OFICINA DE PARTES - FIA
RECEPCIONADO
Fecha 02 ABR. 2007
Hora 11:10
N° Ingreso 1452

INFORME FINAL

Proyecto

"AISLAMIENTO Y EVALUACIÓN DE HONGOS NEMATÓFAGOS, PARA EL CONTROL DE PARÁSITOS GASTROINTESTINALES, EN SISTEMAS ORGÁNICOS DE PRODUCCIÓN DE CARNE OVINA EN MAGALLANES"

Código: BIOT- 01- P-20, Magallanes.

CENTRO DE EDUCACIÓN Y TECNOLOGÍA

AGENTES ASOCIADOS:

ESTANCIA JOSEFINA

I. ANTECEDENTES GENERALES

Nombre del Proyecto; Código; Región
"Aislamiento y evaluación de hongos nematófagos, para el control de parásitos gastrointestinales, en sistemas orgánicos de producción de carne ovina en Magallanes"

Código: BIOT- 01- P-20, Magallanes.
Fecha de aprobación o adjudicación; Noviembre 2002
Concurso de Innovación 2002

Agente Ejecutor y Asociados:

CENTRO DE EDUCACIÓN Y TECNOLOGÍA
Dirección : Nueva Amunátegui 1402 Oficina 402
Ciudad y Región: SANTIAGO METROPOLITANA
RUT :
Teléfono : 6979543 Fax y e-mail: 6974563 /admcet@terra.cl

AGENTES ASOCIADOS:

ESTANCIA JOSEFINA Esteban Vera Triviño, RUT: 1202561-O

Coordinador del Proyecto: Raúl Venegas Valdebenito
Costo Total:

Aporte del FIA (en pesos; porcentaje del costo total)

Período de Ejecución **20/12/01-29 /III/07**

II. RESUMEN EJECUTIVO

El proyecto tuvo como objetivo el aislamiento, identificación, evaluación y reproducción masiva del hongo nematófago *Arthrobotrys oligospora*. Inicialmente se había planteado el aislamiento de *Duddingtonia flagrans*, hongo que no apareció en los diversos aislados que se obtuvieron durante el periodo de trabajo. Estos organismos se aislaron inicialmente en la Estancia Josefina en la XII región desde sistemas de producción ovina en pastoreo, en particular de materia orgánica del campo y de heces fecales de ovinos. Se comprobó que estos controladores se encuentran en todos los sistemas de producción animal en pastoreo, como habitantes normales del suelo y materia orgánica en descomposición. Estos fueron seleccionados en relación a su capacidad de atravesar el tracto digestivo de rumiantes y ser depositados con las fecas sobre la pradera donde pueden actuar sobre larvas de tercer estado de nematodos parásitos de rumiantes. Estas cepas aisladas y seleccionadas fueron evaluadas tanto in vitro como in vivo permitiendo desarrollar un mecanismo de administración, bloques minerales, este posibilita su aporte con regularidad en la dieta de ovinos en pastoreo.

Se puede afirmar, que estos organismos nematófagos existen en Chile y pueden ser aislados, identificados y evaluados para su posterior utilización en el control biológico de parasitismos animales.

Para el Desarrollo del proyecto se estableció una alianza entre la Estancia Josefina, en la XII Región, y Corporación Centro de Educación y Tecnología. Al término del proyecto se estableció una unidad de réplica en el predio las Bandurrias ubicado en la localidad de Alcones VI región.

En el proyecto se aislaron e identificaron 18 cepas de *A. oligospora* con capacidad de control efectivo, presentes en los sistemas, y se evaluó la respuesta de los nematodos parásitos a la incorporación de estos microorganismos en la dieta animal, para finalmente desarrollar un prototipo semi industrial de

producción de Arthrobotrys. Este se evaluó en la última etapa del proyecto, en un sistema de producción intensiva de ovinos en la zona central.

Como producto de esta iniciativa de desarrollo tecnológico, se obtuvo una presentación en bloques minerales de 10 kilogramos de peso, a los que se les introdujo una cantidad proporcional del biocontrolador para permitir un consumo permanente por parte de los ovinos

Estos bloques corresponden a un sustrato o dispositivo sólido que se puede introducir en la dieta animal. Fue necesario desarrollar un método de secado que permite mantener las esporas de *A. oligospora* viables a través del tiempo e introducirlas en los dispositivos de aplicación, bloques o cápsulas, estas últimas se desarrollaron en conjunto con la facultad de Quimica y Farmacia la Universidad de Chile con el departamento de Tecnología Farmacéutica, en la ultima etapa del proyecto. Esta tecnología de administración del hongo nematófago se debe seguir evaluando dado que hasta el momento permiten un aporte de controladores sólo durante 35 días.

Las presentaciones desarrolladas, bloques de 20 y de 10 kgs., se probaron en su efecto sobre rebaños ovinos en pastoreo, tanto en la patagonia como en la zona central, estableciéndose niveles de control satisfactorios sobre larvas de tercer estado en la pradera.

III. TEXTO PRINCIPAL

1. Cumplimiento de los objetivos.

Objetivo General planteado en el proyecto original:

Aislamiento identificación, reproducción y evaluación de hongos nematófagos de los géneros *Duddingtonia* y *Arthrobotrys* para su uso en sistemas orgánicos de producción de carne ovina en Magallanes.

El objetivo general del proyecto se cumplió en el sentido de desarrollar un método de aislamiento reproducción y evaluación de hongos nematófagos en sistemas orgánicos de producción de carne ovina, lográndose obtener aislados de *A. oligospora* con capacidad de control de larvas en la pradera que presentaron hasta un **87,6%** de eficiencia.

Objetivos específicos:

1) Aislamiento e identificación de hongos nematófagos de los géneros *Duddingtonia* y *Arthrobotrys*, a partir de muestras fecales de ovinos en pastoreo, en Magallanes, mediante la utilización de nemátodos Entomopatógenos (Heterorhabditis y Steinernema) utilizados como trampa.

Este objetivo se cumplió aislándose e identificándose 18 cepas efectivas de *A. oligospora* con capacidad de control sobre larvas de tercer estado en la pradera. Sin embargo, la utilización de nemátodos entomopatógenos como trampas, fue modificada, y se sustituyó por el uso de larvas de nemátodos animales, provenientes de cultivos fecales, lo que facilitó la obtención de cantidad adecuada y constante de larvas en el tiempo.

2) Reproducción en sustratos sólidos de hongos nematófagos de los géneros *Duddingtonia* y *Arthrobotrys*.

Este objetivo se cumplió plenamente, lográndose reproducir el hongo nematófago sobre sustratos desarrollados en base a cereales, como avena y arroz estériles, alcanzándose concentraciones de 10^{10} esporas/g

3) Evaluación *in vitro* e *in vivo* del efecto de los procesos digestivos de ovinos,
sobre la viabilidad de las conidias de los géneros *Duddingtonia* y *Arthrobotrys*.

Se evaluaron in vitro conidias de *A. oligospora* determinándose cuales lograban el mayor nivel de eficiencia frente al método de Tilley Ferry.

Se evaluaron in vivo tanto las distintas cepas de *A. oligospora* determinándose cuales lograban el mayor nivel de eficiencia en su paso a través del sistema digestivo de ovinos como la capacidad de la esporas de resistir su introducción en dispositivos de administración, bloques y cápsulas así como la resistencia de estas ultimas, a la digestión ruminal.

4) Evaluación del efecto de los hongos nematófagos obtenidos, sobre las poblaciones de larvas de tercer estado de nemátodos, en la pradera y sobre la carga parasitaria de ovinos en Magallanes.
Este efecto se estableció tanto en Magallanes como en las unidades de réplica, en el Centro de Educación y Tecnología y en la empresa ganadera Bandurrias en la zona central.
El nivel de control alcanzado fue de hasta **un 87,6 %**

Estado del arte

Uso de hongos nematófagos en control biológico de parásitos en rumiantes.

El control de los nematodos parásitos ha dependido tradicionalmente del uso de drogas antihelmínticas que han mostrado eficacia y en muchos casos un efecto persistente por varias semanas lo que permite una mantención de los animales libres o con cargas parasitarias que no afecten la salud de los individuos permitiendo ganancias diarias de peso dentro de niveles económicos (Jackson, 1993. Sin embargo es de justicia agregar que estas drogas tienen un costo importante, no se producen en el país, son intensivos en uso de mano de obra durante su aplicación, requieren movimiento de los animales, implican riesgo para los consumidores (residuos) y existe también un riego ambiental (eco-toxicidad). Los problemas anteriores en general son vistos como menores, por productores y técnicos. La preocupación más importante tiene que ver con la resistencia paulatina que va apareciendo en diversas poblaciones de nematodos parásitos, a los antihelmínticos de mayor uso.

El manejo de poblaciones de nematodos resistentes, a los fármacos utilizados en su control, constituye el mayor desafío a los ganaderos y profesionales del sector pecuario en el presente siglo.

Después del uso intensivo de Benzimidazoles por más de 35 años, de levamisol por mas de 25 años y de avermectina, milbemicina por los últimos 15 años, la resistencia a los antihelmínticos había sido limitada a algunos pocos casos, sin embargo en el último tiempo crecientemente se informan casos de resistencia en parásitos de importancia pecuaria, como por ejemplo los trabajos de Waller, J.P. 1997 que encuentra más de un 80% de resistencia por parte de diversas poblaciones de nematodos parásitos a las drogas antiparasitarias como Bencimidazoles o Levamisol/Morantel; Navi Et.al 1996 en Uruguay ha encontrado un 1,2% de resistencia en el grupo de las lactonas macrociclicas, porcentaje bajo, sin embargo se está incrementando; Maciel et al 1996 en Paraguay encuentre que la resistencia a este grupo de drogas alcanza a un 70%;

Echevarria et al 1996 determinó un 20% de resistencia en Brasil; Eddí et al 1996 en Argentina identifico un 13% de resistencia a estas mismas drogas; Vermunt J.J. et al 1995 quien identificó una resistencia múltiple a Ivermectina y Oxfendazol en distintas especies de Cooperia en Nueva Zelanda. Este tipo de reporte realizado por parte de diversos investigadores esta impulsando crecientemente a una búsqueda de métodos biológicos de control parasitario. Estas iniciativas están reforzadas tanto por los problemas expuestos como por la aparición de un segmento del mercado de productos pecuarios, que presiona por alimentos de origen animal obtenidos bajo procedimientos orgánicos u ecológicos de producción, es decir sin uso de agentes químicos en el control de las diversas patologías del ganado o como estimulantes del desarrollo muscular de ellos.

CONTROL BIOLÓGICO DE NEMATODOS EN PRODUCCIÓN ANIMAL

En los últimos años ha existido un creciente interés y desarrollo en el área del control biológico aplicado de parásitos de animales, constituyendo un importante potencial en las estrategias sustentables de control de nemátodos en ganado. (Waller, 1997, Williams, 1997). El mecanismo para enfrentar este problema no sólo pasa por la restricción y uso adecuado de los antihelmínticos, sino también, por estrategias de manejo del pastoreo (Niezen, et al 1996; Barger, 1997) y uso preventivo de agentes de control biológico.

El control biológico puede ser empleado como una medida profiláctica constituyendo una alternativa al tradicional uso de productos químicos en el manejo de parásitos, esto mediante el uso de hongos atrapa nematodos o predatores que controlen las larvas de los parásitos en las praderas (Larsen, 1999).

El objetivo de emplear agentes de control biológico contra nemátodos parásitos de animales, es reducir de forma significativa el número de estados

infectivos disponibles, que son adquiridos por las distintas especies en pastoreo, manteniendo un adecuado balance entre el patógeno y el antagonista. Esta reducción de los estados infectivos en el estrato herbáceo puede subsecuentemente prevenir la carga parasitaria de nuevos hospederos. (Larsen, 1999). En contraste al control químico el cual esta dirigido completamente al estado parasítico dentro del hospedero, el control biológico está dirigido a los estados de vida libre en las praderas y pasturas. Dentro de este ambiente, los estados pre-parasíticos de nemátodos se encuentran sujetos a una variedad de factores tanto bióticos como abióticos que pueden influir en su desarrollo y sobrevivencia. Los factores abióticos mayor importancia son temperatura, oxígeno y humedad y condiciones extremas de éstos pueden ser letales para los estados de vida libre. En relación con los factores bióticos, existe un vasto ensamblaje de organismos vivos que pueden afectar el desarrollo de los estados infectivos de los parásitos en el sistema.(Waller, 1997).

Un número importante de organismos han sido identificados como enemigos naturales de estados libres de parásitos, los que son usados como fuentes alimenticias. Estos incluyen, microarthropodos, protozoos, virus, nemátodos predadores, bacterias y hongos nematófagos (Waller and Faedo,1996). De éstos, los últimos dos grupos han recibido la mayor atención e investigación como potenciales agentes de control.

BACTERIAS

Muchas especies de bacterias están asociadas con la cutícula, cavidad corporal y tracto digestivo de los nemátodos y algunas de ellas son patogénicas. *Bacillus penetrans* es un importante candidato para el control de nemátodos parásitos de plantas. Muchas bacterias y organismos estrechamente relacionados, los Actinomycetes, producen importantes metabolitos secundarios, que incluyen antibióticos, insecticidas y antihelmínticos (Mankau, 1980).

En particular *Bacillus thuringiensis*, ha resultado poseer un importante potencial como controlador de parásitos, señalando que sus toxinas pueden afectar estados de vida libre de algunos nematodos parásitos de ganado. Estudios mas detallados han señalado que huevos y larvas de *Trichostrongylus colubriformis* pueden ser destruidos por la toxina de *B. thuringiensis vár. israelensis* (Bone, et al. 1985; Bone, et al, 1987).

HONGOS

Hongos que exhiben propiedades anti-nemátodos han sido conocidos por largo tiempo. Ellos constituyen una gran variedad de especies (150 especies descritas) que incluyen hongos atrapa nemátodos u hongos predadores, hongos endoparasíticos, hongos que invaden huevos de nemátodos y hongos que producen metabolitos tóxicos para nemátodos (Barron, 1977).

Los hongos nematófagos son un grupo muy diverso, los cuales se alimentan de nematodos en el suelo. Ellos han sido usados con éxito en control de una variedad de nematodos parásitos de plantas (Kerry, 1980) y animales (Gronvol et al, 1989, Waller, 1993, Larsen et al, 1995).

En general estos hongos nematófagos pueden ser divididos en tres grandes grupos en base a modo de acción sobre los nemátodos (Gronvold et al, 1993; Waller, 1998; Yeates, 2000)

A) Hongos atrapa nemátodos; estos usan una variedad de órganos trampa para capturar los nemátodos, tales como anillos constrictivos (activos), o no constrictivos (pasivos), hifas pegajosas o adhesivas, protuberancias o redes adhesivas, las que se desarrollan en el sistema hifal vegetativo. La inducción de estas estructuras es estimulada por variadas señales externas secretadas por los nematodos, incluyendo péptidos, el contacto físico de la trampa con el nemátodo vivo y el nivel de nutrientes y composición del entorno ambiental. Dentro de un corto período de tiempo seguido a la captura y formación de las trampas, el

hongo penetra y destruye al nemátodo. Ejemplos de este tipo de hongos son; *Arthrobotrys spp, Dactylaria candida, Duddingtonia flagrans*)

B) Hongos endoparásitos; son parásitos obligados, infectan nemátodos por medio de esporas, las que son ingeridas o se adhieren a la cutícula a través de la que penetran. Posteriormente, éstas se desarrollan en un talo infectivo que absorbe el contenido del nemátodo. Estos hongos no desarrollan hifas fuera del cuerpo del hospedero, excepto hifas fértiles, como conidióforos que liberan las esporas, (por ejemplo, *Harposporium anguillulae*)

C) Hongos parásitos de quistes y nematodos de root-knot. Estos invaden huevos y hembras por medio de hifas vegetativas (por ejemplo, *Vertcillium chlamydosporium*)

Los primeros dos grupos son los más importantes como controladores, encontrándolos en todos los ambientes a nivel mundial, pero son particularmente abundantes en suelos agrícolas ricos (Jaffee, et al. 1998).

ECOLOGÍA DE LOS HONGOS NEMATÓFAGOS

Los hongos nematófagos son un grupo taxonómicamente diverso que utiliza nemátodos como fuentes de energía. Son hongos ubicuos y comúnmente son encontrados en material en descomposición, fecas y suelo. La temperatura óptima para el crecimiento de muchos de estos hongos se ha encontrado entre los 20° a 25°C (Gronvold, et al, 1993).

La distribución de los hongos dentro del suelo, varía de acuerdo a su mecanismo de trampa y en cierto grado al tipo de suelo. Gray (1985) encontró que hongos nematófagos que producen anillos trampa, estaban asociados a suelos

con alta humedad y alto contenido de materia orgánica. En contraste, hongos que producen redes adhesivas fueron asociados a suelos con baja humedad y materia orgánica. En relación con los nemátodos productores de anillos constrictivos, Cooke, (1968) encontró que presentan una tasa menor de crecimiento que los que producen redes. Persmark et al,(1996) encontró que tal situación tendría relación con variaciones estaciónales tanto de los nemátodos como de los hongos controladores, así como los contenidos de materia orgánica, ya que tanto la formación de micelio como la formación de estructuras trampas, requieren de energía, la que puede ser rápidamente suplida por una rápida disponibilidad de nutrientes. En consecuencia, la adición de enmiendas orgánicas al suelo, es usualmente seguida por una mayor actividad de hongos atrapa nemátodos. Jeffee, et al, (1998; 2004) al comparar sistemas de producción orgánica con sistemas convencionales, estableció que el número de especies de hongos atrapa nemátodos, así como la biomasa microbiana era significativamente mayor en los sistemas orgánicos que en los convencionales.

En general las diferencias observadas por los diferentes investigadores, en relación al comportamiento y capacidad predadora de los diversos hongos nematófagos, tanto dentro de una misma especie o género, indican la existencia de una variabilidad en la habilidad predadora que pueden variar en relación a los diferentes nichos ecológicos donde éstos se desarrollan (Graminha et al, 2005).

Estudios recientes han demostrado que todos los tipos de hongos nematófagos (endoparásitos y predadores) rápidamente invaden las fecas cuando son depositadas en el suelo. Sin embargo, no todos los tipos de hongos presentes en las praderas pueden ser consumidos y pasar a las fecas de los animales en pastoreo, esto debido a que muchos son extremadamente susceptibles a la destrucción por variadas condiciones presentes en el tracto digestivo (Araujo et al, 1999). Las especies de hongos que producen redes atrapa nematodos adhesivas, frecuentemente producen una gran cantidad de conidias y/o esporas resistentes (clamidosporas) las cuales tienen una mayor probabilidad de ser

ingeridos por los animales en pastoreo y subsecuentemente sobrevivir el paso a través del tracto gastrointestinal de estos animales, situación altamente ventajosa, en comparación a aquellos hongos que producen menos esporas, que se dispersan solo mediante una estrecha asociación con el nemátodos infectado y carecen de esporas resistentes. Probablemente, el factor más importante, es la producción de un gran número de clamidosporas resistentes, lo que determinaría su éxito y sobrevivencia a través del tracto digestivo de los animales (Gronvold, et al, 1993; Larsen, et al, 1994; Faedo, et al, 1998; Larsen, 1999; Araújo et al, 1999).

