \leq 0.05$, literales diferentes en la misma columna muestran diferencias significativas.

other studies. According to McKenna (2006) and Kaplan et al. (2023), values lower than 95 % are indicative of anthelmintic resistance (AR) or suggest that the recommended dosage by the manufacturer (0.2 mg·kg⁻¹) may be insufficient for an effective response. Based on the results obtained, it is considered more likely that the observed differences are due to AR, associated with the type of control used in the herds.

• Larvicidal Activity

Larvicidal activity results are presented comparatively in Table 2, showing closely similar values between B and SS for each exposure time (Figure 4). As observed with EHI, the highest efficacy was achieved at the maximum concentration (9 %). At 24 hours, larvicidal efficacy was

Con el control positivo (Ivermectina, 5µg·50µL⁻¹), se obtuvo una IEH de 88.4 %; comparativamente, el valor máximo y más cercano fue para B de Amecameca, con 85.7 % (concentración de 9 %), lo que representa una buena eficacia de los extractos del hongo. Los resultados para el antihelmíntico son superiores a los reportados por Mondragón-Ancelmo et al. (2019), de 57 % (7 días post-tratamiento (DPT) con Ivermectina de 0.22 mg·kg⁻¹ de peso corporal) y por Toro et al. (2014), con un 77 % (15 DPT y 0.2 mg·kg⁻¹). Asimismo, se aproximan a los obtenidos por González-Garduño et al. (2014) con 86.7 % (7 DPT con Ivermectina 0,2 mg·kg⁻¹ PV). Sin embargo, el IEH es inferior al reportado por Collazo-Preciado et al. (2023) en ovinos tratados con Ivermectina al 4% (10.2 mg·kg⁻¹) con un máximo de 98.4 % a los 14 días; así como, por Bosco et al. (2020),

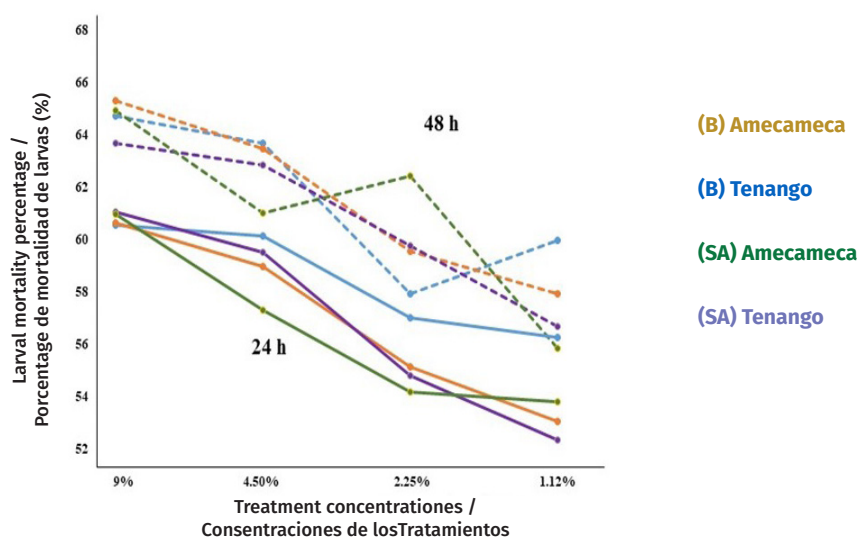


Figure 4. Larval mortality percentage at 24 and 48 h.
Figura 4. Porcentaje de mortalidad de larvas a las 24 y 48 h.

B = 60.7 % for Amecameca and 60.6 % for Tenango, while SS showed 61.0 % and 61.1 %, respectively. At 48 hours, efficacy increased, with B = 65.7 % and 65.4 %, and SS = 65.5 % and 64.9 % for Amecameca and Tenango, respectively. According to ANOVA, there were statistically significant differences between exposure times.

The average larval mortality values at 24 h were 57.9 % for B and 56.9 % SS; at 48 h, mortality increased to 63.9 % and 63.6 %, respectively. In a study using hydroalcoholic extracts (70:30 ethanol-water) of B and SS from *P. ostreatus*, with the same exposure times, Valdés-Uriostegui et al. (2021) reported a lower larval mortality for B at 24 h (50.5 %) compared to the present study, but a higher value (70.5 %) at 48 h. Nevertheless, both studies align in identifying increased larval mortality with longer exposure times. However, significant differences were observed in SS: 7.3 % mortality at 24 h and 2.5 % at 48 h representing a 56 % and 61.1 % difference, respectively, compared to the results obtained in this study. Greater consistency was found with the findings of Rodríguez (2022), who tested 10 hydroalcoholic extracts of SS (prepared with 200 g of SS powder in 200 mL of 95 % methanol), and found that all exhibited larvicidal effects above 50 %, with the highest mortality (98.5 %) recorded at 48 h for one substrate.

As previously mentioned, the extraction method and the substrates used for fungal cultivation can alter the quantity of larvicidal metabolites available and, consequently, their effectiveness. In these cases, although the same exposure times (24 and 48 h) were used, the methodology for applying treatments differed, which also influences the outcomes. Unlike the referenced

con 99.1 % (7 DPT con Ivermectina 0.2 mg·kg⁻¹ PV), entre otros estudios. De acuerdo con McKenna (2006) y Kaplan et al. (2023), valores menores al 95 %, son indicativos de una resistencia al antihelmíntico (RAH) o que la dosis recomendada por el fabricante (0.2 mg·kg⁻¹) puede ser insuficiente para tener una buena respuesta. Por los resultados obtenidos, se considera que es mayor la posibilidad de que las diferencias se deban a RAH, asociadas al tipo de control empleado en los rebaños.

• Actividad larvicida

Respecto a la actividad larvicida, los resultados se presentan comparativamente en el Cuadro 2, donde se muestran valores muy cercanos para B y SA, para cada uno de los tiempos de exposición (Figura 4). Al igual que en IEH, la mayor eficacia se alcanzó a la máxima concentración (9 %). A las 24 h con B = 60.7 % para Amecameca y 60.6 % para Tenango, y SA = 61.0 y 61.1 %, respectivamente. A las 48 h, la eficacia larvicida fue mayor con B = 65.7 y 65.4 % y SA = 65.5 y 64.9 % para Amecameca y Tenango, en cada caso. Con base en el ANOVA, existen diferencias significativas entre los tiempos de exposición.

Los valores promedio a las 24 h, fueron 57.9 % (B) y 56.9 % (SA); mientras que a las 48 h fueron 63.9 y 63.6 %, respectivamente. En un estudio realizado con extractos hidroalcohólicos (70:30 etanol-agua) de B y SA de *P. ostreatus*, empleando los mismos tiempos de exposición, Valdés-Uriostegui et al. (2021), reportan para B a las 24 h un porcentaje menor de mortalidad larvaria (50.5 %) al obtenido en este estudio, pero mayor (70.5 %) a las 48 h; aunque coinciden con la identificación de

studies that evaluated the nematicidal efficacy of *P. ostreatus* against gastrointestinal nematodes of sheep using direct confrontation with extracts obtained through solvents of differing polarity (ethanol and methanol), the present study prepared treatments simulating ruminal conditions. MS was used as the base forage, and ruminal fluid was enriched with CO₂ to ensure anaerobic fermentation, mimicking the rumen environment conditions. This allowed for an *in vitro* approximation of the nematicidal effect of both basidiomes and spent substrate, more closely resembling natural conditions. The results confirm that the metabolites present in both B and SS exert a positive effect on egg hatch inhibition and larval mortality of GIN in sheep. This study provides evidence that under *in vitro* conditions the ovicidal and larvicidal properties of the fungus and exhausted substrate are preserved even after ruminal digestion factors not previously addressed in similar studies. Moreover, no adverse effects on ruminal microbiota activity were observed due to the metabolites present in either basidiomes or spent substrate.