La práctica más usada en el control de nemátodos parásitos de animales es la administración oral de material fúngico, incorporándolo directamente en el alimento, o mezclado con melaza o incorporado en el agua de beber (Manueli, 1998; Waller, 1998; Araújo et al, 1999) Después este material pasa a través del tracto gastrointestinal de los animales y es eliminado al medio ambiente, junto con los huevos de los parásitos en las fecas frescas, el material fecal es colonizado por estos hongos y al entrar en contacto con las larvas recién eclosionadas, promueven la producción de trampas, capturando y matando estos estados infectivos de los nemátodos (Araujo et al, 1999). En consecuencia la real potencialidad de un candidato de control de nemátodos parásitos está dada por varias características, formación de estructuras resistentes, sobrevivencia de éstas a las condiciones del tracto digestivo (actividad enzimática, pH, anaerobiosis), viabilidad y acción depredadora de los estados infectivos en el medio, fecas y estrato herbáceo (Waller, 1998; Araujo et al, 1999, Larsen, 1999)

IDENTIFICACIÓN

Los hongos atrapa-nemátodos comprenden un vasto grupo de unas 150 especies descritas, pertenecen a la Clase: Hyphomycetes, con numerosos géneros, de los cuales, seis son los de mayor investigación en control de parásitos:

Duddingtonia, *Arthrobotrys*, *Dactylella*, *Geniculifera*, *Monacrosporium*, *Nematoctonus*. (Liou and Tzean, 1997).

Existe variadas técnicas para el aislamiento de hongos endoparásitos y predatores

(Persmark et al, 1992). Pero la más ampliamente usada es la descrita por Larsen et al, (1991). Consiste en tomar muestras fecales o de suelo, que son mezcladas con agar agua y antibióticos para inhibir el crecimiento bacteriano y sobre este medio se inoculan nematodos que actuarán como señuelo, puede ser un cultivo puro de algún nemátodo del suelo, o larvas de tercer estado de nemátodos parásitos. El uso de nemátodos del suelo como cebos, junto con estimular la actividad de los hongos atrapa nemátodos, también, estimula la actividad de los hongos endoparásitos. En cambio, si se emplean larvas de nemátodos de tercer estado como cebos, por ejemplo nematodos entomopatógenos, sólo los hongos formadores de trampas, los predadores pueden ser estimulados y atrapados.

Aun cuando los nemátodos entomopatógenos son patógenos obligados de insectos en la naturaleza, ellos son altamente susceptibles a hongos atrapa nematodos, debidos a que su estado juvenil infectivo se produce fuera del hospedero, en el suelo, donde puede persistir hasta encontrar un nuevo hospedero. Además estos nemátodos son muy activos y de larga vida, requisito importante ya que se requiere que estén vivos durante todo el período de observación (generalmente3- 4 semanas) y en ciertas oportunidades se necesita una re-colonización de nemátodos para obtener un mayor estímulo de los hongos (Jaffee, et al, 1996; Koppenhöfer, et al, 1997;)

Una vez realizada una observación positiva de un hongo nematófago, lo siguiente es tener un cultivo puro del hongo, para el desarrollo e identificación de conidióforos y conidias. En el caso de los hongos endoparásitos, estos no producen conidióforos y conidias sobre la superficie del agar, por lo tanto con este método no es posible su aislamiento. (Larsen and Faedo, 1998)

La identificación de los hongos atrapa nemátodos se puede realizar directamente de los cultivos puros. Para su identificación se emplean sus características más importantes como son: morfología de los conidióforos y conidias; la presencia y/o ausencia de clamidosporas, que es usado como carácter secundario, debido a que estas estructuras se ven afectadas por los tipos de medios y temperaturas.(Cooke & Godfrey, 1964; Barron, 1977).

USO DE HONGOS NEMATÓFAGOS EN EL CONTROL DE NEMATODOS

Existen numerosas evidencias que indican que bajo condiciones naturales o en especies de animales experimentales, los hongos nematófagos constituyen buenos agentes de control biológico. Se ha demostrado que prácticamente todos los nematodos parásitos importantes de las diferentes especies de ganado pueden ser exitosamente controlados (Larsen, 1999).

El análisis de fecas frescas de vacunos, ovejas y caballos, han mostrado una excreción natural de esporas de hongos nematófagos. La vasta mayoría de los hongos encontrados pertenecen al grupo de los predadores y formadores de redes adhesivas (Larsen et al, 1994; Padilha et al, 1998).

Numerosos aislados de hongos atrapa nemátodos han sido evaluados y seleccionados de acuerdo a su capacidad controladora de los estados de vida libre de nemátodos parásitos de animales, los resultados indican tres principales géneros de hongos nematófagos, *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* y *Monacrosporium*. De éstos, el primero es el más numeroso, con ocho especies formadoras de redes adhesivas y dos con anillos o protuberancias adhesivas. *Monacrosporium* cuenta con dos especies formadoras de redes y cinco elaboradoras de anillos, protuberancias o columnas adhesivas. *Duddingtonia* es un género

monoespecífico, con la especie *D. flagrans* formadora de redes adhesivas de hifas tridimensionales, además produce gran cantidad de esporas de pared resistente (clamidosporas) (Liou and Tzean, 1997).

Existen variados factores como niveles de nutrientes, temperatura y densidad de larvas L3 que afectan la acción y producción de estructuras trampas en estos hongos nematófagos *A. oligospora*, *D. flagrans* y *M megalosporum* . Los tres factores afectan significativamente el número de larvas atrapadas por *A. oligospora* y *M megalosporum*. Concentraciones decrecientes de nutrientes resultan en un incremento en la producción de trampas y captura por estos dos hongos, pero la disponibilidad de nutrientes no afecta a *D. flagrans*. Los tres hongos tienen similares respuestas a las temperaturas, con un aumento en la formación de estructuras y captura de nemátodos, en sus correspondientes temperaturas óptimas de crecimiento, *A. oligospora* (20°-25°C), *M. megalosporum* (25°-28°C) y *D. flagrans* (25°-33°C). Así también, los tres son denso dependientes de la densidad de larvas en relación al porcentaje de captura de larvas, encontrando una efecto mayor en *D. flagrans* que en *M. megalosporum* y significativamente menor en *A. oligospora*. (Morgan et al, 1997).

Tales comportamientos son relevantes en la elección de hongos como agentes de control biológico, ya que diferentes hongos se comportan mejor bajo diferentes condiciones ambiéntales. Esto también indica que el hecho que se utilicen los mismos mecanismos para atrapar nemátodos, no necesariamente los mismos factores serán importantes para cada hongo. La formación de trampas es una respuesta compleja a las necesidades individuales de cada hongo, más que a la simple respuesta de estímulos exógenos. Cada hongo puede tener su propio set de condiciones ambientales bajo las cuales se comporta eficientemente como controlador. En consecuencia es importante aislar hongos nematófagos de diferentes zonas, donde están adaptados a ciertas condiciones o nichos ecológico, de manera de poder definir a través de ensayos cual de estos aislados es el mas

adecuado para utilizar como agente de control biológico, bajo determinadas condiciones naturales (Larsen et al, 1991; Araujo et al, 1999).

Numerosos estudios han determinado la capacidad de diferentes especies de hongos atrapa nemátodos en su interacción y capacidad de atrapar varios parásitos gastrointestinales de ganado, tanto en ensayos in vitro, en agar y fecas, como in vivo en animales en pastoreo

Se han realizado ensayos con *A. oligospora*, hongo que crece saprofiticamente, produciendo abundante micelio vegetativo, poniéndolo en contacto con nemátodos cebo, obteniéndose luego de seis horas la formación de órganos trampa, redes adhesivas. Conjuntamente se evaluó la capacidad de este hongo de inducir estas estructuras en presencia de larvas L3 de *C. oncophora, Dictyocaulus viviparus, C. curticei, Haemonchus contortus, Cyathostomaa spp, Oesphagostomum dentatum* y *Nematospiroides dubius*. Los resultados sugieren que los nemátodos con alta movilidad son los más eficientes en la inducción de órganos atrapadores (Nansen, et al, 1996). Razón por la que nemátodos entomopatógenos de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* son utilizados como trampas y forma de incrementar la posibilidad de atrapar hongos nematófagos, y en particular predadores. (Jaffee et al, 1998, Koppenhöfer et al, 1997)

La captura de nemátodos por las hifas que forman las redes, es seguida por la penetración de la cutícula de los nemátodos, después de una hora, formando un bulbo infectivo en el interior del nemátodo, produciéndose un abundante crecimiento de hifas que terminan cubriendo el cuerpo del nemátodo. Una vez producida la penetración del hongo, los movimientos del nemátodo son inhibidos, producto de la liberación de nematoxínas de *A. oligospora* (Larsen et al, 1991, 1992).

La posibilidad de evaluar este hongo en el control de estados pre-parasíticos de *Ostertagia ostertagi* y *Cooperia oncophora* en fecas de ganado, mezclando directamente el hongo con las fecas, indicó que se requiere de una concentración de por lo menos 250 conidias de *A. oligospora* por gramo de fecas para reducir de forma significativa el número de larvas parásitas (Gronvold, et al, 1985). Aplicaciones de *A. oligospora*, reproducido en granos partidos de maíz, en ensayos con fecas en pradera, resultaron en un 86% de reducción de larvas L3 de *C. oncophora* en el estrato herbáceo que rodeaba a las fecas, en comparación con el número de larvas colectadas en la hierba próxima a fecas sin el hongo (Gronvold, et al, 1989).

El efecto de introducir hongos atrapa nemátodos en las fecas frescas, a través de la incorporación en la alimentación de los animales de material fúngico, ha sido ampliamente investigado. En Rusia, se mostró que cepas locales de *A. oligospora* son capaces de crecer y atrapar nemátodos después de atravesar el tracto gastrointestinal de asnos (Soprunov, 1958). Estudios en Francia proveen resultados diferentes, señalando que *A. oligospora* y *Dactylella bembicoides* son destruidas en el tracto alimentario tanto en caballos como cerdos. Sin embargo, *Dactylaria candida*, *Arthobotrys musiformis*, *A. tortor* (Gronvold, et al, 1985) y *Duddingtonia flagrans* (Larsen, et al 1995, Gronvold, et al, 2000) sobreviven el paso a través del tracto gastrointestinal de ovejas y cabras. En otros trabajos se ha indicado que *A oligospora* no sobrevive el paso en vacunos, cabras y cerdos, e incluso intentando recubrir o proteger el hongo durante su paso digestivo, los que no ha dado buenos resultados. Situación que han motivado a la búsqueda de nuevos y mejores hongos (Larsen et al, 1991, 1992).

El efecto de dos aislados de *D. flagrans* en la reducción de larvas de estados libres de *Dictyocaulus viviparos* en bovino, fue registrado in vitro, donde ambos aislados reducen significativamente el número de estados infectivos en cultivos fecales con dos dosis de clamidosporas por gramo de fecas, 6250 y

12500 clamidosporas/gramo. Pero, al evaluar su acción sobre *O. ostertagi* y *C. oncophora*, uno de los aislados exhibió una mayor capacidad reductora de las larvas, incluso con la dosis más baja de clamidosporas (Fernández, et al, 1999).

Clamidosporas de *D. flagrans*, en suspensión a una concentración de 10^6 clamidosporas/ml , se administraron a muestras fecales de ganado bovino infectadas con *D. viviparus*, cada muestra fecal recibió 10 ml de la suspensión del hongo, lo que significó en aproximadamente 50000 clamidosporas/gramo, produciendo una significativa reducción del número de larvas infectiva, 86%, en comparación con el control, sin clamidosporas (Henriksen et al, 1997).

La habilidad de dos especies de hongos nematófagos *Arthobotrys oligospora* y *Duddingtoniaa flagrans* para control del desarrollo de larvas infectivas en fecas de caballos infectados naturalmente, a las que se les adicionó un número conocidos de esporas por huevo de parásito. El porcentaje de reducción de larvas infectivas a una concentración de 1 espora por huevo fue de 40,55% y 31,1%, mientras que a 100 esporas por huevo resulto en 95,8% y 93,9% de reducción para *A. oligospora* y *D. flagrans*, respectivamente. (Bird and Herd, 1995).

En ovejas, hongos nematófagos han sido aislados de fecas frescas (Larsen et al, 1994). Varios experimentos han confirmado que sólo un número limitado de especies de hongos, pueden sobrevivir el paso a través del tracto digestivo, en número suficiente, capaz de reducir el número de larvas parásitos (Larsen et al, 1994, Waller et al, 1994, Larsen et al, 1996; Waller et al, 1998, Larsen, 1999).

Waller, et al. (1994) demostró que sólo especies de hongos de los géneros *Arthrobotrys* y *Duddingtonia*, formadores de redes adhesivas, poseían la capacidad de resistir el paso digestivo, en ovejas, cuando eran alimentados oralmente con los hongos.

Evaluaciones realizadas en relación al control de larvas infectivas a nivel fecal en ovinos, a los que se les suministró diferentes dosis de *D. flagrans* en la

dieta, señalan que dosis altas de $5x10^5$ esporas/Kg peso logran un rango de reducción de 82,8 a 99,7% de larvas fecales (Peña et al, 2002)

Estudio de dos especies de *Arthrobotrys* aisladas de ovejas y terneros, además capaces de sobrevivir el paso digestivo *A. musiformis* y *A. cladodes*. La primera fue colectada al 3 y 4 día en terneros, después de consumir el hongo en granos de maíz, reduciendo el número de estados infectivos en cultivos de fecas en un 99%. *A. cladodes*, consumido como suspensión de conidias (23 millones y 150 millones), fueron colectadas en las fecas después de 20 horas de ser ingerido, pero resultaron ser menos exitosas en reducir el número de larvas (Padilha, 1998).

Larsen, et al (1991), demostraron que la incubación en el fluido ruminal reduce la sobrevivencia fúngica. Sin embargo, un rango de aislados de hongos atrapa nemátodos de suelos y compost son capaces de sobrevivir estas condiciones que simulan el paso gastrointestinal de ganado. Diez de estos aislados fueron dados a terneros para evaluar su sobrevivencia y comportamiento después de su paso por el tracto digestivo (Larsen, et al,1992) Tres aislados fueron seleccionados para un ensayo, uno *A. oligospora* y dos *D. flagrans*, se cultivaron en granos de cebada y se dieron a terneros, las fecas de éstos y de los animales control, sin el hongo, se depositaron en la pradera con un número comparable de huevos de parásitos. El aislado de *A. oligospora*, no mostró un efecto significativo, en cambio los dos aislados de *D. flagrans* fueron altamente efectivos, resultando en un 74 a 85% de reducción de larvas de *O. ostertagi* transmitidas al estrato herbáceo desde las fecas provenientes de animales tratados con estos dos hongos.

En experimentos in vivo se probaron seis aislados de hongos atrapa nemátodos, de los géneros *Arthrobotrys* y tres *Monacrosporium* en su capacidad de pasar a través del tracto gastrointestinal de terneros y atrapar los estados infectivos del parásito *Haemonchus placei* Luego de administrar oralmente las

conidias y micelio de los aislados a los animales, se determinó que tres aislados de *Arthrobotrys* y uno de *Monacrosporium*, pasan el tracto gastrointestinal, demostrando además su viabilidad de atrapar las larvas infectivas de *H. placei*. Colectando los hongos nematófagos en las fecas, después de 15 a 110 hora, luego de su administración oral. (Araujo et al, 1999). Waller et al, (1994) demostró que el tiempo promedio usado en el paso de las conidias a través del sistemas digestivo de bovinos después de la administración oral es de 24 horas.

En otro ensayo Gronvold, et al, (1989), usó dos grupos de fecas provenientes de terneros, ambas con la misma cantidad de huevos de *Ostertagia ostertagi*, a uno de los grupos se le agregó 0,25 gramos de micelio de *A. oligospora* por kilogramo de fecas y el otro sin tratamiento, control. Ambos grupos se depositaron en dos comparables sistemas de praderas. Subsecuentemente, dos grupos iguales de terneros fueron puestas a pastorear en cada sector por un período de dos meses al final del cual, el número de larvas L3 *O. ostertagi* en las fecas inoculadas con el hongo, se redujeron en promedio en un 42% y las larvas infectivas en las hierbas en alrededor de un 50 a 71%, comparado con las fecas y hierbas de las pradera en los bloques no tratados. Al final del período de pastoreo, las vacas de los bloques con fecas inoculadas habían adquirido un 37% menos de parásitos que los animales de los bloques control.

Variados trabajos en el uso de hongos nematófagos para reducir los estados infectivos en praderas y como una posibilidad de control a la resistencia de nematodos se han realizado en Brasil. Numerosas especies de hongos atrapa nematodos han sido aisladas e identificadas de fecas de ovejas y terneros, de ellas 10 aislados de los géneros *Arthrobotrys, Monacrosporium, Harposporium* y *Dactylaria*, fueron seleccionadas en su capacidad de sobrevivir el tracto gastrointestinal (Padilha, 1998). Bioensayos in vitro, para evaluar el control de larvas de *Trichostrogilous* en fecas de ovejas y terneros, indican que adicionando

300000 conidias por gramo de fecas provoca una reducción de 99,5% de larvas de *Trichostrongilus* comparadas con el grupo control (Charles et al. 1996).

Estudios posteriores señalan a *D. flagrans* es el controlador más eficiente, en el sentido que cumple una serie de requerimientos, las esporas no germinan en el animal y no tiene efectos negativos en los animales después de su ingesta y las esporas ingeridas en este caso, por caballos, dos veces al día y mezcladas con granos de cebada, atraviesan el tracto digestivo controlando con gran eficiencia, en promedio, 88% del número de larvas L3 de cyathostomas en praderas, además de mantener su actividad en el tiempo (Klei and Baudena, 1999).

Este hongo puede ser cultivado en sustratos sólidos apropiados, de donde se extraen las clamidosporas y se les da a ingerir a ovejas, novillos, caballos y otros animales, pasando el tracto intestinal y germinando en las fecas depositadas (Larsen and Faedo, 1998)

Ensayos con *D. flagrans*, reproducido en cebada, fueron ofrecidos a un grupo de terneros en pastoreo durante sus dos primeros meses de pastoreo, Otro grupo de similares características, se les dio cebada pero sin el hongo. Ambos grupos fueron infectados con parásitos durante sus dos meses de pastoreo. El promedio de larvas infectivas en el estrato herbáceo de la pradera se redujo en un 66% en la pradera con animales tratados con *D. flagrans*. Además de una reducción de un 54% de los huevos fecales en este grupo y al final del ensayo, el peso promedio de estos animales fue 23 Kg. más alto que el peso promedio de los animales del grupo control (Gronvol et al, 1993).

Similares resultados fueron obtenidos en la reducción de huevos a nivel fecal y ganancia de peso en ovejas merino, a las que se les suministro 10^7 clamidosporas por peso animal, mezcladas con 200 gramos de avena por un periodo de 6 meses (Knox and Faedo, 2001)

D. flagrans fue ensayada in vivo en ovejas para determinar su capacidad de sobrevivencia a través del tracto gastrointestinal. El hongo fue aislado de las fecas frescas y luego fue reproducido y administrado en dosis de 5 x10^5 y 10^6 clamidosporas/dia resultando en un 80% de reducción del número de larvas infectivas de *Trichostrongylus colubriformis* en fecas (Larsen, et al, 1998).

Baudena, et al, (2000) determinó la eficiencia de *D. flagrans* en la reducción de larvas de cyastostomas en la pradera, dando a ingerir a los animales, diariamente y por cuatro dias el hongo, en dosis de 10^6 esporas por kg $^{-1}$ del animal. Dosis efectiva en ensayos con ganado y caballos (Larsen et al, 1995; Nansen et al, 1995; Fernández et al, 1999). Determinando una reducción significativa de larvas L3 en la pradera (66-99%).

En México, aislados de *D. flagran* y *Arthrobotrys*, resistentes al paso digestivo de animales, fueron evaluados en ovejas infectadas con *H. contortus*, dándoles a ingerir los hongos en una suspensión acuosa de conidias, las que redujeron significativamente el porcentaje de larvas en fecas comparadas con el grupo control sin hongos (Mendoza et al, 1996, Llerandi y Mendoza, 1997).