Based on the results achieved, it can be inferred that, with the increase of treatment concentrations and exposure times, better results can be obtained. However, the use of alternatives to commercial anthelmintics should be considered as part of an integrated control strategy, rather than as the sole method of control. Furthermore, the nematode larvae used in this study do not appear to exhibit resistance to macrocyclic lactones; nevertheless, it is important to note that resistance to these drugs has been reported in various other studies.

Conclusions

The results generated confirm the ovicidal and larvicidal activity of *P. ostreatus* against gastrointestinal nematodes of sheep. In both cases, the best outcomes were observed at the highest treatment concentration (9 %), with greater efficacy in basidiome extracts compared to spent substrate extracts. In the *in vitro* egg hatch (IEH) test, the highest efficacy was achieved with basidiomes from Amecameca. The larvicidal effect was most pronounced at 48 h, with higher efficacy observed in both B and ES extracts from Tenango.

These findings provide evidence that the bioactive metabolites present in both the basidiomes of *P. ostreatus* and in the spent substrate—rich in mycelium and some fungal primordia—retain their nematicidal properties after *in vitro* digestion. They demonstrate efficacy in inhibiting egg hatching and inducing larval mortality of GIN, highlighting the significant potential for using both basidiomes and spent substrates in the biological control of parasitic nematodes.

una mayor mortalidad a mayores tiempos de exposición. Sin embargo, en SA hay diferencias significativas, al registrar 7.3 % (24 h) y 2.5 % (48 h) con una diferencia de 56 % y 61.1 %, respectivamente, respecto a lo obtenido en este estudio. Mayor concordancia con lo reportado por Rodríguez (2022) quien probó 10 extractos hidroalcohólicos de SA (200 g de polvo de SA en 200 mL de metanol al 95 %), obteniendo que todos tuvieron un efecto larvicida superior al 50 %, con el mayor porcentaje (98.5) a las 48 h de exposición para un sustrato.

Como se refirió, el tipo de extracción y los sustratos empleados en el cultivo de hongos, pueden modificar la cantidad de metabolitos con acción larvicida disponibles y, por tanto, sus efectos. En estos casos, aunque se emplearon los mismos tiempos de exposición (24 y 48 h) la metodología empleada en la aplicación de los tratamientos es diferente, lo que de igual forma influye en los resultados. A diferencia de las investigaciones referidas que evalúan la eficacia nematicida de *P. ostreatus* contra NGI de ovinos, mediante la confrontación directa de extractos obtenidos con solventes de diferente polaridad (etanol y metanol), en el presente estudio, los tratamientos se elaboraron simulando las condiciones del ambiente ruminal, utilizando el EM como forraje base y líquido ruminal gasificado con CO₂, para garantizar la fermentación anaerobia como sucede en el rumen, lo que permitió una aproximación *in vitro* del efecto nematicida de los basidiomas y sustrato agotado, más cercana a la que se presenta en condiciones naturales, corroborando que el efecto de los metabolitos presentes tanto en B como en SA, tienen un efecto favorable sobre la inhibición de la eclosión de los huevos y la mortalidad en las larvas de NGI de ovinos.

Este trabajo proporciona evidencia de que en condiciones *in vitro*, se conservan las propiedades ovicidas y larvicidas del hongo y el sustrato agotado posterior a la digestión en el rumen, lo cual no se había realizado anteriormente en otros trabajos similares, asimismo no se muestra alteración de la actividad del microbiota ruminal por efecto de los metabolitos presentes en los basidiomas o el sustrato agotado.

Con base en los resultados obtenidos, se puede inferir que, con el aumento de las concentraciones de los tratamientos y tiempos de exposición, pueden obtenerse mejores resultados. No obstante, el empleo de alternativas diferentes al uso de antihelmínticos comerciales, debe considerarse como parte del control integral y no solo como única medida de control. Por otro lado, las larvas de nematodos empleadas en este estudio aparentemente no muestran resistencia a las lactonas macrocíclicas, pero no debe pasarse por

Determining the optimal concentrations *in vitro* will enable subsequent *in vivo* trials aimed at promoting the sustainable control of parasites and, where applicable, exploring potential administration routes for either the basidiomes or the spent substrate of this fungus. This approach would allow for the restriction of commercial anthelmintic use to cases requiring selective treatment, thereby contributing not only to improved health and welfare of sheep—and thus increased productivity—but also to the reduction of negative environmental impacts, particularly on soil health, as is the case with macrocyclic lactones.

End of English version

References / Referencias

- Arsenopoulos, K. V., Fthenakis, G. C., Katsarou, E. I., & Papadopoulos, E. (2021). Haemonchosis: A challenging parasitic infection of sheep and goats. *Animals*, 11(2), 1–29. <https://doi.org/10.3390/ani11020363>
- Bayne, J. E., & Edmondson, M. A. (2021). Diseases of the gastrointestinal system. In Pugh, D. G., Passler, T., Edmondson, M. A., & Baird, A. N. *Sheep, Goat and Cervid Medicine*, 3rd Edition. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-62463-3.00014-1>
- Bosco, A., Kießler, J., Amadesi, A., Varady, M., Hinney, B., Ianniello, D., Maurelli, M. P., Cringoli, G., & Rinaldi, L. (2020). The threat of reduced efficacy of anthelmintics against gastrointestinal nematodes in sheep from an area considered anthelmintic resistance free. *Parasites & Vectors*, 13, 457. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04329-2>
- Chávez-Espinoza, M., Cantú-Silva, I., González-Rodríguez, H., & Montañez-Valdez, O. D. (2022). Small ruminant production systems in Mexico and their effect on productive sustainability. *Revista MVZ Córdoba*, 27(1), e2246. <https://doi.org/10.21897/rmvz.2246>
- Chegwin, A. C., & Nieto I. J. (2013). Influencia del medio de cultivo en la producción de metabolitos secundarios del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* cultivado por fermentación en estado líquido empleando harinas de cereales como fuente de carbono. *Revista Mexicana de Micología* 37:1-9. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmm/v37/v37a2.pdf>
- Claerebout, E., de Wilde, N., van Mael, E., Casaert, S., Velde, F. V., Roeber, F., Vinuela, V. P. V., Levecke, B., & Geldhof, P. (2020). Anthelmintic resistance and common worm control practices in sheep farms in Flanders, Belgium. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 20, 100393. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100393>
- Collazo-Preciado, G., López-Rodríguez, A., Pineda-Lucatero, J., López-Rodríguez, L. A., & Macedo-Barragán, R. (2023). Eficacia de la ivermectina y del albendazol sulfóxido para el control de nematodos gastrointestinales en ovejas Pelibuey. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 34(2): e23533. <https://doi.org/10.15381/rivep.v34i2.23533>
- COPLADEM (Marzo 19, 2022). Plan de Desarrollo Municipal Ayapango 2022-2024. Comité de Planeación para el Desarrollo del Estado de México. <https://tinyurl.com/4wuefym5>
- Cuevas-Padilla, E. J., Hernández-Velázquez, V. M., Cardoso-Taketa, A., Sánchez, J. E., Vargas-Uriostegui, P., Dantan-González, E., Castañeda-Ramírez, G. S., de Freitas, S. F. E., Páez-León, S. Y., & Aguilar-Marcelino, L. (2024). Crude extracts of *Pleurotus* spp. and the presence of their proteins in the ovicidal and larvicidal activity of *Haemonchus contortus*, *Journal of Medicinal Food* 27(4),379-384. <http://doi.org/10.1089/jmf.2023.0014>

Conclusiones

Los resultados generados ratifican la actividad ovicida y larvicida de *P. ostreatus*, contra NGI de ovinos. En ambos casos, los mejores resultados se obtuvieron en los tratamientos de máxima concentración (9 %), con una mayor eficacia en los extractos de los basidiomas, sobre los de sustrato agotado. En la IEH, la mayor eficacia se obtuvo con B de Amecameca. El efecto larvicida, con mejores resultados a las 48 h, y una mayor eficacia tanto en B como en SA de Tenango.