D. flagrans reduce la población de larvas infectivas de *Trichostrongylus colubriformis* en ovejas en pastoreo, luego de pasar por el tracto digestivo. Ovejas Merino fueron inoculadas con clamidosporas del hongo, vía infusión intra-ruminal a una tasa de 5 millones de clamidosporas/oveja/día y las fecas luego fueron colectadas y depositadas en la pradera. El número de larvas colectadas de las fecas y pasto fue significativamente menor que en control sin el hongo (Faedo, 1998).

Un estudio de cerdos criados en praderas e infectados con *Oesophagostomum dentatum* y *Hyostrongylus rubidus* y alimentados con una dosis diaria de *D. flagrans* por dos meses provocan una disminución significativa de ambas especies de parásitos en sus estados infectivos en el estrato herbáceo (Nansen, et al, 1996).

En Fiji algunos trabajos con ovejas indican que suplementar ovejas en pastoreo con clamidosporas de *D. flagrans* pueden proveer control de *H.contortus* y otros importantes nematodos parásitos (Manueli, 1998). Conjuntamente el uso de modelos matemáticos para el control biológico de larvas en ovejas, sugieren que una reducción de un 75% de larvas en el campo por al menos 60 días puede proveer igual o mejor control que dosis convencionales de antihelmínticos (Barnes et al, 1995).

Corderos mestizos Dorset parasitados naturalmente, recibieron *D. flagrans* (10^6 clamidosporas/kg/cordero/día) mezclado con cebada, el grupo control de corderos sólo recibió cebada, durante 4 meses. El desarrollo de larvas de *Ostertagia/Trichostrongylus* spp en cultivo fecal fue de 1-28% en el grupo alimentado con hongo, comparado con 60 a 80% en el grupo control. En la pradera, el recuento de larvas de *Ostertagia/Trichostrongylus* spp fue de 930 y 4400 L3/kg en empastadas en el grupo alimentado con hongo y sin él respectivamente. Para *Nematodirus* spp los valores fueron 7200 y 11600 L3/kg, respectivamente. Conjuntamente el número de *Ostertagia* spp fue 62% menos en el grupo con el hongo comparado al grupo no tratado. Luego fuero introducidos corderos trazadores en cada sector del ensayo por 3 semanas. La carga parasitaria de los animales trazadores en el sector donde estaban los corderos alimentados con el hongo, fue reducida en un 86% comparado con el grupo control, de igual manera se observó una reducción en el conteo abomasal de parásitos. Concluyendo que dosis de *D. flagrans* en ovejas en pastoreo pueden limitar la contaminación de la pradera y la carga parasitaria de los animales (Gihliga, 1997).

Evaluaciones sobre el comportamiento de los hongos nematófagos incorporados en dispositivos de administración, como bloques minerales y cápsulas de digestión lenta, para el control de estados infectivos de larvas de nemátodos parásitos en ovejas, los indican como una posibilidad para el desarrollo de una metodología de control biológico de parásitos animales (Waller et al, 2001 a,b).

Los diversos antecedentes e investigaciones realizadas, sustentan el uso de hongos nematófagos como agentes de control biológico de los principales nemátodos parásitos de animales. La utilización de tales agentes de control, si bien pueden operar sobre un amplio rango de condiciones, es necesario conocer y evaluar aquellos factores o requerimientos biológicos y ambientales que determinan su comportamiento óptimo como controladores tanto a nivel experimental como productivo.

2. **Aspectos metodológicos del proyecto:**

Descripción de la metodología efectivamente utilizada.

1- Aislamiento de hongos atrapa nemátodos

En las zonas donde se realizó el proyecto, Estancia Josefina en Punta Arenas y la unidad experimental en el centro experimental de la Corporación CET en Colina, se realizaron análisis de muestras fecales de ovinos, necesarios para aislar y caracterizar los hongos nematófagos encontrados en estas zonas agroecológicas. En la central demostrativa de Colina se introdujeron 7 ovejas con el proyecto y se completó un rebaño de 10 ovinos en pastoreo para obtención de fecas y de líquido ruminal, este último para la realización del método de Tilley Terry, con el que se evaluó in vitro la resistencia de las esporas de *A. oligospora* a la fermentación ruminal y gástrica en rumiantes.

1.0 Definición de las áreas donde se efectuaron las colectas de material fecal, para aislamiento de los hongos. Los lugares donde se obtuvieron las muestras fueron zonas de pastoreo y de dormidero de los rebaños utilizados en la temporada en que se realizó el estudio, de esta manera de colectaron fecas frescas y representativas del estado coproparasitario de los animales.

1.1 Obtención de muestras fecales

Se tomaron muestras fecales de animales de los predios en estudio, de acuerdo a la metodología descrita por Larsen et al, (1994). Estas muestras fueron colectadas mensualmente de animales (ovinos) sin tratamientos antiparasitarios y consistieron en muestras compuestas de fecas frescas, réctales, las que se guardaron en bolsas de polipropileno a 4°C hasta su uso. Esta actividad se realizó durante las 4 estaciones del año

1.2 Aislamiento de larvas de nematodos: En reemplazo del método propuesto originalmente, de reproducción de *Galleria melonella* (L), lepidóptero hospedero para el aislamiento y reproducción de nemátodos entomopatógenos, los que actuarían como cebo para hongos nematófagos. Se desarrolló un sistema para la obtención de larvas de nematodos animales que permitió la obtención masiva de ellas. El método consistió en la incubación, por una semana a 28°C de fecas réctales de bovinos parasitados, de manera de obtener larvas por la eclosión de los huevos presentes en el contenido fecal. Una vez que las larvas inician su eclosión se toman fracciones de 10 gramos de fecas y se depositan sobre vidrio reloj invertido, cubierto por papel filtro, el que se introduce en una placa petri con agua estéril, las larvas migran activamente desde las fecas al agua siguiendo el gradiente de humedad, Diariamente se retiran las larvas y se depositan en vaso precipitado y se mantienen en refrigeración hasta su uso.

1.4 Aislamiento de Hongos Nematófagos predatores de cada localidad.

Los hongos nematófagos se obtuvieron por medio del contacto de las larvas de nemátodos (cebos) con cultivo agar-fecas. De acuerdo a la metodología descrita por Araujo et al, (1999) y Larsen et al, (1994)

Para cada una de las localidades donde se realizó el proyecto, se tomaron submuestras fecales (1-3gr) de las muestras previamente colectadas y almacenadas en frío, se molieron en un mortero de loza y se depositaron sobre

agar agua al 2% más 0,02% de tetraciclina (w/v) para suprimir el crecimiento bacteriano (El agar se esterilizó a 120°C por 15 minutos). Sobre este medio con fecas se agregaron las larvas de nemátodos, en número de 1000 L3 en suspensión de agua destilada, de acuerdo a lo indicado por Jaffee et al, (1996) y se incubaron por unas 15 días a 20-25°C, evaluando semanalmente las placas en estéreo microscopio a 65x - 200x de aumento, si se observaba un bajo número de nemátodos atrapados o baja producción de conidióforos, se reinfestaba nuevamente el medio con nemátodos. Los aislados de los hongos obtenidos se hacen crecer en placas con CMA (agar harina de maíz) y se incuban a 25°C por 10 días. Esta actividad se realizó permanentemente durante todo el proyecto

1.5 Identificación de los hongos atrapa nemátodos

Los hongos nematófagos de cada localidad fueron detectados por sus características morfológicas, conidióforos, conidias y estructuras trampa, los conidios se transfirieron a un medio de cultivo agar harina de maíz y se incubaron a 25°C, para luego identificarlos en base a claves (Cooke & Godfrey, 1964, Barron, 1977; Rubner, 1996). Los diferentes aislados se mantuvieron en tubos de agar dextrosa (2%PDA) a 4°C en oscuridad. La clasificaciones sistemáticas definitivas se realizaron en el Departamento de Micología de la Facultad de de Medicina de la Universidad de Valparaíso

1.6 Evaluación in vitro de la actividad predadora de los hongos nematófagos sobre larvas de nematodos.

Los diferentes hongos nematófagos aislados a partir del punto 1.4 y sembrados en placa petri con CMA, son puestos en contacto con 1000 larvas de nemátodos L3, las que previamente son lavadas y centrifugadas por 3 min. a 1000rmp. Las placas fueron incubadas a 25°C y cada 24 horas fueron observadas bajo lupa y el

número de nematodos vivos contabilizados. Se realizaron tres réplicas para cada aislado y los datos evaluados por análisis de varianza.

2 Reproducción masiva de los aislados de hongos depredadores

La producción masiva de los diferentes hongos predadores aislados, se realizó en sustratos estériles de cereales. Esto permitió contar con cantidades de material fúngico, necesarios para los ensayos a nivel de campo.

2.0 La reproducción masiva del material fúngico se realizó siguiendo la metodología de Gronvold et al, (1993) Esta puede realizarse en varios tipos de sustratos como avena, cebada, arroz o maíz, los que se humedecieron con agua y se esterilizaron a 120°C por 45 minutos, luego se sembró sobre el sustrato el hongo, proveniente de un cultivo puro en agar. Se incubó por 2 a 4 semanas a 20-30°C. Al final de la incubación se determinó la presencia de clamidosporas o de conidias mediante su recuento en hemocitómetro.

2.1 Control de calidad del biopreparado

El control de calidad del biopreparado se realizó en cada uno de los aislados de hongos, para lograr una estandarización del producto antes de usarlo a nivel de campo

2.1.1 Determinación de pureza.

Se observó permanentemente la totalidad de la producción para la detección de agentes contaminantes, principalmente otros hongos. Conjuntamente se evaluó el 2% de cada producción y aislado para sembrarlo directamente en agar papa dextrosa, se incubaron a 25°C y se observó la presencia de contaminantes.

2.1.2 Determinación de concentración de conidias.

Del 2% de la producción y de cada aislado de tomaron muestras del sustrato con el hongo, se molieron y se homogenizaron. Se pesó un gramo de la muestra y se suspendió en 10 ml de agua destilada estéril, se dejó reposar por una hora. Luego se agitó y de dejó reposar por 30 minutos, se extrajo el sobrenadante y se agregó una gota de (Tween –80, 0.1%) y se realizó el conteo de esporas en cámara de Neubauer, Se debe tener una concentración no menor a 10^8 conidias/ml

2.1.3 Determinación de la viabilidad de las esporas

A partir de la muestra líquida anterior se suspendió 1 ml en 9 ml de agua estéril. Depositando una gota sobre medio de cultivo, previamente solidificado sobre un portaobjeto, se incuba a 25°C por 48-72 horas y se observó con microscopio un número de 100 conidias y de éstas las germinadas. Se debe tener un 95%-100% de germinación.

3. Evaluación *in vitro* e *in vivo* del efecto de los procesos digestivos de ovinos, sobre la viabilidad de las conidias de hongos nematófagos.

3.0 Evaluación *in vitro* del grado de viabilidad de los hongos atrapa nemátodos luego de ser sometidos al método de Tilley Terry.

Se evaluó *in vitro la* viabilidad de las esporas de los hongos predadores, respecto de su capacidad de transito a través del tracto gastrointestinal, por medio del test de Tilley Terry. Con este método se estableció in vitro que porcentaje de esporas o clamidosporas viables se obtiene luego de la aplicación del método de Tilley Terry. Este sistema permitió estimar in vitro el paso de esporas viables a través del liquido ruminal y de la digestión ácida (Wolstrup, et al, 1996) En este

sistema se utilizará una dosis inicial de 10^7 esporas o clamidosporas/ml de cultivos originados en cada zona del ensayo

Digestibilidad «in vítro». Este método aplicado se refiere a una técnica biológica de laboratorio que pretende simular las condiciones existentes en el rumen. Para ello se sometió una muestra de peso conocido a incubación conteniendo licor ruminal extraído de un animal provisto de una cánula ruminal; de donde se extrae contenido ruminal que se decanta para obtener el licor ruminal con su contenido de microorganismos. Este se mezcla una cantidad conocida de muestra, en donde se burbujea CO_2 y se cierra con un tapón Bunsen. Este se caracteriza por tener una válvula que permite que salga el exceso de gas que se produce en la digestión ruminal en el interior del tubo. A partir del residuo decantado y luego de ser incubado por un cierto tiempo se determina la fracción insoluble, que correspondería a la porción indigestible. Conociendo la cantidad de muestra incorporada, que en este caso correspondió a esporas en sustrato sólido consumidas por el animal y restándole a esta la porción indigestible, que correspondería a heces fecales, se puede conocer la digestibilidad de la materia seca o materia orgánica y en el caso del ensayo se evaluó la perdida de esporas por el efecto de la digestión ruminal. Los valores se corrigen posteriormente con el residuo obtenido del inoculo del licor ruminal solo.

En el caso de la técnica «in vitro» lo que no es digerido durante la incubación con el licor ruminal se considera como no digestible. Por ello se hicieron modificaciones de esta técnica que dio origen a la llamada digestibilidad «in vitro» de dos etapas. La técnica consiste en extraer una cierta cantidad de fluido ruminal que se mezcla con la muestra de alimento en la primera etapa de digestión. Esta es seguida por una segunda etapa donde se solubiliza el residuo de la primera etapa con una solución ácido-pepsina que simula la digestión en el abomaso e intestino delgado del alimento y de las proteínas microbiales. Como sucede con la mayoría de los métodos de evaluación de forrajes, esta técnica no

está diseñada para duplicar o simular completamente las condiciones de rumen, sino para tener una estimación que permita predecir los parámetros «in vivo». El método de dos etapas propuesto por Tilley y Terry (1963) se considera el precursor de la fermentación in vitro dividido en dos etapas y generalmente este es usado como estándar de excelencia para confrontar otros métodos.

3.0.1 Digestión Ruminal.

Se fermentó por 48 hrs el compuesto a analizar en licor ruminal (inoculo de microorganismos del rumen). El compuesto evaluado se utilizó molido tamizándolo en una malla de de 1 mm para facilitar la acción de los microorganismos y contar con un contenido de materia seca no menor al 88%. Esta mezcla de alimento con el licor ruminal y saliva artificial, que no contiene enzimas, y por lo tanto es una solución tampón, se mantuvo en baño María a 39°C con una agitación suave y continua en una atmósfera saturada con CO2 (para simular las condiciones anaeróbicas del rumen).

3.0.2 Digestión Abomasal.

Luego de la fermentación Ruminal se procedió a realizar una digestión con ácido clorhídrico y pepsina. La diferencia, medida entre ambas muestras (pre y post digestión in vitro) corresponde al nutriente o materia orgánica digerida.

3.0.3 Evaluación de la sobrevivencia y viabilidad de los hongos nematófagos al término de los procesos digestivos

Al término de cada etapa del método de Tilley Terry (Etapa de digestión con líquido ruminal y digestión ácida), se tomaron 4 muestras de cada etapa del

proceso y de cada aislado, sembrándolas por dilución en agar harina de maíz con antibióticos, las placas sembradas se incubarán a 25°C por 1 a 2 semanas hasta obtener la germinación de las conidias y efectuar el recuento de unidades formadoras de conidias.

Cada ensayo se repitió tres veces, obteniendo el porcentaje de germinación de cada aislado del hongo que se ha sometido al método de Tilley Terry, obteniendo muestras luego de la incubación con líquido ruminal y de la digestión ácida. Los datos se analizaron por análisis de varianza

3.1 Evaluación in vivo del grado de viabilidad de las esporas de los hongos que presentaron el mejor nivel de sobrevivencia y viabilidad en ensayo in vitro.

3.1.0 Reproducción de hongos nematófagos

Los aislados que presentaron una alta sobrevivencia en el test de Tilley Terry, se reprodujeron en sustrato sólido y se procedió a realizarles control de calidad como fue explicado en el punto 2.1.

3.1.1 Establecimiento del ensayo: Parcela de experimentación Centro de Educación y Tecnología

Durante el período de desarrollo de proyecto, se realizaron cuatro ensayos dirigidos a evaluar diferentes modalidades de incorporación de los hongos nematófagos al consumo animal, estos fueron los siguientes:

A) Evaluación del comportamiento de tres niveles de concentración de esporas entregadas por vía oral a los animales

B) Evaluación a nivel de campo de la acción controladora de los hongos nematófagos reproducidos en sustrato sólido, sobre larvas infectivas de nematodos.

C) Diseño, elaboración y evaluación de bloques minerales como vehículo de administración de hongos nematófagos en rumiantes en pastoreo.

D) Diseño y evaluación del comportamiento de cápsulas intrarruminales de baja digestibilidad, con entrega gradual de los hongos nematófagos incorporados en su matriz, para el control de nematodos en rumiantes

A) Evaluación del comportamiento de tres niveles de concentración de esporas entregadas por vía oral a los animales

Material fúngico:

Para seleccionar in vivo los aislados de hongos nematófagos que lograron sobrevivir los procesos digestivos in vitro, Se evaluó la dosis entregada por vía oral a los animales en relación a la capacidad de las esporas incorporadas al tracto digestivo por vía oral, de atravesarlo y controlar los estados infectivos de los nemátodos en las fecas.

Primer Ensayo: En la primera etapa del trabajó se evaluaron tres dosis o concentraciones de hongos nematófagos suministrados oralmente y en medio líquido; 10^6 conidias/kg peso del animal, señalado por varios trabajos como capaz de reducir significativamente el número de larvas infectivas de nemátodos (Larsen et al, 1995,1999, Fernández et al, 1999). Las otras dosis evaluadas correspondieron, a una concentración superior 10^8 conidias/ Kg. peso del animal y otra inferior 10^5 conidias/kg peso animal.

Ensayo:

La metodología empleada, se basa en lo realizado por (Bird and Herd, 1995; Larsen et al, 1996; Araujo et al, 1999)

Este ensayo se realizó en la Central demostrativa del Centro de Educación y Tecnología

Se seleccionaron 12 animales de pesos similares e infectados naturalmente con nemátodos parásitos.

A 4 animales se les suministró antiparasitario para que queden libres de nematodos, a 2 de ellos (G1) se le administró diariamente en la dieta, el hongo reproducido en sustrato sólido, a una concentración definida de conidias/kg de peso animal, por un período de 4 días.

Los otros 2 animales (G2) no recibieron el hongo, pero se les mantuvo sin nemátodos con tratamiento antiparasitario (Panacur ®), correspondió al grupo control .

El tercer y cuarto grupo de 4 animales cada uno (G3) y (G4) se mantuvieron sin el suministro del hongo y sin antiparasitarios, infectados naturalmente por nemátodos.

Al quinto y sexto día de haber iniciado el suministro de hongos, se colectaron las muestras de fecas réctales en los grupos de animales, para realizar el conteo de huevos y larvas fecales

Este ensayo se realizó para cada una de las tres dosis y de los aislados de hongos que fueron seleccionados en el ensayo in vitro

3.1.2 Evaluación de la capacidad de las esporas excretadas en las fecas de reducir el número de larvas infectivas, a través del conteo de huevos y larvas por gramo de fecas

- Conteo del número de huevos por gramo de fecas en animales con tratamiento con el hongo y sin él.

Al quinto y sexto día de haber iniciado el suministro de hongos, se colectaron las fecas réctales de cada animal, para realizar el conteo de huevos por gramo de fecas. De cada animal 3 submuestras se usaron para determinar el número de huevos por gramo fecas, de acuerdo al método de Mac Master. Esta técnica, de concentración cuantitativa es muy utilizada y está compuesta por los siguientes pasos:

- Pesar 2 grs. de heces fecales, que se mezclan con 60 grs. de solución salina de ClNa en vaso precipitado.
- Pasar la suspensión a través de un tamiz de malla fina apretando el residuo cuidadosamente.
- Agitar la suspensión vigorosamente para obtener una suspensión homogénea de los huevos.
- Por medio de una pipeta Pasteur de punta fina se llenan las cámaras de conteo de la célula, teniendo la misma ligeramente inclinada. La célula de conteo tiene dos cámaras, cada una con una superficie de 10 x 10 mm y un espacio de 1,5 mm entre la cámara y la lámina que los cubre, por lo que puede contener 1,5 ml de suspensión cada una de las cámaras. Al sumar los huevos o los quistes observados para cada especie o género de parásito, en cada cámara se obtiene un valor que es multiplicado por cien que represente el factor de corrección. El resultado representa el número de huevos por gramo de heces fecales (h.p.g.) u ooquistes por gramo de heces fecales (o.p.g.) El valor más bajo que reporta la técnica es cien.