Estos resultados aportan evidencia de que los metabolitos con actividad biológica tanto de los basidiomas de *P. ostreatus*, así como del sustrato agotado rico en micelio y algunos primordios del hongo, conservan sus propiedades nematocidas después de la digestión *in vitro*, mostrando eficacia tanto en la inhibición de la eclosión de huevos como en la mortalidad de larvas de NGI, representando altas potencialidades para el uso de basidiomas y sustratos agotados en el control biológico de los parásitos

Determinar *in vitro* las concentraciones óptimas, hará posible el realizar pruebas *in vivo* para promover un control sustentable de los parásitos y explorar en su caso las posibles vías de administración de los basidiomas o el sustrato agotado de este hongo, restringiendo el uso de los antihelmínticos comerciales a casos que requieran de tratamiento selectivo, contribuyendo no solo a mejorar la salud y bienestar de los ovinos y con ello, la productividad; sino reduciendo el impacto negativo que generan al ambiente, en particular a la salud del suelo como es el caso de las lactonas macrocíclicas.

Fin de la versión en español

- DOF (Octubre 16, 1995). Norma Oficial Mexicana NOM-024-ZOO-1995, Diario Oficial de la Federación. <https://tinyurl.com/2p94t2xj>
- Figuerola, C. J. A., Jasso, V. C., Liébano, H. E., Martínez, L. P. Rodríguez, V. R. I., & Zárate, R. J. J. (2015). Examen Coproparasitológico. En Rodríguez-Vivas, R. I. (Ed.). *Técnicas para el diagnóstico de parásitos con importancia en salud pública veterinaria* (pp. 78-128). AMPAVE-CONASA, México.
- González-Garduño, R., López-Arellano, M. E., Ojeda-Robertos, N., Liébano-Hernández, E., & Mendoza-de Gives, P. (2014). Diagnóstico *in vitro* y en campo de resistencia antihelmíntica en nematodos gastrointestinales de pequeños rumiantes. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 46(3), 399-405. <http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2014000300008>.
- Kaplan, R. M., Denwood, M. J., Nielsen, M. K., Thamsborg, S. M., Togerson, P. R., Gilleard, J. S., Dobson, R. J., Vercruysse, J., & Levecke, B. (2023). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) guideline for diagnosing anthelmintic resistance using the faecal egg count reduction test in ruminants, horses and swine. *Veterinary Parasitology*, 318, 109936. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2023.109936>.
- Liébano, H. E., López, A. M. E., Mendoza de G. P., & Aguilar, M. L. (2011). Manual de Diagnóstico para la identificación de larvas de nematodos gastrointestinales en rumiantes. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, México.
- López-Rojas, E., Martínez-García, C., & Plata-Reyes, D. (2024). Herramienta para la evaluación del desempeño agroecológico en sistemas de producción de leche en pequeña escala. *Revista Investigium IRE: Ciencias Sociales y Humanas*, 15(1), 148-163. <https://doi.org/10.15658/INVESTIGIUMIRE.241501.09>
- Magalhães de Matos, A. F. I., Trevisan, L., Giacometti, M., Martins, B. B., Correia, V. F. R., Roulim, S. D., & Gonzalez, M. S. (2020). Nematocidal effect of oyster culinary-medicinal mushroom *Pleurotus ostreatus* (Agaricomycetes) against *Haemonchus contortus*. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 22(11), 1089-1098. <http://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.2020036364>
- McKenna, P. (2006). A comparison of faecal egg count reduction test procedures. *New Zealand Veterinary Journal*, 54(4), 202-203. <http://doi.org/10.1080/00480169.2006.36697>
- Mondragón-Ancelmo, J., Olmedo-Juárez, A., Reyes-Guerrero, D. E., Ramírez-Vargas, G., Ariza-Román, A. E., López-Arellano, M. E., Mendoza-de Gives, P., & Napolitano. (2019). Detection of Gastrointestinal Nematode Populations Resistant to Albendazole and Ivermectin in Sheep. *Animal (Basel)*, 9(10), 775. <http://doi.org/10.3390/ani9100775>