- Estos análisis se realizaron en el Servicio Agrícola y Ganadero en el departamento de parasitología de la estación Lo Aguirre.

- **Evaluación del número de larvas presentes en cultivo coprológico en animales con tratamiento con el hongo y sin él**

Se tomaron cantidades iguales (10-40 g) de las fecas colectadas de G1(hongo y sin huevos parásitos) y G3 (huevos parásitos), se mezclan y se realizó un cultivo fecal o coprológico, para determinar el potencial de reducción de larvas (L3) de las esporas del hongo. Este consiste en tomar 7 gramos de fecas más vermiculita estéril y agua destilada estéril. Se incuba a 25°C por 2 semanas y luego se colectaron las larvas por medio de la técnica de Baermann y el número de larvas de tercer estadio se determina en triple alícuota. Finalmente se obtiene el efecto o grado de control del hongo que ha atravesado el tracto digestivo, sobre las larvas que han eclosionado a partir de los huevos presentes en las fecas.

Luego se realizó la misma operación que en el punto anterior, pero para animales sin tratamiento fúngico, se mezclan cantidades iguales de fecas de (G3 y G4) y luego se realiza un cultivo coprológico, para determinar el número de L3 eclosionadas, a partir del número conocido de huevos presentes en estos animales Para el control se realizó lo mismo, número de huevos por gramo fecal y cultivo coprológico si es necesario.

3.1.3 Evaluación de la capacidad de los hongos nematófagos, de sobrevivir el tracto digestivo de los animales, a través del uso de nemátodos trampa

A partir de las muestras fecales de cada animal y después de la administración del hongo, al 5 y 6 día. Se extrajeron dos gramos de cada muestra y se incorporaron en cápsulas petri que contenian 2% agar agua más antibiótico. Sobre cada

cápsula se agregaron 1000 larvas infectivas de nemátodos animales y se incubó a 25°C por 2 semanas., observando periódicamente la presencia de conidias, conidióforos y estructuras trampas, para confirmar si el aislado del hongo colectado en las fecas es el mismo que fue ingerido

Esta actividad se realizó para cada una de las tres concentraciones de conidias establecidas y para cada aislado de hongo previamente seleccionado en el ensayo in vitro

Para el trabajo con ovinos se establecieron 4 grupos con tres animales cada uno y con pesos similares. Las evaluaciones en este caso se realizaron en paralelo.

Complementariamente se empleó un ovino, para extracción del líquido ruminal que se utilizó en la digestión in vitro.

B) Evaluación a nivel de campo de la acción controladora de los hongos nematófagos reproducidos en sustrato sólido, sobre larvas infectivas de nematodos.

Segundo Ensayo

Se estableció un ensayo con 6 ovinos con un peso medio de 50 Kg, divididos en dos grupos, tres animales por grupo pastoreando en una pradera natural. A un grupo se le suministró el hongo controlador reproducido en sustrato sólido, a una concentración definida de conidias/kg de peso animal (5g hongo/animal/día a una concentración de $1x10^8$ conidias/g), por un período de 28 días. El hongo se mezcló con avena (200g avena/día/animal) y se suministró diariamente. El grupo testigo se alimento de igual manera pero sin el hongo.

Al cuarto día de suministrado el hongo y finalizado el ensayo, se tomaron muestras de fecas rectales para determinar:

3.1.2 Evaluación de la capacidad de las esporas excretadas en las fecas de reducir el número de larvas infectivas, a través del conteo de huevos y larvas por gramo de fecas

Para el recuento del número de larvas presentes en cultivo fecal o coprológico, para determinar el potencial de reducción de larvas (L3) por las esporas del hongo, se mezclaron 7 gramos de fecas, de cada tratamiento, más vermiculita estéril y agua destilada estéril. Se incubaron a 25°C por 2 semanas y luego se colectaron las larvas por la técnica de Baermann y el número de larvas de tercer estadio se determinó en triple alícuota. Cada tratamiento se repitió dos veces y cada muestra animal tuvo tres repeticiones.

3.1.3 Evaluación de la capacidad de los hongos nematófagos, de sobrevivir el tracto digestivo de los animales, a través del uso de nemátodos trampa.

La determinación de la presencia y sobrevivencia de los hongos en las fecas, se realizó de acuerdo a la metodología explicada en este punto en el ensayo anterior.

3.1.4 Evaluación del efecto de los hongos nematófagos sobre el número de larvas presentes en la pradera

Para la evaluación de las larvas en la pradera se realizó un muestro del estrato herbáceo y conteo de larvas de acuerdo a lo descrito por Baudena et al (2000). Se tomaron 200 g de hierbas, siguiendo una ruta en forma de W en la pradera, cortando las hierbas a ras de suelo. Las muestras se tomaron en cada uno de las parcelas, con grupo de animales con tratamiento y sin él. Las muestras de pasto se dejaron en 10 litros de agua por una noche, con adición de detergente. Luego el pasto se retiró y el líquido se tamizó para remover las partículas de mayor tamaño. Luego se dejó reposar por 6 horas. Esto se repite varias veces hasta reducir el volumen a 50ml, los que son centrifugados a 200 rpm por 30 minutos. Los nemátodos presentes en el precipitado son recuperados por flotación en medio azucarado. Las larvas recuperadas y nemátodos del suelo son entonces lavados y por medio de conteo de alícuotas se determina el número total recuperado.

C) Diseño, elaboración y evaluación de bloques minerales como vehículo de administración de hongos nematófagos en rumiantes en pastoreo.

Esta presentación se diseño con posterioridad al inicio del proyecto de manera de introducir en los sistemas de pastoreo ovino un mecanismo de entrega permanente del controlador a la masa de animales, para esto se diseño un bloque mineral a presión que permitió el consumo diario de 30 – 70 gr. del dispositivo de manera de permitir el consumo de un mínimo de 10^6 esporas por kilogramo de peso animal.

3.1.4 Diseño, elaboración y evaluación de bloques minerales

Se diseñaron bloques minerales compuestos por diferentes sustratos, hasta obtener estructuras homogéneas y compactadas. La mezcla de insumos para la elaboración de los bloques correspondió a: melaza, cemento, sales minerales y vitaminas, afrecho, bifosfato de calcio y hongos nematófagos reproducidos en sustrato sólido (avena). Se mezclaron cada uno de estos elementos hasta obtener una masa homogénea, la que se depositó en un molde plástico por 24 horas, a temperatura ambiente, luego fue desmoldada y dejada a ambiente por 10-15 días.

Una vez evaluadas las mezclas y formulaciones en relación a su compactación y secado, se procedió a elaborar los bloques en una prensa diseñada para tal efecto, con el fin de obtener cubos compactados a presión. Esta máquina permite aplicar una presión de 500 libras por pulgada cuadrada, determinando el moldeado y resistencia de los bloques. Luego éstos se dejaron secar al aire durante 10 días.

3.1.5 Evaluación del comportamiento de los hongos nematófagos incorporados en los bloques

Una vez secados los bloques, se tomaron muestras de ellos, las que fueron molidas y luego sembradas en placas con agar agua, para observar crecimiento y determinar el numero de unidades formadoras de colonias por gramo de bloque. Se realizaron tres repeticiones por bloque evaluado.

Estos dispositivos se almacenaron a temperatura ambiente por períodos de tres meses, realizando evaluaciones de su viabilidad a través del control de calidad, en forma mensual.

3.1.6 Evaluación a nivel de campo, con animales en experimentación, sobre el nivel de aceptación y consumo de los bloques

Se seleccionaron 10 animales de pesos similares, a un grupo se le ofreció diariamente un bloque mineral de 5 Kg. con el hongo nematófago incorporado, de acuerdo a la formulación con mejores resultados en las evaluaciones anteriores. A otro grupo (testigo), también de 5 animales se les ofreció un bloque con iguales características pero sin el hongo.

Ambos grupos, separados y en pastoreo dispusieron permanentemente de un bloque, controlando diariamente la pérdida de peso de los bloques, en ambos grupos, para determinar el grado de aceptación y consumo. Conjuntamente a cada grupo se les dispuso de bebederos, de manera que el agua no constituyera una limitante para el consumo del dispositivo. El consumo de los bloques se mantuvo por 20 días.

3.1.7 Evaluación del comportamiento de los hongos nematófagos, incorporados en los bloques, al proceso digestivo de ovinos en pastoreo

D) Diseño y evaluación del comportamiento de cápsulas intrarruminales de baja digestibilidad, de manera que permita su uso posterior en la entrega gradual de los hongos nematófagos incorporados, para el control de nematodos en rumiantes

Cuarto ensayo

3.1.8 Diseño y evaluación del comportamiento de cápsulas intrarruminales

El diseño y desarrollo de bolos intrarruminales de liberación controlada que permitan la entrega lenta y sostenida de productos biológicos o sustancias químicas para el control de nemátodos en rumiantes fue desarrolla por La Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de Chile.

Para el desarrollo de este producto, se diseño y evaluó una formulación con diferentes excipientes enfocados a la entrega de las esporas del hongo ***A. oligospora*** en forma gradual y sostenida por un período de dos meses.

Los diferentes compuestos empleados en la elaboración de los bolos intrarruminales fueron:

a)Resinas acrílicas conocidas bajo el nombre comercial de Eudragit®

b)Sustancias de origen graso conocidas bajo el nombre comercial de: Gelucire®

,Precirol®, Compritol®, Avicel®

c)Carbohidratos: Lactosa spray dried

d) Minerales: Sulfato de bario; Hierro metálico en polvo.

e) Esporas de *Arthrobotrys oligospora*

1.-Fabricación de las formulaciones de los bolos intrarruminales

Para la formulación se emplearon dos métodos; el de compresión y el de fusión:

Compresión: esta metodología se empleó para los productos que contenían Eudragit, utilizando la técnica convencional en la fabricación de comprimidos, consistente en una granulación y posterior compresión

Fusión: ésta se empleó para los productos que contenían Gelucire, Compritol y Precirol, se fundieron las materias grasas a una temperatura 5ºC superior a su punto de fusión, se le agregaron los componentes que le otorgan densidad y cuando fue procedente, se le agregaron las esporas en estudio. Luego se esperó a que la masa fundida comenzara a tomar consistencia y se vació en un molde de 2 cm de diámetro y 4 cm de alto hasta su solidificación

Densidad de los productos a ensayar

La permanencia de los productos en el rumen animal, está condicionada por la densidad que tenga la formulación. De acuerdo con la revisión bibliográfica, es necesario alcanzar densidades de a lo menos 1,6 g/cc para asegurar que la formulación no va a ser expulsada del rumen o por los movimientos inherentes a su actividad. Para ello se hicieron ensayos con 2 excipientes: hierro metálico en polvo y sulfato de bario, para obtener la densidad adecuada.

Elaboración de comprimidos con matrices Eudragit, utilizando hierro como excipiente para dar la densidad.

Se elaboraron 2 tipos de comprimidos con Eudragit RS: uno con una dispersión homogénea de Eudragit en mezcla con hierro y otro que consistió en un comprimido bicapa: una de "anclaje" formada sustancialmente por hierro y la capa superior consistente en la matriz desde la que se produciría la liberación (Eudragit RS) Esta última formulación presentó el inconveniente tecnológico de que la adhesión entre ambas capas no fue lo suficientemente poderosa como para resistir la acción de los medios de disolución, por lo que al corto tiempo ambas capas se separaban, perdiéndose el efecto de densidad buscado.

En todo caso, ninguna de las formulaciones fue capaz de resistir en el medio de disolución por más de 3 días, lo que claramente señala que con el uso de este excipiente no se logra el objetivo planteado originalmente.

Elaboración de cilindros obtenidos por fusión con matrices Gelucire, utilizando hierro como excipiente para dar la densidad.

Dadas las características del producto que se pretende incluir en la formulación (esporas), el mecanismo de cesión que se busca debe ser la erosión, ya que es el único que permitirá la liberación de la espora, considerando que ésta no es soluble y que, en consecuencia, el mecanismo de difusión no es viable. Además debe demostrarse que el proceso de calentamiento no tiene influencia en la viabilidad de la espora.

Composición de los productos Gelucire®

Los Gelucire® o glicéridos poliglicólicos saturados, son una familia de excipientes lipídicos semisólidos e inertes, que corresponden a una mezcla de glicéridos y ésteres polioxietilénicos, estos dos componentes les confieren características hidrofóbicas e hidrofílicas, respectivamente.

Cada Gelucire® se caracteriza por dos números, el primero se refiere al punto de fusión (aproximado) de la base y el segundo al valor del BHL (Balance Hidrófilo-Lipófilo), por lo tanto, es posible tener una idea razonable de las propiedades de cada base a partir de la nomenclatura.

La composición química de las diferentes bases puede ser controlada modificando las materias primas y las condiciones de manufactura. En general, mientras mayor sea la proporción de ésteres polioxietilénicos en el producto final, más hidrófilica será la base. Asimismo, a mayor longitud de la cadena del polietilenglicol y ácido graso, más alto es el punto de fusión del excipiente. Los valores de BHL de glicéridos y ésteres polioxietilénicos de ácidos grasos se resumen en el siguiente cuadro.

Cuadro 2.Valores BHL de Glicéridos y Esteres Polioxietilénicos de Ácidos Grasos	
Triglicéridos	1-2
Diglicéridos	2-3
Monoglicéridos	3-4
Diésteres Polioxietilénicos de ácidos grasos	6-15
Monoésteres polixietilénicos de ácidos grasos	10-15

GELUCIRE®50/02 (Lote N°14547)

Este compuesto, Gelucire®, presenta un punto de fusión de 50°C y BHL 2. Es un sólido ceroso, mezcla de glicéridos y ésteres polioxietilénicos de ácidos grasos.

Presenta una alta proporción de ácidos grasos en su composición, la cual va desde C_{12} a C_{18}. Su definición química corresponde a Glicéridos saturados poliglicólicos.

Cuadro 3. ESPECIFICACIONES DEL GELUCIRE ® 50/02		
FISICA	**ESPECIFICACIONES**	**LIMITES DE ACEPTACION**
Valores BHL	2	
Apariencia	Cera Sólida	
Olor	Tenue	
Color (Escala Gadner)	1.1	< 5
Punto de Fusión (°C)	49.4	46.5 – 51.5

Excipientes utilizados para regular la liberación desde la matriz de Gelucire

a.- Precirol

Dentro de las sustancias utilizadas en la elaboración de **matrices lipídicas** se encuentra el **Palmitoestearato de Glicerilo**, que corresponde a un material semisintético, compuesto por una mezcla de mono – di - y triglicéridos de cadena C_{16} y C_{18} de ácidos grasos. Se presenta como un polvo fino (diámetro 40µ), insoluble en agua, con una temperatura de fusión entre 53,0-57,0 °C y un BHL de 2. Para el desarrollo de comprimidos de liberación controlada, se utiliza en una proporción entre un 10 – 50% del peso final del comprimido

Debido a las características hidrofóbicas del Palmitoestearato de glicerilo, se piensa que la difusión del fármaco dentro de la matriz, puede verse dificultada, por lo cual sería necesario facilitar la cesión del principio activo por medio de algún agente hidrofílico, el cual aumenta el grado de porosidad de ésta, permitiendo que el agua penetre y se distribuya en la estructura del comprimido; esta red hidrófila, intercalada entre partículas hidrófobas, evita que se formen uniones irreversibles entre ellas, de esta manera podría observarse un aumento en la liberación del principio activo (Vila, 1987).

b.- Compritol

Glicerol Dibehenato

El dibehenato de glicerol es una mezcla de diacilgliceroles, principalmente dibehenoilglicerol, junto a cantidades variables de mono- y triacilgliceroles. Contiene del 13,0 por ciento al 21,0 por ciento de monoacilgliceroles, del 40,0 por ciento al 60,0 por ciento de diacilgliceroles y del 21,0 por ciento al 35,0 por ciento de triacilgliceroles, obtenido por esterificación del glicerol con ácido behénico.

Características:

Masa sólida cérea, o bien polvo o copos de tacto untuoso, blanco o casi blanco insoluble en agua, soluble en cloruro de metileno y parcialmente soluble en alcohol caliente.

c.- Avicel y Lactosa Spray Dried

El Avicel corresponde a celulosa microcristalina. Ambos productos son utilizados en preparados de liberación controlada cuando quiere mejorarse la penetración de líquidos acuosos dentro del producto de liberación controlada, por lo que suelen asociarse a una mayor liberación del producto de interés.

2.- Ensayo de las formulaciones elaboradas

Se realizó una selección preliminar de las formulaciones antes de ensayarlas in vivo, se hicieron pruebas en el Aparato 2 (paleta) del equipo de disolución oficial de la Farmacopea Norteamericana (USP). Como medio de disolución se utilizaron 900 ml de un medio que contenia agua, lipasa y sales biliares, con un pH de 6,8.

Posteriormente, las formulaciones que resistieron por más tiempo al ensayo descrito en el punto anterior, fueron ensayadas en un ovino fistulado. Finalmente, se evaluó la viabilidad de las esporas en las formulaciones después de haber sido sometidas a los ensayos anteriores.

3.1.9 Evaluación de la resistencia de las diferentes formulaciones a la digestión ruminal.

Los dispositivos intrarruminales a evaluar se sometieron al ambiente ruminal en un ovino fistulado en bolsas permeables de material sintético, que permiten el ingreso de la microflora y microfauna presente en el líquido ruminal y por lo tanto ejercen su efecto digestivo sobre el contenido de las bolsas, en este caso cápsulas, de los materiales elegidos por sus características de reactividad al ambiente ruminal. Estas cápsulas se introdujeron en el animal fistulado y se pesaron periódicamente para conocer el cambio de peso y la tasa de desaparición de ellas.

3.1.10 Evaluación de la concentración de esporas en cápsulas intrarruminales.

La obtención de la concentración de esporas del hongo A. oligospora en las cápsulas de uso intrarruminal, suministradas a los animales en este ensayo, se realizó, raspando 1 gramo de las cápsulas, el que fue molido y dispuesto en agua destilada estéril, para realizar sucesivas diluciones y sembrar en placas de agar agua 0.1 ml de la

dilución. Las placas se incuban a 25° C y semanalmente se evalúan para el recuento de conidióforos por placa.

3.1.11 Evaluación in vivo, del uso de cápsulas intrarruminales en ovinos

- **Liberación de esporas *in vivo***

La evaluación de la degradación ***in vivo*** de las cápsulas y detección de la liberación de esporas del hongo nematófago incorporado en ellas, se realizó en la parcela de experimentación de colina.

A) Un primer ensayo se efectuó empleando 10 ovinos, a los que se les introdujeron cápsulas intrarruminales, mediante un lanza bolo.

Este consistió en un grupo control de 5 animales a los que se les entregó a cada uno, una cápsula de 19 gramos, sin el hongo *A. oligospora*.

El grupo testigo, de 5 animales, recibió el mismo tipo de cápsulas, pero con el hongo *A. oligospora*.

B) El segundo ensayo, similar al anterior, se aumento en número de animales en experimentación, 10 animales como grupo control y 10 animales a los que se les entregó a cada uno una cápsula con el hongo, con un peso medio de16,196 gramos.

La evaluación del comportamiento de las cápsulas intrarruminales, en ambas situaciones, en relación a su degradación y liberación de esporas, se realizó mediante la colecta de fecas rectales, previa al tratamiento y posterior a la entrega de ellas. Las fecas de cada animal (3-4 gramos) se muelen y se depositan sobre placas de agar agua al 2% más 0.02% de tetraciclina (w/v), de acuerdo a la metodología de Araujo et al, (1999) y Larsen et al, (1994). Sobre estas fecas depositadas en el agar, se agregan nemátodos, aproximadamente 1000 L_3 en suspensión de agua estéril. Estas placas, tres repeticiones por animal, se incuban a 25°C, evaluando al día 10 y 15 las placas para detectar presencia de hongos y número de conidióforos presentes en las fecas.

4. Evaluación del efecto de los hongos nematófagos obtenidos, sobre las poblaciones de larvas de tercer estado de nemátodos en la pradera y sobre la carga parasitaria en ovinos en pastoreo de cada zona participante en el proyecto, Estancia Josefina, Magallanes.

4.0 Establecimiento del sistema de pastoreo comparativo para evaluar el efecto del hongo nematógfago.

I) Primer ensayo Magallanes: Estancia Josefina (2004)

Sustrato sólido, cereales

- Se estableció un ensayo con dos grupos de animales, cada uno con 15 ovinos, pastoreando en una pradera natural, con condiciones similares de topografía, humedad y composición botánica.

- Este sistema se dividió en dos áreas, cada una con tres sitios ecológicos diferenciados; una zona de ladera con una pendiente de n 20%, un sitio depresional y otro depresional hidromórfico
- El primer grupo de 15 ovinos en la pradera recibió 200g de avena por animal con la dosis de esporas por kg de peso vivo, que resultó más eficiente en los análisis previos realizados tanto in vitro como in vivo (10^8esporas),
- El segundo grupo de 15 ovinos, recibieron la misma dosis de avena, pero sin el hongo
- Previo al inicio del ensayo, hubo un período pre-experimental en el mes de diciembre, para adaptar los animales a la incorporación de grano en la dieta

- Luego de esta etapa se inició el ensayo con duración de 8 semanas, periodo en que se entregó diariamente el biocontrolador. , en dosis de 1-2 gramos por animal, a una concentración de $2,5x10^8$ esporas/g a $7,5 \times 10^8$ esporas/g

4.2 Evaluación del peso de los animales en los grupos de animales en pastoreo

Los animales se pesaron al comienzo del ensayo y posteriormente se estableció el peso mensualmente, para determinar la ganancia de kilogramos en el tiempo.

4.3 Evaluación de la sobrevivencia de los hongos nematófago obtenidos, al paso gastrointestinal de los animales

- La determinación de la sobrevivencia del hongo nematófago se realizó colocando dos gramos de las fecas colectadas, por animal y tratamiento, en placas con agar agua, a las que se les agrega 1000 nemátodos, las placas se incuban a 25°C, observando periódicamente la presencia o ausencia de hongos nematófagos.

4.4 Evaluación Coproparasitaria de los grupos de animales en pastoreo.

4.4a Evaluación coproparasitaria de los dos grupos de 15 animales utilizados.

A cada grupo se le realizó mensualmente una evaluación coproparasitaria para determinar la cuenta de huevos por gramo de fecas y conjuntamente se evaluó el número de larvas de tercer estado que aparecieron en las fecas luego de la incubación.

El recuento de huevos, fue realizado por el Servicio Agrícola Ganadero (SAG)

El cultivo fecal se realizó tomando 7 gramos de fecas, para cada grupo de animales, las fecas se mezclaron con vermiculita estéril y se incubaron a 25°C por dos semanas y luego se colectaron las larvas eclosionadas presente en los animales.

4.4 b Utilización de animales trazadores en el grupo de animales pastoreando sin tratamiento fúngico y con tratamiento fúngico antiparasitario.

Animales trazadores, estos son animales que se mantuvieron fuera del sistema y que fueron tratados con antiparasitarios convencionales, Panacur®, que estaban limpios y se incorporaron mensualmente en número de dos por mes, en cada sector del ensayo. Estos se utilizaron para evaluar el nivel de infestación que van adquiriendo los animales a través del tiempo, en ambos sistemas de manejo, con y sin tratamiento con el hongo

- **Evaluación Coproparasitaria a los animales trazadores.**

A los animales trazadores se les realizó mensualmente un análisis coproparasitario para conocer el recuento de huevos por gramo de fecas, también se realizó un cultivo fecal para determinar el desarrollo larval. Esto permitió conocer la tasa a la cual se infestan tanto en el sector de animales con tratamiento fúngico como en el sector sin él. Se utilizaron un conjunto de 8 animales trazadores (4 para cada tratamiento)
Luego se comparó la carga parasitaria adquirida por los trazadores para conocer el nivel de infectividad que tuvieron las praderas donde se han ubicado animales tratados y no tratados.

Finalmente se comparó la carga parasitaria de los dos grupos de animales analizando muestras compuestas obtenidas de ambos grupos en tres repeticiones, a través de varianza con muestras repetidas.

Todos los análisis coproparasitarios se subcontrataron con el laboratorio de parasitología del Servicio Agrícola y ganadero del ministerio de Agricultura.

4.5 Evaluación del efecto de los hongos nematófagos obtenidos, sobre las poblaciones de larvas de tercer estado de nemátodos en la pradera de Magallanes.

En cada tratamiento, con el hongo y sin él, se realizaron muestreos mensuales sobre la pradera durante seis meses

El muestro del estrato herbáceo y conteo de larvas se realizó de acuerdo a lo descrito por Baudena et al (2000). Se toman 200g de hierbas, siguiendo una ruta en forma de W en la pradera, cortando las hierbas a ras de suelo. Las muestras se tomaron mensualmente en cada uno de las parcelas, con grupo de animales con tratamiento y sin él. Las muestras de pasto se dejaron en 10 litros de agua por una noche, con adición de detergente. Luego el pasto se retiró y el líquido es tamizó para remover las partículas de mayor tamaño. Luego se dejó reposar por 6 horas. Esto se repite varias veces hasta reducir el volumen a 50ml, los que son centrifugados a 200 rpm por 30 minutos. Los nemátodos presentes en el precipitado son recuperadas por flotación en medio azucarado. Las larvas recuperadas y nemátodos del suelo son entonces lavados y por medio de conteo de alícuotas se determina el número total recuperado. Los datos se analizaron por análisis de varianza con muestras repetidas y se usó el test de Student's para determinar las diferencias en la carga parasitaria entre los dos grupos de animales trazadores.

II) Segundo ensayo Magallanes: Estancia Josefina (2005).
Administración de nematófagos en bloques minerales.

4. Evaluación del efecto de los hongos nematófagos, sobre las larvas de tercer estado de nemátodos en la pradera y sobre la carga parasitaria en ovinos en pastoreo, Estancia Josefina.

4.0 Establecimiento del sistema de pastoreo comparativo para evaluar el efecto del hongo nematófago.

- Se estableció un ensayo con 4 grupos de animales, cada uno con 15 ovinos, pastoreando en una pradera natural, con condiciones similares de topografía, humedad y composición florística.

- Se asignaron 15 animales elegidos aleatoriamente en cada área. Los grupos a evaluar consideraban los siguientes características:

- **Grupo A:** 15 ovinos en pastoreo a los cuales se les ofreció una mezcla mineral en bloques de 20 Kg. Sin adicionar el hongo nematófago A. oligospora.

- **Grupo B:** 15 ovinos en pastoreo a los cuales se les ofreció una mezcla mineral en bloques de 20 Kg. Sin adicionar el hongo nematófago A. oligospora y con tratamiento antiparasitario con **Panacur ®**.

- **Grupo C:** 15 ovinos en pastoreo a los cuales se les ofreció una mezcla mineral en bloques de 20,8 Kg. Adicionando el hongo nematófago sobre sustrato sólido deshidratado en cantidad de 800 gr por bloque de 20,8 kg.

- **Grupo C:** de 15 ovinos en pastoreo a los cuales se les ofreció una mezcla mineral en bloques de 20,8 Kgr. Adicionando el hongo nematófago sobre sustrato sólido deshidratado en cantidad de 800 gr por bloque de 20,8 kg y con tratamiento antiparasitario con Panacur ®.

- Previamente se inició con ellos, un periodo pre-experimental en el mes de Febrero, para lo cual se introdujeron en los potrerillos experimentales junto a animales adultos que ya conocian los bloque minerales y los consumían normalmente con el fin de adaptar los corderos a la incorporación del componente mineral en la dieta.

- Luego de esta etapa se inició el ensayo que se mantuvo durante 8 semanas, Marzo y Abril , periodo en el cual se entregó permanentemente el biocontrolador, en bloque de 20,8 Kg. y consumo *ad libitum*, a una concentración de 5×10^8 esporas/g .

4.1 Evaluación del nivel de consumo de los bloques minerales en los cuatro grupos de corderos en pastoreo

- Semanalmente se estableció el consumo de bloques minerales, por medio de una pesa digital, estos fueron entregados a nivel de campo, durante este periodo se mantuvieron protegidos bajo una estructura de madera y Zinc que los protegieron del efecto del sol y del agua.

4.2 Evaluación del peso de los animales en los grupos de animales en pastoreo

- Los animales se pesaron al comienzo del ensayo y posteriormente una vez al mes.

4.3 Evaluación de la sobrevivencia de los hongos nematófago obtenidos, al paso gastrointestinal de los animales

- La determinación de la sobrevivencia del hongo nematófago se realizó colocando dos gramos de las fecas colectadas, por animal y tratamiento, en placas con agar agua, a las que se les agrega 1000 nemátodos, las placas se incuban a 25°C, observando periódicamente la presencia o ausencia de hongos nematófagos.

4.4 *Evaluación Coproparasitaria de los grupos de animales en pastoreo*

- El recuento de huevos, se realizó en el Servicio Agrícola Ganadero (SAG).

4.5 Evaluación del efecto de los hongos nematófagos obtenidos, sobre las poblaciones de larvas de tercer estado de nemátodos en la pradera de Magallanes.

- El muestro del estrato herbáceo y conteo de larvas se realizará de acuerdo a lo descrito por Baudena et al (2000). Se toman 200g de hierbas, siguiendo una ruta en forma de W en la pradera, cortando las hierbas a ras de suelo. Las muestras se tomarán mensualmente en cada uno de las parcelas, con grupo de animales con tratamiento y sin él. Las muestras de pasto se dejarán en 10 litros de agua por una noche, con adición de detergente. Luego el pasto se retira y el liquido es tamizado

para remover las partículas de mayor tamaño y se deja reposar por una 6 horas. Esto se repite varias veces hasta reducir el volumen a 50ml, los que son centrifugados a 200rpm por 30 minutos. Los nemátodos presentes en el precipitado son recuperadas por flotación en medio azucarado. Las larvas recuperadas y nemátodos del suelo son entonces lavados y por medio de conteo de alícuotas se determina el número total recuperado En cada lote se tomaron cada vez nueve muestras compuestas por 10 submuestras cada una.

III) Establecimiento de ensayos VI Región: Predio Bandurrias.

4. Evaluación del efecto de los hongos nematófagos, sobre las larvas de tercer estado de nemátodos en la pradera y sobre la carga parasitaria en ovinos en pastoreo, Predio Bandurrias.

4.0 Establecimiento del sistema de pastoreo comparativo para evaluar el efecto del hongo nematófago (año 2006).

- Se estableció un ensayo con 2 grupos de animales, un testigo con 50 ovinos, y un rebaño en tratamiento con 350 borregas Hampshire, del rebaño comercial del predio y se asignaron en dos potreros con cargas animales equivalentes.
- Los animales pastorearon en una pradera establecida de Lolium spp y Trifolium spp. con condiciones similares de topografía, humedad y composición florística.
- Este sistema, dividido en 2 áreas separadas con malla ursus, y estaba compuesto solamente por un sitio ecológico.

- Se asignaron 50 animales elegidos aleatoriamente como testigos y 350 animales al tratamiento con hongos nematófagos, en este grupo se seleccionaron y marcaron 50 animales, los que se mantuvieron pastoreando en conjunto con el rebaño.
- En la zona de los animales tratados establecieron tres zonas de muestreo de 2.33 has cada una.

Los grupos a evaluar consideraban las siguientes caracteristicas:

- **Ovinos Testigos:** Grupo de 50 ovinos en 1 ha de pastoreo a los cuales se les ofreció una mezcla mineral en bloques de 10 Kg. Sin adicionar el hongo nematófago A. oligospora.
- **Ovinos tratados:** Grupo de 350 ovinos en 7 ha de pastoreo a los cuales se les ofreció una mezcla mineral en bloques de 10 Kg. Con adición de 200 gramos del hongo nematófago por cada bloque de 10 Kg.
- Previamente se inició con ellos, un periodo pre-experimental en el mes de Noviembre de 2005, para lo cual se introdujeron animales en corrales del predio solo con agua y bloques minerales con el fin de que aprendieran a consumir los dispositivos minerales.

4.1 Evaluación del nivel de consumo de los bloques minerales en los dos grupos de borregas en pastoreo.

- Posteriormente por motivos nutricionales, el consumo real solo comenzó en el mes de Marzo de 2006, para esto se tuvo que encerrar reiteradamente grupos de animales en conjunto a las sales minerales en bloques. Luego de esta etapa se inició el ensayo que se mantuvo durante 70 días, parte el periodo preexperimental el 22 de marzo hasta el 11 de Abril, la evaluación del consumo de Hongos incorporados en los bloques minerales se inicio el 12 de Abril hasta el 22 de Junio de 2007, periodo en el cual se entregó permanentemente el biocontrolador, en bloques de 10, Kg. y consumo *ad libitum*, con una concentración de 3.55×10^8 esporas/g de bloque.

4.2 Evaluación del peso de los animales en los grupos de animales en pastoreo

- Los animales se pesaron al comienzo del ensayo y posteriormente una vez al mes.

4.3 Evaluación de la sobrevivencia de los hongos nematófago obtenidos, al paso gastrointestinal de los animales

- La determinación de la sobrevivencia del hongo nematófago se realizó colocando dos gramos de las fecas colectadas, por animal, en placas con agar agua, a las que se les agrega 1000 nemátodos, las placas se incuban a 25°C, observando periódicamente la presencia o ausencia de hongos nematófagos.

4.4 Evaluación Coproparasitaria de los grupos de animales en pastoreo

- El recuento de huevos, se realizó en el Servicio Agrícola Ganadero (SAG).

4.5 Evaluación del efecto de los hongos nematófagos obtenidos, sobre las poblaciones de larvas de tercer estado de nemátodos en la pradera.

- El muestro del estrato herbáceo y conteo de larvas se realizó de acuerdo a lo descrito por Baudena et al (2000). Se toman 200g de hierbas, siguiendo una ruta en forma de W en la pradera, cortando las hierbas a ras de suelo. Las muestras se tomaron mensualmente en cada uno de las parcelas, con grupo de animales con tratamiento y sin él. Las muestras de pasto se dejaron en 10 litros de agua por una noche, con adición de detergente. Luego el pasto se retira y el líquido es tamizado para remover las partículas de mayor tamaño y se deja reposar por unas 6 horas. Esto se repite varias veces hasta reducir el volumen a 50ml, los que son centrifugados a 200 rpm por 30 minutos. Los nemátodos presentes en el precipitado son recuperadas por flotación en medio azucarado. Las larvas recuperadas y nemátodos del suelo son entonces lavados y por medio de conteo de alícuotas se determina el número total recuperado. De cada Zona de pastoreo se obtuvieron 15 muestras compuesta por 10 fracciones obtenidas de acuerdo al método de Baudena, 15 en la zona de animales

testigos y 45 muestras en la zona de los animales tratados, esto se realizó mensualmente durante el ensayo.

4.0 Establecimiento del sistema de pastoreo comparativo para evaluar el efecto del consumo mineral sobre el peso de borregas Hampshire. 2007.

4.1 – 4.2 Evaluación del efecto del consumo de Bloques minerales sobre el peso de borregas hamphire en pastoreo.

Se utilizaron 30 borregas hampshire de la masa de reposición del predio Bandurrias y aleatoriamante se asignaron a dos grupos de 15 animales que se dispusieron en dos potreros de 1 ha. cada uno. Cada potrero disponía de agua de bebida y una oferta forrajera no limitante del consumo, conformada por trébol blanco (*Trifolium repens*); ballicas (*Lolium multiflorum* y *Lolium peremne*) y festucas (*F minima, F. exella*).

Se estableció el peso inicial de los animales y se pesaron periódicamente (entre 10 y 15 días).

El grupo testigo solo recibió pradera y agua de bebida.

El grupo tratado recibió los bloques minerales a libre disposición agua de bebida y forraje.

El aporte mineral se estableció semanalmente en función del residuo de bloques en los comederos, conociendo el peso inicial que fue de 10 kilogramos por unidad.

5. Escalamiento y definición de la preparación del hongo

Se realizó un estudio de mercado para definir las etapas, dimensiones y costo que implica la producción comercial de un antiparasitario orgánico. Además se determinaron las formas comerciales de presentación más adecuadas, así como marcas comerciales y la patentación del producto.

6. Transferencia y adopción de la tecnología

Se efectuó la difusión y transferencia de tecnología a técnicos y productores de carne ovina, en cada una de las zonas donde se realizó el proyecto. Esto se efectuó a través de la realización de seminarios y días de campo cuyo objetivo principal fue dar a conocer las técnicas empleadas en la producción de hongos nematófagos así como su utilización en el control de estados infectivos de parásitos de ganado, en sistemas de producción de carne ovina en pastoreo.

Estos seminarios, tuvieron una duración de un día cada uno y estuvieron dirigidos a técnicos profesionales y productores de carne ovina.

Estas actividades se desarrollaron en:

1) Estancia Josefina. Estado de Avance del proyecto, día de campo GTT Cabeza de Mar, Abril 2004

2) Congreso de Producción ovina U. De la Frontera Temuco.

3) Facultad de Agronomía. P. U. Católica de Chile.

4) Presentación de Proyectos de innovación en producción ovina, Marzo 2005

5) Presensación de Video sobre control biológico de parásitos en rumiantes menores, Municipalidad de Río Verde XII Región.

6) Control biológico de parásitos en rumiantes, facultad de Agronomía U. ARCIS Patagonia. 2005.

7) Presentación Reunión de Agro ecología Universidad ACIS Patagonia. Enero 2006.

8) Presentación final Estancia Josefina 23 de Marzo 2007.

Las áreas temáticas a tratadas en la capacitación de productores fueron las siguientes:

Ganadería ecológica.

Parasitismos gastrointestinales de importancia comercial.

Ciclos parasitarios

Estrategias de Control

Control biológico de nematodos gastrointestinales.

Manejo integrado de parásitos gastrointestinales.

Uso de **A. *Oligospora*** como controlador de nematodos gastrointestinales.

Dosis

Época de aplicación

- **Principales problemas metodológicos enfrentados.**

Los principales problemas metodológicos enfrentados correspondieron a la obtención de los inóculos en las primeras etapas del proyecto, lográndose solamente a los 6 meses de iniciado el trabajo, la causa correspondió al uso de trampas inadecuadas para estimular el desarrollo de los nematófagos, lo que en síntesis corresponde a introducir una cantidad adecuada de larvas que estimulen la reproducción del hongo y la producción de redes y anillos.

Durante el proyecto solamente se logro aislar e identificar cepas de A. oligospora, inicialmente se proponía aislar esta especie y también Duddingtonia flagrans, este hecho según el especialista de la U. Valparaíso, Eduardo Piontelli se debería a las condiciones ecológicas de los lugares donde se obtuvieron las muestras.

- **Adaptaciones o modificaciones introducidas durante la ejecución del proyecto, y razones que explican las discrepancias con la metodología originalmente propuesta.**

Las modificaciones más importantes son dos y corresponden por una parte a la utilización de nemátodos animales como trampas para estimular el desarrollo del hongo en los sistemas de cultivo. Inicialmente se había planteado el uso de nematodos Entomopatógenos obtenidos a partir de la crianza del lepidóptero *Galleria melonella*.