- Ortiz, de M. C. M., Torres, A. J. F. J., Ojeda, R. N. F., González, R. L., & Muñoz, M. S. A. (2022). Manejo integrado de parásitos en pequeños rumiantes. *Bioagrociencias*, 15(2), 1-10. <http://doi.org/10.56369/BAC.4463>
- Páez-León, S. Y., González-Cortázar, M., Sánchez-Vázquez, J. E., Torres-Acosta, J. F. J., Téllez-Téllez, M. García-Flores, A., Castañeda-Ramírez, G. S., & Aguilar-Marcelino, L. (2022). Bio-directed chemical study of *Pleurotus ostreatus* spent substrate and its nematocidal activity. *Acta Parasitológica* 67(4),1603-1611. <http://doi.org/10.1007/s11686-022-00600-x>
- Pineda-Alegria, J. A., Sánchez-Vázquez, J. E., González-Cortazar, M., Zamilpa, A., López-Arellano, M. E., Cuevas-Padilla, E. J., Mendoza-De-Gives, P., & Aguilar-Marcelino, L. (2017). The Edible Mushroom *Pleurotus djamor* produces metabolites with lethal activity against the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Journal of Medicinal Food*, 20(12), 1184-1192. <https://doi.org/10.1089/jmf.2017.0031>
- Reyes-Guerrero, D. E., Olmedo-Juárez, A., & Mendoza-de Gives, P. (2021). Control and prevention of nematodiasis in small ruminants: background, challenges and outlook in Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 12(3), 186-204. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v12s3.5840>
- Rivero-Perez, N., Jaramillo-Colmenero, A., Peláez-Acero, A., Rivas-Jacobo, M., Ballesteros-Rodea, G., & Zaragoza-Bastida, A. (2019). Anthelmintic activity of *Leucaena leucocephala* pod on gastrointestinal nematodes of sheep (*in vitro*). *Abanico Veterinario*, 9(1). <https://doi.org/10.21929/abavet2019.95>
- Rodríguez, B. T. M. (2022). Evaluación *in vitro* del efecto letal en huevos y larvas (L3) de *Haemonchus contortus* de diez extractos hidroalcohólicos de diferentes mezclas de sustrato degradado de *Pleurotus ostreatus*. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. <https://riaa.uaem.mx/xmlui/handle/20.500.12055/2727>
- Sakamoto, Y. (2018). Influences of environmental factors on fruiting body induction, development and maturation in mushroom-forming fungi. *Fungal Biology Reviews*, 32(4),236-248. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2018.02.003>
- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., Mcallan, A. B., & France, J. (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*. 48(3-4), 185-197. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)90171-6](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90171-6)
- Toro, A., Rubilar, L., Palma, C., & Pérez, R (2014). Resistencia antihelmíntica en nematodos gastrointestinales de ovinos tratados con ivermectina y fenbendazol. *Archivos de Medicina Veterinaria* (Valdivia), 46(2), 247-252 <http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2014000200010>
- Valdez-Uriostegui, L. A., Sánchez-García, A. D., Zamilpa, A., Sánchez, J. E., González-Garduño, R., Mendoza-de Gives, P., Castañeda-Ramírez, G. S., González-Cortázar, M., & Aguilar-Marcelino, L. (2021). *In vitro* evaluation of hydroalcoholic extracts of mycelium, basidiomata and spent substrate of *Pleurotus ostreatus* against *Haemonchus contortus*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 24, ID 62: 1-10. <https://tinyurl.com/4tfrb9z7>
- Vázquez-Martínez, I., Jaramillo-Villanueva, J. L., Bustamante-González, A., Vargas-López, S., Calderón-Sánchez, F., Torres-Hernández, G., & Pittroff, W. (2018). Estructura y tipología de las unidades de producción ovinas en el centro de México. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*, 15(1), 85-97. <https://tinyurl.com/32yr84yp>