Por ora parte se había propuesto como método de entrega a los animales la introducción de los inóculos fúngicos en el agua de bebida de los ovinos, esto se modificó y se planteo el diseño y desarrollo de bloques minerales obtenidos por presión de mezclas minerales, vitaminas y cereales en conjunto con los conidioforos de A oligospora, introducido en concentraciones adecuadas al consumo animal, en esta misma línea se inició el desarrollo de cápsulas de lenta

1.4	Aislamiento de Hongos Nematófagos predatores de cada localidad.	Se logro el aislamiento de Hongos nematófagos a partir de fecas obtenidas de las zonas de pastoreo de cada localidad establecida para el desarrollo del proyecto.
1.5	Identificación de los hongos nematófagos aislados	La identificación de los hongos nematófagos se realizó de acuerdo a lo establecido en el texto del proyecto y la clasificación sistemática de los inóculos se realizó en el departamento de Micología del la facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso
	Reproducción masiva de hongos nematófagos en sustrato sólido	
2.0	Reproducción masiva en sustrato sólido, de los hongos predatores aislados de cada zona del ensayo.	De acuerdo a lo programado se logró la reproducción masiva en sustrato sólido, de los hongos predatores aislados de cada zona del ensayo.
2.1	Control de calidad de los hongos nematófagos	El Control de calidad de los hongos nematófagos en sus diferentes etapas se logro completamente. Los valores alcanzados se entregan en el capitulo de resultados tanto en pureza, concentración y viabilidad de las esporas.
2.1.1	Determinación del nivel de pureza	
2.1.2	Determinación de la concentración de conidias	
2.1.3	Determinación de la viabilidad de las esporas	
3.0	Evaluación in Vitro de la viabilidad de las esporas por medio del test de Tilley Terry	
3.0.1	Cuantificación del efecto de la digestión ruminal en la sobrevivencia de las esporas	Se realizó de la manera programada la cuantificación del efecto de la digestión ruminal en la sobrevivencia de las esporas.
3.0.2	Cuantificación del efecto de la digestión abomasal en la sobrevivencia de las esporas	Se realizó de la manera programada cuantificación del efecto de la digestión abomasal en la sobrevivencia de las esporas
3.0.3	Evaluación del grado de sobrevivencia de los hongos al término de cada proceso digestivo.	La evaluación del grado de sobrevivencia de los hongos al término de cada proceso digestivo, se realizó de acuerdo a lo programado.
3.1	Evaluación in vivo del grado de viabilidad de las esporas de los hongos que sobrevivieron la evaluación in Vitro	Esta actividad se realizó en su totalidad de acuerdo a lo programada
3.1.0	Reproducción de los hongos nematófagos que sobrevivieron el proceso digestivo in vitro	La esporas que superaron el proceso digestivo in vitro se reprodujeron para utilizarlas en el proceso de evaluación in vitro, esta actividad se llevo a efecto de acuerdo a lo contemplado en el proyecto.
3.1.1	Obtención de larvas de nematodos infestadas con hongos nematófagos.	La obtención de larvas de nematodos infestadas con hongos nematófagos se realizó de acuerdo a lo programado lográndose fotografiar diversa etapas en el proceso de infestación de las larvas por lo controladores de nemátodos.
3.1.2	Aislar y reproducir Hongos Nematófagos	Se aislaron y reprodujeron hongos nematófagos clasificados como A. oligospora para su aplicación en los ensayos, realizándose todo el proceso de control de calidad de los biopreparados como determinación del nivel

		de pureza, la concentración de conidias y viabilidad de las esporas
3.1.0.4	Evaluación de la información generada	La información generada a partir del análisis de la eficiencia de las capas identificadas permitió definir los ensayos de campo.
3.1.1	Establecimiento del ensayo	Los ensayos de campo realizados corresponden como base los proyectados en la propuesta inicial agregándose una unidad de replica en la Zona central en el predio Bandurrias en la localidad de Alcones, Sexta Región, donde se evaluó la aplicación en un rebaño comercial el efecto de la aplicación de los controladores.
3.1.2	Evaluación de la capacidad de las esporas excretadas en las fecas para reducir el número de larvas infectivas, mediante recuento de huevos y larvas fecales	La evaluación de la capacidad de las esporas excretadas en las fecas para reducir el número de larvas infectivas, mediante recuento de huevos y larvas fecales, se realizó de acuerdo a lo esperado enviándose las muestras fecales al laboratorio del Servicio agrícola y ganadero para el recuento de huevos. El recuento de larvas viables generadas a partir de fecas de animales tratados se obtuvo en el laboratorio del Centro de Educación y Tecnología
3.1.3	Aislamiento y evaluación de los hongos que sobrevivieron el tracto digestivo de los animales, mediante nemátodos trampa	El aislamiento y evaluación de los hongos que sobrevivieron el tracto digestivo de los animales, mediante nemátodos trampa se realizó de acuerdo a lo programado y propuesto en la metodología.
	Evaluación del efecto de los hongos nematófagos obtenidos, sobre la carga parasitaria de ovinos en Magallanes.	El proceso de Evaluación del efecto de los hongos nematófagos obtenidos, sobre la carga parasitaria de ovinos en Magallanes, se realizó aplicando la metodología establecida en la propuesta inicial según Baudena 2000.
4.0	Establecimiento del sistema de pastoreo para evaluar el efecto de los hongos	Durante el trabajo de investigación se diseñaron e implementaros 4 sistemas de pastoreo para evaluar el efecto de los hongos nematófagos: a) Ensayo con 30 animales en la estancia Josefina , dos grupos de 15 animales cada uno . b) Ensayo con 60 animales, cuatro grupos de 15 animales cada uno, para evaluar el efecto de cuatro combinaciones de aplicación del hongo nematófago incorporado en bloques de sales minerales. c) Ensayo en Predio Bandurrias con 400 animales donde se muestrearon 4 grupos con 15 animales cada uno introducidos dentro de la masa de 400 animales y un grupo control sin controlador.
4.1	Evaluación coproparasitaria de animales con y sin tratamiento con el hongo	Todos los animales tanto de los grupos testigos y tratados fueron evaluados desde el punto de vista coproparasitario para conocer el efecto sobre la carga parasitaria intestinal
4.2	Utilización de animales trazadores en los grupos de animales con y sin tratamientos	Se utilizaron animales trazadores tanto en el grupo tratado como testigo.
4.3	Evaluación coproparasitaria de los animales trazadores en grupos con y sin tratamiento con el hongo	Todos los trazadores que se utilizaron en la estancia josefina fueron analizados para comparar la tasa de infestación de estos animales en los potreros que mantuvieron animales tratados y testigos. Esta respuesta

		estuvo relacionada al efecto controlador de los controladores biológicos en la pradera.
4.4	Evaluación de la carga parasitaria de la pradera en sistemas tratados y sin tratar	Se evaluó de la carga parasitaria de la pradera en sistemas tratados y sin tratar de acuerdo al método propuesto en el documento original
4.5	Evaluación de las presentaciones del hongo nematófago.	Se evaluaron las presentaciones diseñadas para la administración del hongo nematófago.
	Escalamiento y definición de la presentación del hongo	Se desarrollo una presentación industrial del hongo nematófago evaluado.
5.0.1	Definición de formas comerciales	Se definió una forma comercial denominada Ecoblock-Bioenergy en dispositivos de 10 kilogramos
5.0.2	Patentación del producto y marcas comerciales	
	Transferencia y adopción de la tecnología, a través de la realización de seminarios en Magallanes.	

4.- Resultados:

1. Resultados finales obtenidos.

1.4- 1.5 Aislamiento e identificación de los Hongos Nematófagos predatores de cada localidad.

Cepas del genero Arthrobotrys clasificadas en el presente trabajo.

Del conjunto de cepas aisladas durante la investigación, las que presentaron un alto potencial de control, correspondieron a 18 de ellas, cuadro 1, pertenecientes al género Arthrobotrys, estas se obtuvieron tanto en la XII región como en diversas localidades de la zona central y sur del país en fecas de ovino, equino , alpaca, conejo, bovino y caprino. Todas ellas fueron clasificada s en la Cátedra de Micología de Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso.

Cuadro 1. Cepas de Arthrobotrys spp, con uso potencial en control biológico de nematodos de rumiantes, aisladas y evaluadas por el proyecto .			
	Cepa	Localidad	Especie
1	(9b) P. Arenas	E. Josefina-1	*A. superba* Duddington*
2	P. Arenas (Galpón)	E. Josefina-2	*A. oligospora* Fres. var. oligospora*
3	(9a) P. Arenas	E. Josefina-3	*A. superba**
4	Conejo (Colina)	CET-Colina	*A..oligospora* Fres. var. oligospora*
5	(4a) (Chimbarongo ovino)	VICONTO Chimbarongo	*A. oligospora* Fres. var. oligospora*
6	(Caballo Lampa	Lampa	*A. oligospora* Fres. var. oligospora*
7	1. Alpaca (Placilla)	Los Robles	*A. oligospora* Fres. var. oligospora*
8	2. Cabra	Caimanes	*A .oligospora* Fres. var. oligospora*
9	3. Casa blanca	Cordillera	*A. oligospora* Fres. var. oligospora*
10	4. Llama (Placilla)	Los robles 2	*A. oligospora* Fres. var. oligospora*
11	5. Oveja Catemu	Cerrillos	*A. oligospora* Fres. var. oligospora*
12	6. P. Arenas	Estepa	*A. oligospora* Fres. var. oligospora
13	7. Vaca Catemu	Cerrillos	*A. oligospora* Fres. var. oligospora
14	Cepa 1 equino	Temuco	*A. oligospora* Fres. var. oligospora
15	Cepa 11 equino	Lanco	*A. oligospora* Fres. var oligospora
16	Cepa 12 ovino	Lanco	*A. oligospora* Fres. var oligospora
17	Cepa 16 ovino	Puyehue	*A. oligospora* Fres. var oligospora
18	Cepa 17 ovino	Pucón	*A. oligospora* Fres. var oligospora

2. Reproducción masiva de los aislados de hongos nematófagos depredadores.

Control de calidad de los hongos reproducidos en sustratos sólidos deshidratados.

El control de calidad de los biopreparados es fundamental, este permite establecer la cantidad de sustrato a incorporar en la dieta animal o en las mezclas minerales y cereales para su administración a los animales.

El control de calidad de los biopreparados considera la concentración de conidias por gramo de sustrato seco, viabilidad y pureza de estas. Propiedades que se han establecido en el producto seco deshidratado que se empleo en los ensayos.

Cuadro 3. Control de calidad del bio-preparado durante la investigación, rangos de concentración y viabilidad.

Sustrato	Concentración de conidias/g de sustrato	Viabilidad de las conidias	Pureza
Avena/Arroz/avena partida	3-5 x 10^8	87-88%	***

*** Baja presencia de Piptocephalis sp.

Se observa una alta concentración de conidias y un adecuado nivel de viabilidad o germinación de las esporas rehidratadas. La contaminación con piptocephalis es la que presenta mayor frecuencia y disminuyó en la medida que los inóculos se obtuvieron de cultivos cada vez más limpios.

3. Evaluación *in vitro* e *in vivo* del efecto de los procesos digestivos de ovinos, sobre la viabilidad de las conidias de hongos nematófagos.

3.0 Evaluación *in vitro* del grado de viabilidad de los hongos atrapa nemátodos luego de ser sometidos al método de Tilley Terry.

Establecimiento del número de esporas que atraviesan el tracto gastrointestinal a través del método de Tilley-Terry.

Los diversos aislados que presentaron un interesante potencial de control en el presente trabajo, se sometieron a la digestión *in vitro* a través del método de Tilley Terry para conocer la capacidad de los ellos de atravesar el tracto gastrointestinal y ejercer su efecto en el contenido fecal una vez que ingresen en la pradera, los resultados se expresan en el cuadro siguiente, se aprecia una reducción en la sobrevivencia de las esporas sometidos al tratamiento, posteriormente las esporas con resistencia al efecto de la digestión ruminal y gástrica constituyen la para la generación de nuevos inóculos con capacidad de control que deben se testeados con animales.

Cuadro 4. Evaluación in vitro de la resistencia exhibida por los diferentes aislados del género Arthrobotrys a la digestión ruminal y gástrica, a través del método de Tilley Terry

Cepas aisladas del género Arthrobotrys	Concentración inicial de esporas de los diferentes aislados del hongo	Concentración final de esporas de los hongos evaluados, después del método de Tilley Terry
(9b) Pta.Arenas	1.0×10^7 esporas/ml	1.0×10^6 esporas/ml
(9a) Pta. Arenas	7.5×10^6 esporas/ml	1.0×10^6 esporas/ml
Conejo (Colina)	7.5×10^6 esporas/ml	2.0×10^3 esporas/ml
(4a) Chimbarongo ovino	5.0×10^6 esporas/ml	1.5×10^5 esporas/ml
Caballo Lampa	5.0×10^6 esporas/ml	1.7×10^5 esporas/ml
(4b) Pta Arenas (Galpón)	2.5×10^6 esporas/ml	2.0×10^5 esporas/ml
1. Alpaca (Placilla)	3.8×10^7 esporas/ml	6.0×10^3 esporas/ml
2. Cabra	1.5×10^7 esporas/ml	5.0×10^3 esporas/ml
3. Casa blanca	2.8×10^7 esporas/ml	6.0×10^3 esporas/ml
4. Llama (Placilla)	2.2×10^7 esporas/ml	4.0×10^3 esporas/ml
5. Oveja Catemu	1.4×10^7 esporas/ml	8.5×10^3 esporas/ml
6.*Pta Arenas (oveja)	1.8×10^7 esporas/ml	0
7. *Vaca	1.5×10^7 esporas/ml	0

En el cuadro anterior se aprecia que en cada una de las cepas evaluadas bajo el método de Tilley Terry, una cantidad relevante de esporas, sobre 10^5 esporas por ml, supera la digestión ruminal y la etapa enzimática y ácida del método. Sin embargo, se puede evidenciar que cepas con alta capacidad de control de larvas de nematodos in vitro, (ver cuadro 2) como los aislados 6 y 7 no son capaces de atravesar el tracto gastrointestinal y su presencia post digestión es nula.

3.1 Evaluación in vivo del grado de viabilidad de las esporas de los hongos que presentaron el mejor nivel de sobrevivencia y viabilidad en ensayo in vitro.

Ensayos en Parcela de Experimentación Centro de Educación y Tecnología

A) Evaluación del comportamiento de tres niveles de concentración de esporas entregadas por vía oral a los animales

Se estableció a nivel de campo un ensayo para evaluar tres niveles de administración de esporas, en medio líquido, a ovinos en tratamiento, con el objeto de evaluar la capacidad de las conidias excretadas para reducir el número de larvas infectivas presentes en las fecas. Para ello se trabajo con diferentes grupos de animales:

(G1) Animales con tratamiento antiparasitario
(G2) Animales con tratamiento con el hongo nematófago
(G3) Animales sin tratamiento, testigo
(G4) Animales sin tratamiento, testigo

De cada combinación de grupos de animales, se toman 7 gramos de fecas más vermiculita, al 5° día del ensayo, se incuban por 7 días a 25°C y luego se montan las fecas en cámara húmeda y se observa el número de nemátodos emergidos de cada combinación de fecas.

3.1.2 Evaluación Coproparasitaria de los ovinos utilizados en esta fase del proyecto.

Cuadro 5. Resultados del análisis coproparasitario en 12 ovinos de experimentación en el predio de Centro de Educación y Tecnología.

Nº	Huevos tipo estrongylos	M.expansa	Coccideas
1	Neg.		
2	50		
3	neg		Positivo
4	neg		
5	neg		Positivo
6	neg	Moniezia spp.	Positivo
7	neg		
8	neg		
9	neg	Moniezia spp.	Positivo
10	neg		
11	neg		
12	neg		

En el cuadro anterior se aprecia el bajo nivel de parasitismo observado en los animales en el ensayo realizado en el predio del Centro de Educación y Tecnología, este hecho se debió corroborar con una necropsia parasitaria, en ella no se encontraron parásitos adultos

Nº promedio de nemátodos eclosionados en mezcla de fecas de grupo de animales con distintos tratamientos

Cuadro 6 . N° de nemátodos obtenidos de mezcla de fecas provenientes de grupos de animales con diferentes tratamientos (tres repeticiones por mezcla fecal)			
Mezcla fecal	Presencia promedio de larvas L3 en muestras de 7 gramos de fecas tratadas.		
	Concentración 10^5 conidias/ Kg peso vivo	Concentración 10^6 conidias/ Kg peso vivo	Concentración 10^8 conidias/ Kg peso vivo
G1 + G2	1.33	1.33	0.00
G2 + G3	2.66	2.33	1.00
G2 + G4	3.33	2.00	1.33
G3 + G4	6.33	6.00	2.66
G1+ G3	5.33	5.33	1.66
G1 +G4	6.00	4.33	2.00

En el cuadro anterior se aprecia el contenido de larvas L3 presentes en las diversas combinaciones de tratamientos consideradas en el ensayo, observando una clara tendencia a la reducción de las poblaciones de larvas, en las variantes o combinaciones donde se utilizó el hongo nematófago y con una disminución más marcada en la concentración mayor. Sin embargo, se debe destacar que dada las bajas poblaciones de nematodos encontradas en los animales en prueba, cuadro 5, los cambios esperados en términos de reducción de larvas no son tan notables como los obtenidos en placa.

3.1.3 Evaluación de la capacidad de los hongos ingeridos, de sobrevivir el tracto digestivo de los animales, a través del uso de nemátodos trampa

Evaluación a nivel fecal, de tres diferentes concentraciones de esporas por Kg de peso animal, al paso del tracto digestivo de los animales, después de cuatro días de suministro del controlador

Cuadro. 7 Porcentaje promedio de la presencia de conidióforos a nivel fecal, después de cuatro días de suministro del hongo en tres diferentes concentraciones, (cinco replicas por animal)

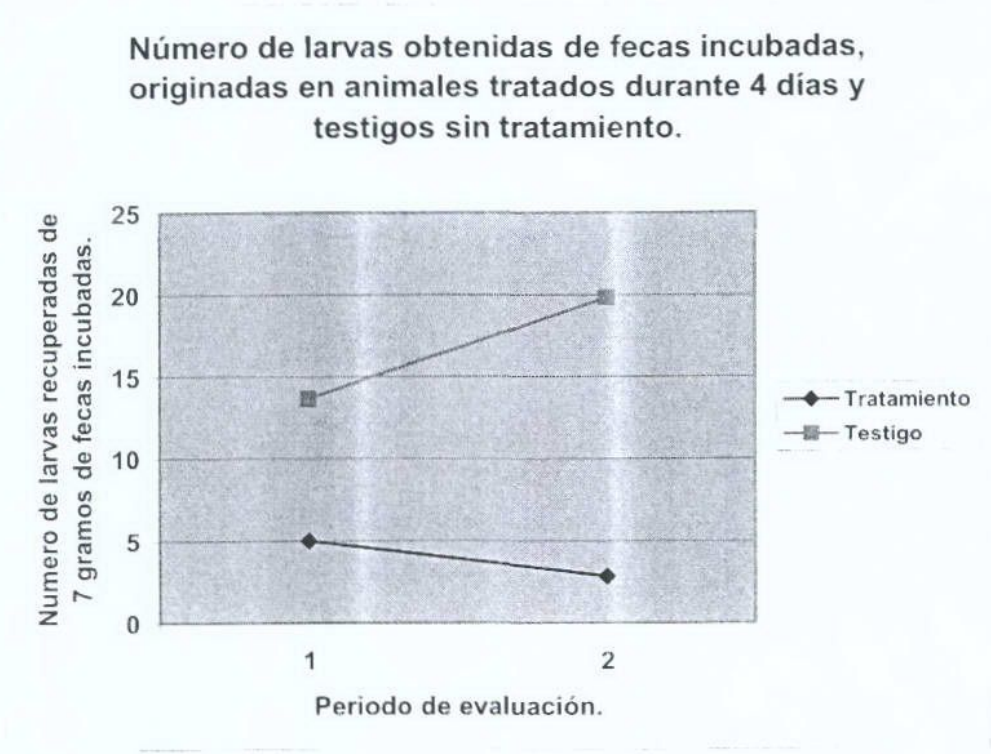
		Concentración 10^5 esporas/kg peso animal	Concentración 10^6 esporas/kg peso animal	Concentración 10^8 esporas/kg peso animal
	Animal	**Porcentaje presencia**	**Porcentaje presencia**	**Porcentaje presencia**
Tratamiento con antiparasitario	A	0	20	20
	B	0	0	0
Tratamiento con hongo	C	20	60	80
	D	20	80	80
Tratamiento testigo	E	0	0	0
	F	0	20	0
	G	0	0	0
	H	0	0	0
	I	0	0	0
	J	0	0	0

Evaluación de presencia de colonias en 2 gr. de fecas por placa y tres repeticiones Correspondientes a colonias detectadas a los 10 días de incubación, solamente en la superficie fecal y medio de cultivo

El cuadro anterior refleja el efecto de una dosis baja de aplicación. Los animales tratados (C y D) presentan un porcentaje muy bajo presencia de *Arthrobotrys* a los 10 días de incubación, por lo tanto es un nivel de aplicación poco apropiado al objetivo de controlar nematodos a nivel fecal. Situación que cambia radicalmente a medida que aumenta la concentración de conidias ingerida por los animales.

3.1.2 Evaluación de la capacidad de las conidias excretadas para reducir el número de larvas infectivas presentes en las fecas

Gráfico 1.



1: primer dia de tratamiento.

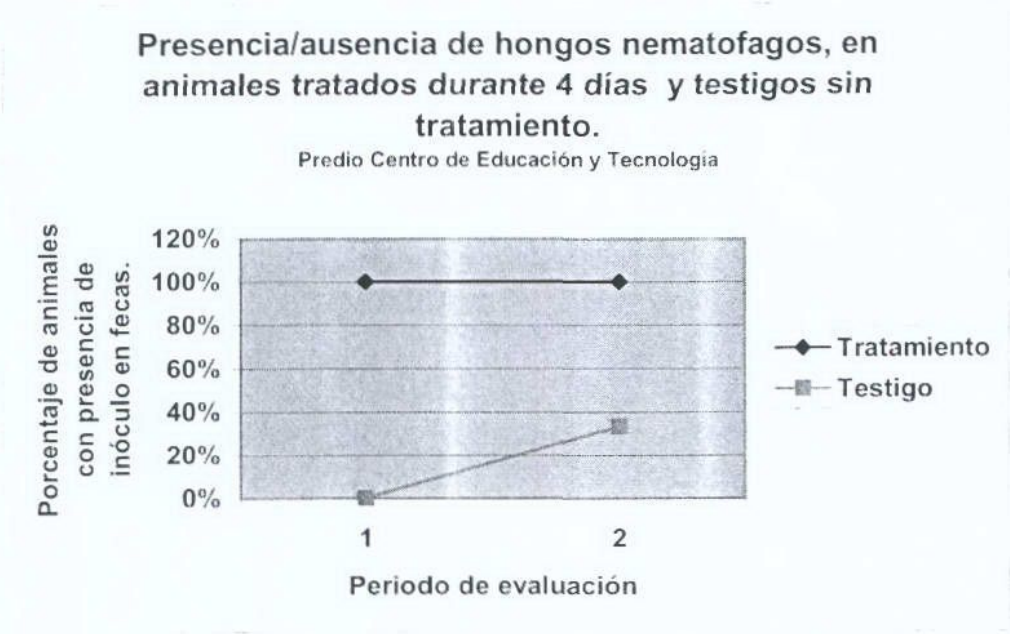
2: cuarto dia de tratamiento

En el gráfico 1, se aprecia el número de larvas recuperadas a partir de fecas incubadas, que se obtuvieron desde de animales tratados y testigos, apreciándose una clara tendencia al alza de ellas, en los animales sin tratamiento y un descenso en los animales tratados.

3.1.3 Evaluación de la capacidad de los hongos ingeridos, de sobrevivir el tracto digestivo de los animales, a través del uso de nemátodos trampa

Evaluación a nivel fecal, de tres diferentes concentraciones de esporas por Kg de peso animal, al paso del tracto digestivo de los animales, después de cuatro días de suministro del controlador

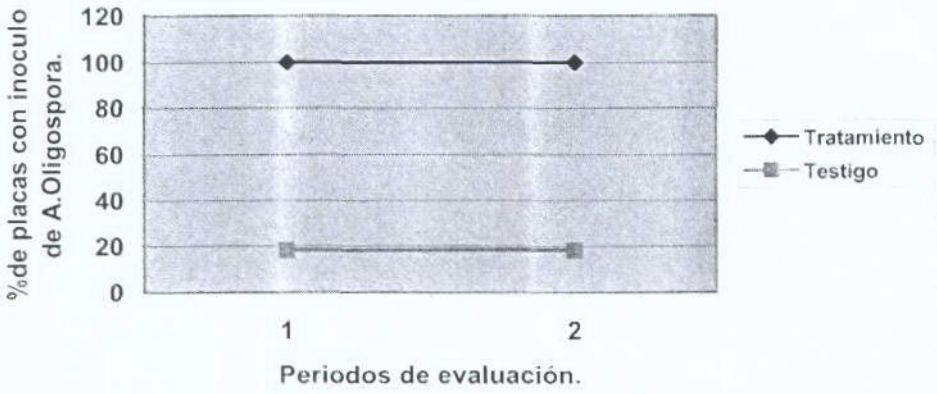
Gráfico 2.



En el grafico 2, se aprecia el porcentaje de placas con la presencia de hongos aislados de fecas ovinas de animales tratados y testigos, el 100% de las muestras obtenidas de animales tratados presenta la presencia de A. oligospora y solo un 18,8 % de los testigos lo que corresponderia al nivel de las poblaciones de hongos nativos, presentes en el sistema de pastoreo en el predio del Centro de Educación y Tecnología.

Grafico 3

Porcentaje de placas con recuperación de A.oligospora, en muestras fecales de ovinos tratados durante 28 dias con *A.oligospora*.

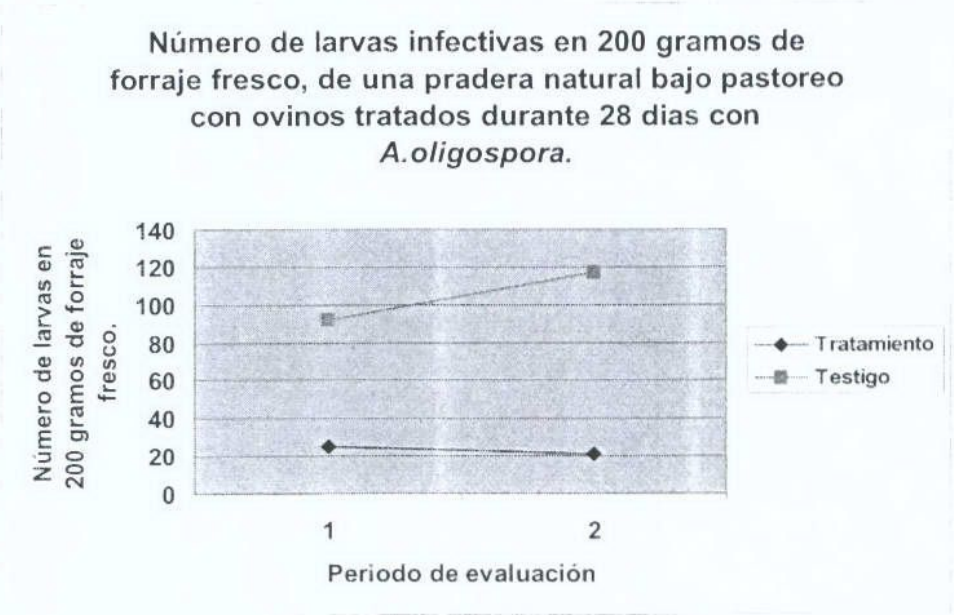


Se debe destacar que los resultados en este caso estuvieron influidos por el tratamiento que esta pradera ha tenido por dos años consecutivos, recibiendo animales con tratamiento y testigos en los mismos potrerillos, lo que ha llevado a que el hongo controlador se encuentre en una situación de endemismo, destacando además que este predio se ha mantenido con manejo agropecuario orgánico durante 27 años, lo que también favorece el comportamiento regulador de los nematófagos sobre las poblaciones de larvas en la pradera. En el grafico 3, se aprecia que en un 100 % de los animales que reciben el hongo, es posible recuperar el inoculo en las fecas, sin embargo en un 33% de los animales no tratados también se encuentra el controlador que corresponde a la presencia de cepas nativas que se han incrementado en el sistema dado su manejo orgánico, sin embargo serían insuficientes para lograr un control eficiente.

3.1.4 Evaluación del efecto de los hongos nematófagos en el número de larvas presentes en la pradera

En el gráfico siguiente se aprecia el numero de larvas infectivas recuperadas desde la pradera, apreciándose un incremento en el sector de los animales no tratados y una disminución en el potrerillo donde se han asignado los animales bajo tratamiento con A. oligospora.

Grafico 4.



C) Diseño, elaboración y evaluación de bloques minerales como vehiculos de administración de hongos nematófagos en rumiantes en pastoreo.

Tercer ensayo

3.1.5 Diseño, elaboración y evaluación de bloques minerales

Se obtuvo una formulación que permite su utilización en el campo, esta soporta la manipulación, transporte y consumo animal sin alterarse, es decir sin fracturarse o degranularse, condiciones mínimas de utilización y de comercialización una vez que el dispositivo este totalmente validado, por otra parte dada las condiciones físicas y de palatabilidad presenta una tasa de consumo de 52 gramos por animal.

La mezcla diseñada para administración de los controladores se sometió a análisis proximal y de digestibilidad en diversos periodos, el primero de ellos en el laboratorio de Nutrición de la facultad de Agronomía de la P. Universidad Católica de Chile, y se estableció la siguiente composición:

Cuadro 8. Composición proximal y digestibilidad de los bloques minerales utilizados

como vehiculo del controlador biológico *A. oligospora*			
Análisis	**Unidad**	**MS***	**SA****
Humedad	%	-	10,5
Materia seca	%	89.5	-
Ceniza	%	39.7	35.6-
Fibra Cruda	%	3.1	2.7
Extracto Etéreo	%	1.1	1.0
Proteína Cruda	%	6.7	6.0
Fibra detergente Acido	%	10.5	9.4
Fibra detergente Neutro	%	16.3	14.6
Energía Bruta	cal/g.	2578.6	2309.0
Energía Digestible	Kcal/k	1832.4	1640.7
Energía Metabolizable	Kcal/k	1502.6	1345.4
Calcio	%	9.53	8.54
Fósforo	%	3.16	2.83

* Expresado 100% materia seca, ** Expresado en base seca al aire

La mezcla utilizada en el periodo 2006 se sometió a análisis proximal y de digestibilidad en el laboratorio de Nutrición de la facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile.

Cuadro 9. Composición proximal y digestibilidad de los bloques minerales utilizados como vehiculo del controlador biológico *A. oligospora*

Análisis	Unidad	MS 100%*	MS 97.05%
Humedad	%	-	2.95
Ceniza	%	42.07	40.83
Fibra Cruda	%	1.05	1.00
Extracto Etéreo	%	1.15	1.12
Proteína Cruda	%	6.85	6.65
Fibra detergente Neutro	%	8.54	8.29
Fibra detergente Acido	%	6.40	6.22
Energía Metabolizable	Kcal/k	2.09	2.03
Calcio	%	11.40	11.06
Fósforo	%	3.90	3.78
Cobre	mg/kg	64.4	62.5
Hierro	mg/kg	3153.0	3060.0
Mn	mg/kg	283.4	275.0
Mg	mg/kg	0.44	0.43
Potasio	%	1859	1800
Sodio	%	0.75	0.73
Zn	%	172,591	167,500
PS	%	4,198	4,074
S	%	0.196	0.190

En esta oportunidad los bloques fueron manufacturados introduciendo microelementos a partir de un núcleo mineral desarrollado por la empresa **ECOFOS,** La presentación de los bloques se hizo en 10 y 12 Kg.

3.1.6 Evaluación del comportamiento de los hongos nematófagos incorporados en los bloques.

Cuadro 10. CONTROL DE CALIDAD DE LOS HONGOS NEMATÓFAGOS EMPLEADOS PARA LA ELABORACIÓN DE BLOQUES	
Concentración de esporas/gramo de sustrato seco (avena-arroz)	**2.3×10^{10} esporas/g**
Viabilidad de las esporas	**86%**
Pureza	**100%**

Los hongos nematófagos reproducidos en sustrato sólido, fueron incorporados a bloques de 5 Kg. en cantidad de 200 gramos por bloque, los que fueron inicialmente mezclados con melaza para permitir una mejor homogenización y distribución en la mezcla. Una vez secos, los bloques, se tomaron muestras de ellos, las que fueron molidas y luego sembradas en placas de agar agua, para observar su crecimiento. Se realizaron tres repeticiones de 6 bloques, encontrando en el 100% de las placas un abundante crecimiento del hongo, primero, sobre el sustrato de los bloques y luego cubriendo todo el medio de la placa. Por lo tanto el hongo no se ve afectado en su crecimiento por los componentes de la mezcla constituyente de los bloques, aparentemente existiría un efecto estimulador en el crecimiento del biocontrolador.

Hongos creciendo sobre material obtenido de los bloques formulados.

La evaluación que se realizó para determinar el número de unidades formadoras de colonias por gramo de bloque indicó que cada gramo presenta 6.2×10^{9} esporas/gramo esta cantidad es superior a la que reporta la literatura para preparados de esta naturaleza, la dosis efectiva que diversos autores proponen es de 10^{6} esporas por kilogramo de peso vivo animal.

Lo expuesto anteriormente indica que el dispositivo de administración del biocontrolador se podría mejorar en el sentido de ajustar la dosis entregada, esta disminución se puede realizar bajando la concentración de conidias en el preparado o incrementando la dureza de los bloques de administración del biopreparado.

3.1.7 Evaluación a nivel de campo, con animales en experimentación, sobre el nivel de aceptación y consumo de los bloques

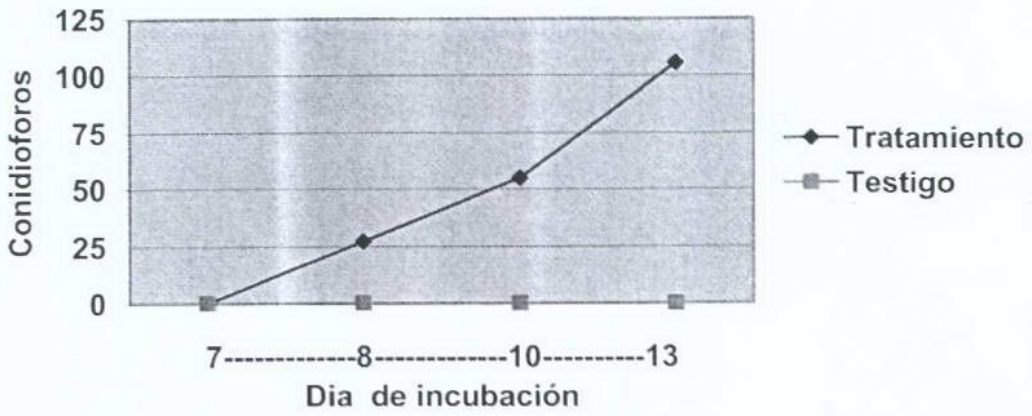
Se logró un consumo por ovino, de 52 gramos diarios de la mezcla mineral en bloque, que contiene el controlador biológico, esto significa que cada ovino consumió diariamente 1,97 /gramos de sustrato fúngico con una concentración de $3,2*10^{10}$ conidias por gramo, esto permite el consumo por kilogramo de peso y por día de $1,26*10^{9}$ esporas, nivel adecuado si se piensa que la literatura propone 10^{6} esporas por kilo de peso animal. Desde del punto de vista económico lo indicado es bajar la concentración de esporas y lograr un mayor volumen de mezcla para hacer más eficiente la generación de dispositivos de aplicación del controlador.

Ovinos consumiendo un bloque mineral, este elemento tiene gran palatabilidad y los animales lo consumen con gran fuerza, por esto hay que mantenerlos fijos al comedero. En al foto se observa como los animales lo retiraron del contenedor.

3.1.8 Evaluación del comportamiento de los hongos nematófagos, incorporados en los bloques, al proceso digestivo de ovinos en pastoreo.

Grafico 5.

Unidades formadoras de colonias de *Arthrobotrys oligospora*, en 2 gramos de fecas ovinas incubadas en agar-agua después de 7 dias de consumo de 52 grs/dia de bloque mineral, inoculado con el hongo nematófago.



En el gráfico anterior se aprecia el nivel que alcanzan las Unidades Formadoras de Colonias de *A .oligospora*, en fecas ovinas incubadas, esto significa que el bloque mineral es un buen vehículo de administración de las esporas del biocontrolador a los ovinos en tratamiento.

D) Diseño y evaluación del comportamiento de cápsulas intrarruminales de digestión que permita la entrega gradual de los hongos nematófagos, para el control de nemátodos en rumiantes.

Cuarto ensayo.

3.1.9 Diseño y evaluación del comportamiento de cápsulas intrarruminales.

2.-Fabricación de las formulaciones de los bolos intrarruminales

El diseño y elaboración de los dispositivos intrarruminales finalmente evaluados, se basaron en Gelucire 50/02, el que fue seleccionado por su bajo BHL, lo que indica una baja hidrofilicidad, con lo que se obtuvo una erosión lenta. De acuerdo con los resultados que se obtuvieron, se usó Compritol, Precirol, Avicel y lactosa spray dried para fabricar las diferentes formulaciones y modular la entrega de las esporas

3.1.10 Evaluación de la resistencia de las diferentes formulaciones a la digestión ruminal.

Las formulaciones con Gelucire 50/02 y Precirol y Compritol mostraron un retardo excesivo en la entrega de las esporas (Tabla 1), alcanzando valores inferiores al 3% de erosión en 7 días. Al comparar la misma formulación, con o sin esporas, no se aprecia una diferencia significativa en la erosión de la matriz

. **Formulaciones con Gelucire 50/02 y Precirol y Compritol**

Cuadro 11. Digestión ruminal de cápsulas desarrolldas en base a Gelucire 50/02 y Precirol y Compritol				
Cambio peso (grs)de cápsulas intrarruminales.				
	Peso inicial	Peso final húmedo	Peso Seco	Cambio de Peso
Fechas	31-ene	06-feb	07-feb	
A Con esporas	23,0931	23,0639	22,7787	0,3144
A Sin esporas	20,0803	19,5935	19,433	0,6473
β Con esporas	21,2677	21,2872	21,001	0,2667
β Sin esporas	20,241	20,1543	19,9977	0,2433

For mulaciones con Gelucire 50/02, Avicel, lactosa spray dried e incorporando afrechillo tamizado.

Cuadro 12. Cambio de peso de capsulas formuladas en base a Gelucire 50/02, Avicel,

lactosa spray dried e incorporando afrechillo tamizado Grs.					
Fechas	**20/04/06**	**26/04/06**	**28/04/06**	**13/05/06**	**15/05/06**
Identificación	**Peso inicial**	**Peso húmedo post-rumen**	**Peso seco al aire grs.**	**Peso húmedo post-rumen.**	**Peso seco al aire grs.**
J	17,73	17,94	17,64	18,66	16,67
K	16,85	17,15	16,81	17,70	16,67
L	18,07	18,38	18,06	19,17	18,19
M	17,58	17,66	17,39	18,38	17,43
N	18,90	15,43	14,62	0	0
O	15,36	15,57	15,11	16,18	15,12

De acuerdo con el comportamiento observado en las formulaciones de la Tabla anterior, se incorporaron diferentes sustancias que pueden acelerar el proceso de erosión y, en consecuencia, la entrega de las esporas. Se consideró también la incorporación de afrechillo, tamizado para uniformar el tamaño de las partículas, como una forma de proveer de un sustrato susceptible de ser atacado por el líquido ruminal. Los resultados obtenidos hasta este momento indican que pequeñas variaciones en la fórmula generan cambios muy drásticos en el proceso de erosión, lográndose formulaciones que siguen entregando muy poco (j,k,l,m,o) y una que resiste menos de 2 semanas (n).

Del análisis de las fórmulas empleadas hasta ahora, es posible deducir que utilizando mezclas de Gelucire se puede lograr un control intermedio, que permita generar un proceso de erosión gradual en 2 meses

3.1.11 Evaluación de la concentración de esporas en cápsulas intrarruminales.

Evaluación de la concentración de esporas en las cápsulas intrarruminales.

Cuadro 13. Concentración de esporas *A. oligospora* por gramo de cápsula

Identificación cápsula	Fecha	Esporas por gramo
1	15/02/2006	$1,0 \times 10^{8}$
A	30/03/2006	$7,2 \times 10^{7}$
B		$6,7 \times 10^{7}$
A	04/04/06	1.6×10^{8}
B		4.6×10^{7}
C		2.8×10^{7}
D		1.8×10^{7}

En el cuadro anterior se aprecia la concentración de esporas por gramo de cápsula utilizado en el ensayo, esta concentración se obtiene de material extraído de cada dispositivo lo quie indica que el hongo no sufre alteraciones de la viabilidad en el proceso de confección de las cápsulas.

3.1.12 Evaluación del uso de cápsulas intrarruminales en ovinos.

- **A) Liberación de esporas *in vivo***

Cuadro 14. Evaluación de la presencia del hongo *A. oligospora* en fecas de animales tratados con Cápsulas intrarruminales

	Fechas de evaluación con cápsulas				
Fechas de evaluación	**3/03/06**	**11/03/06**	**18/03/06**	**25/03/06**	**01/04/06**
Ovinos Tratados	**20%**	**20%**	**20%**	**20%**	**20%**
Ovinos Testigo	**0%**	**0%**	**20%**	**0**	**0**

En el cuadro anterior, se presenta el nivel de recuperación de esporas a nivel fecal en animales tratados con cápsulas intrarruminales administradas con lanzabolos, se aprecia un nivel constante en los animales a los que se les administró el dispositivo. Se puede concluir que las formulaciones utilizadas en esta etapa del ensayo no son degradadas a nivel ruminal y solo un 20% de los animales presenta esporas a nivel fecal.

Se espera modificar estas formulaciones de manera que tengan un porcentaje mayor de entrega del contenido de la matriz que constituye su estructura.

B) Segunda Evaluación de cápsulas intrarruminales en ovinos en pastoreo.

Cuadro 15. Cambio de peso en capsulas intrarruminales de digestión lenta, evaluación en un cordero fistulado. (gramos)

Cápsulas	Peso inicial	Concentración esporas	8 dias	16 días	24 días	35 días
3	17.92	3.06×10^7	13.28	5.40	4.16	3.45

En el cuadro anterior se aprecia el resultado obtenido a partir de la formulación de capsulas en base a Gelucire en que se logra la permanencia de las cápsula en bolsas de Nylon de uso intrarruminal durante 35 días, esta digestión es distinta al uso in vivo en animales sin fistular, debido a la mantención en las bolsas de nylon, de fracciones de las cápsula producto de la fractura de estas, por la acción de la biología del rumen y de la actividad peristáltica ruminal.

Liberación de esporas a partir de cápsulas intrarruminales de digestión lenta y recuperación a nivel fecal en ovinos en pastoreo

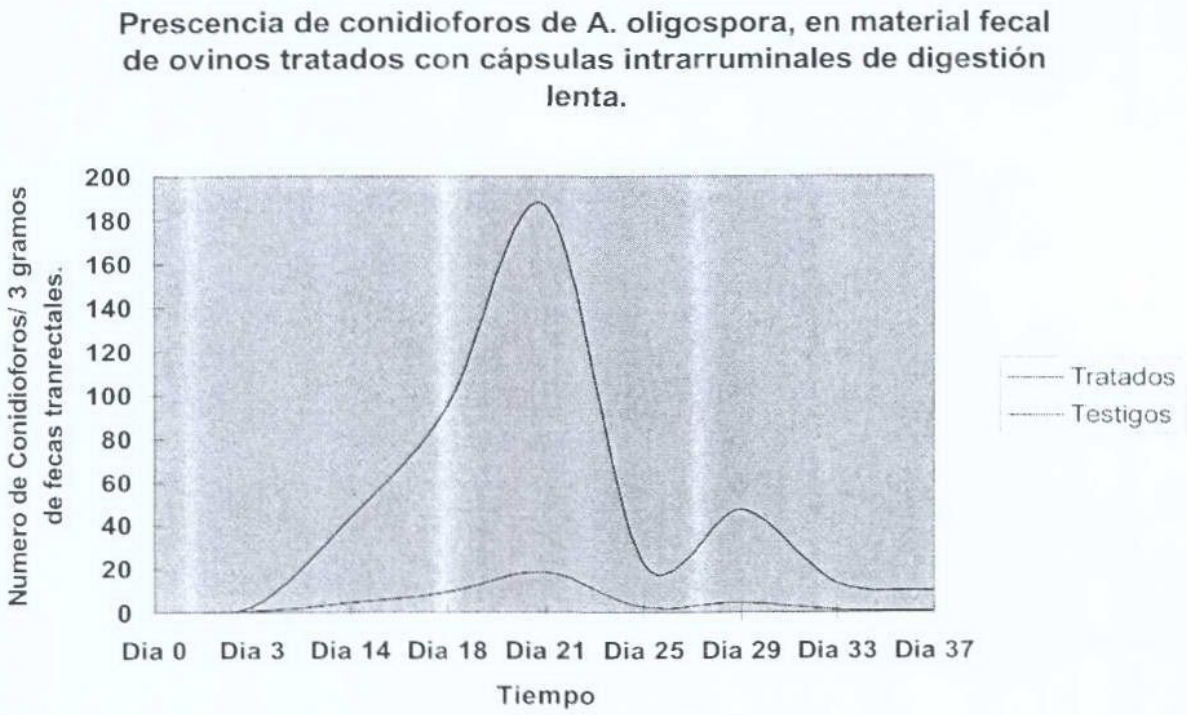
Cuadro16. Cantidad de conidioforos presentes por animal y muestreo en tratamiento de ovinos con cápsulas intrarruminales con el hongo *A.oligospora* y sin él

Ovinos Tratados									
Animal	Día 0	Día 3	Dia 14	Día 18	Día 21	Día 25	Día 29	Día 33	Día 37
1	0	2	2	87	51	28	6	11	27
3	0	4	87	160	49	0	178	17	70
5	0	7	20	89	204	17	109	25	0
7	0	0	0	18	67	11	0	0	0
9	0	0	166	105	642	33	0	0	0
11	0	0	0	91	0	11	0	0	0
13	0	0	0	98	117	0	75	0	0
15	0	0	0	0	39	77	0	11	0
17	0	10	46	122	493	0	0	0	0
19	0	0	113	177	201	49	103	72	0
Valor Medio	0	2.3	43.4	94.7	186.3	22.6	47.1	13.6	9.7
Ovinos Testigos									
Animal	Día 0	Día 3	Día 14	Día 18	Día 21	Día 25	Día 29	Día 33	Día 37
2	0	3	0	0	0	18	0	0	0
4	0	0	13	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	52	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	39	0	0	0	0	0
Valor medio	0	0.3	1.3	3.9	0	7	0	0	0

(tres repeticiones por animal y 3 gramos de fecas por repetición en cada muestreo)

En los cuadros anteriores se aprecia la dinámica de liberación de las conidias incorporadas en las capsulas de digestión lenta, se aprecia que los conidias estuvieron presentes a partir de las 72 horas de muestreo y se incrementó su presencia a nivel fecal hasta los 21 días de tratamiento, para luego descender exponencialmente. Esta condición de degradabilidad es insuficiente para administrar el hongo como tratamiento controlador de larvas L3, de nematodos parásitos de rumiantes. Dada esta característica se deberá endurecer e impermeabilizar la estructura de la matriz de las cápsulas en experimentación, de modo de prolongar el efecto de los nematófagos a nivel de la pradera, que debe llegar a 60 días.

Grafico 6.



En el gráfico anterior se puede ver el comportamiento de las capsulas intrarruminales de digestión lenta en cuanto a la liberación de esporas y su recuperación a nivel fecal. Este comportamiento es diferente al establecido en la bolsa de Nylon de uso intrarruminal ya que en esta condición los pequeños fragmentos de la cápsula permanecen retenidos liberando esporas por mayor tiempo, 35 días. Grafico 7.

4. **Evaluación del efecto de los hongos nematófagos obtenidos, sobre las poblaciones de larvas de tercer estado de nemátodos en la pradera y sobre la carga parasitaria en ovinos en pastoreo de cada zona participante en el proyecto, Magallanes.**

4.0 Establecimiento del sistema de pastoreo comparativo para evaluar el efecto del hongo nematógfago.

La primera serie de análisis coproparasitarios se realizó sobre animales centinelas para conocer la evolución de la carga parasitaria del rebaño, encontrándose cargas bajas a lo largo del primer año del ensayo. Como se verá en el desarrollo de la investigación, en la medida que el sistema se intensificó se produjo a lo largo del tiempo, un incremento tanto del número de huevos por gramo e fecas como en el número de larvas en la pradera.

Resultados del análisis coproparasitarios en 10 ovinos centinelas, en la Estancia Josefina

Cuadro 17. Presencia de Nemátodos tipo estrongylus en 10 ovinos centinelas en la Estancia Josefina.

			Fechas de análisis				
	20/07/02	31/08/02	11/9/02	20/10/02	09/11/02	20/12/02	20/1/03
17	Neg.	neg.	neg.	Neg	neg.	Neg	Neg
53	Neg.	neg.	neg.	Neg	neg.	Neg	Neg
52	50	50	neg.	Neg	neg.	Neg	Neg
97	150	150	neg.	Neg	neg.	Neg	Neg
102	Neg.	neg.	neg.	Neg	neg.	Neg	Neg
31	Neg.	neg.	neg.	Neg	neg.	Neg	100hpg
61	Neg	50	neg.	Neg	neg.	Neg	100hpg
62	Neg.	150	neg.	100 hpg	neg.	100hpg	Neg
54	Neg.	neg.	500	Neg	neg.	Neg	Neg
39	Neg	100	neg.	Neg	neg.	Neg	Neg
*	*	*	*	*	*	*	*

* Todas las muetras preentaron cantidades variables de coccideas

En los análisis realizados inicialmente en la estancia se tomo un grupo de animales y se pesquisó la presencia de Huevos tipo estrongylos, Nematodirus, Moniezia sp., Capilaria, Trichuris, y formas Coccideas. Solamente de detectaron las formas expuestas en la tabla. La carga parasitaria fue permanentemente muy baja. (la causa parece ser la baja carga animal del potrero y el manejo general de los animales).

I) Primer ensayo Magallanes: Estancia Josefina (2003-2004)

Sustrato sólido, cereales.

4.1. Consumo del hongo nematófago producido en sustrato sólido.

Los animales consumieron 200 gramos diarios de avena, inoculada con *A. oligospora* en el caso de los 15 ovinos del grupo tratado. Los testigos solo recibieron 200 gramos de avena. En la primera etapa del periodo de adaptación a los granos se presentó un episodio de diarreas que se controló distribuyendo los cereales de manera de evitar la competencia y permitir un consumo homogéneo.

4.2 Evaluación del peso de los animales en los grupos de animales en pastoreo

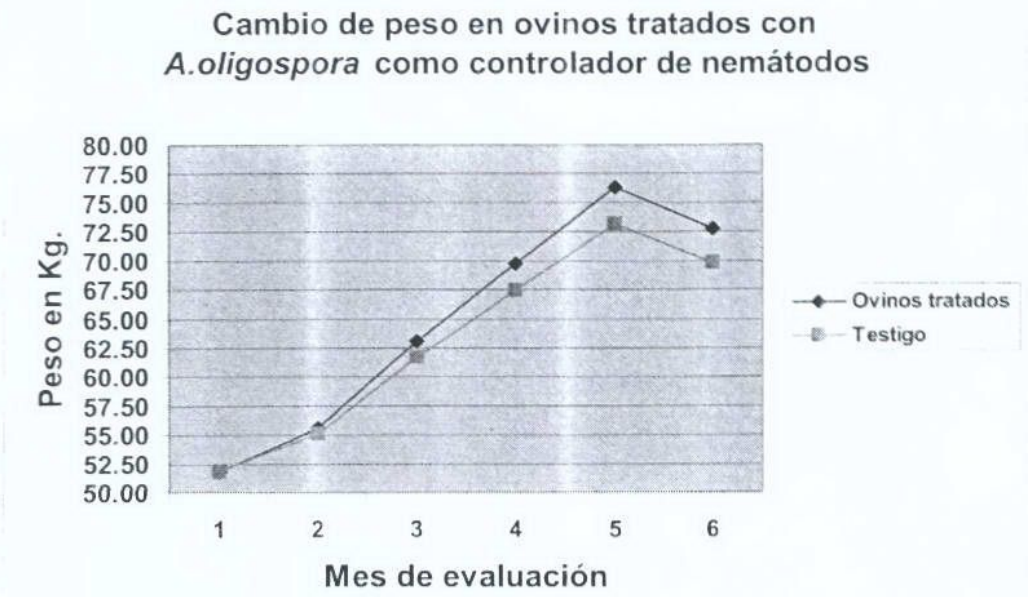
En el cuadro siguiente, se aprecia que se ha generado una diferencia de peso de 3 Kg. en promedio, por animal tratado respecto de los testigos. Desde el comienzo de la evaluación se produce una diferenciación del peso entre los dos grupos de animales. Sin embargo estos grupos respecto del peso no son estadísticamente diferentes.

Cuadro 18. Cambio de Peso en 15 ovinos tratados con *A. oligospora* en dosis de 2 gramos por animal con una concentración de 2,5 *10 ^{8} esporas por gramo de preparado.

Tratamiento	DICIEMBRE 2003	ENERO 2004	FEBRERO 2004	MARZO 2004	ABRIL 2004	MAYO 2004
Ovinos tratados *A. Oligospora*	51,80±4.35	55.56±4.24	63.07±4.24	69.70±4.45	76.33±4.84	72.80±4.21
Grupo Testigos	51.87±3.40	55.13±3.52	61.66±3.86	67.43±4.23	73.20±4.66	69.80±4.83.

ANOVA P>=0,05

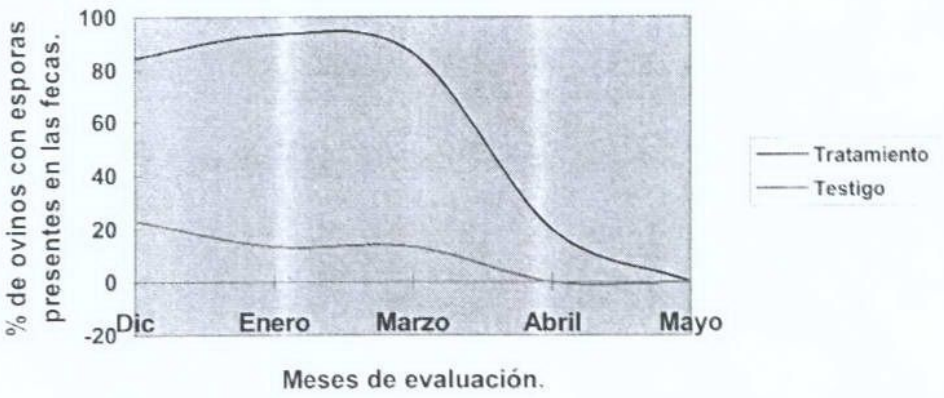
Grafico 8.



En el grafico 8. se aprecia el cambio de peso que ocurre en los animales durante el periodo de pastoreo, entre el mes de Enero y Marzo, en que se entregan los controladores. Se aprecia un aumento de la diferencia de peso entre ambos grupos. A partir de Abril se inicia una baja de peso debido a la disminución de la temperatura ambiental y al cambio en la disponibilidad de forraje.

4.3 Evaluación de la sobrevivencia de los hongos nematófago obtenidos, al paso gastrointestinal de los animales.

Presencia de A. oligospora %,en las fecas de dos grupos de 15 ovinos, tratados y testigos.



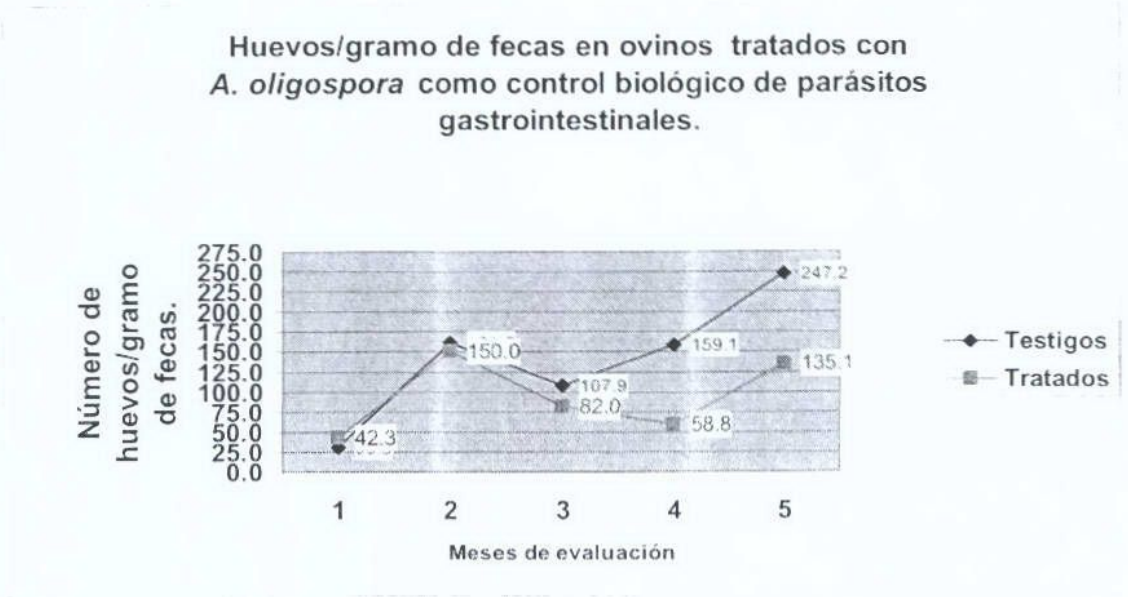
En el gráfico 9 se destaca la diferencia entre los dos grupos de ovinos evaluados en cuanto a la presencia o ausencia de ***A. oligospora*** en la muestras fecales, obtenidas transrectalmente, apreciándose una alta presencia en los animales tratados, sobre un 80% durante el periodo de aplicación. También en los animales testigos aparecen nematófagos en las fecas, correspondiendo a los controladores que naturalmente existen en el sistema pastoril evaluado.

4.4 Evaluación Coproparasitaria de los grupos de animales en pastoreo.

4.4a . A cada grupo se le realizó mensualmente una evaluación coproparasitaria para determinar la cuenta de huevos por gramo de fecas y conjuntamente se evaluó el número de larvas de tercer estado que aparecieron en las fecas luego de la incubación.

Recuento de Huevos en las fecas ovinas.

Gráfico 10.



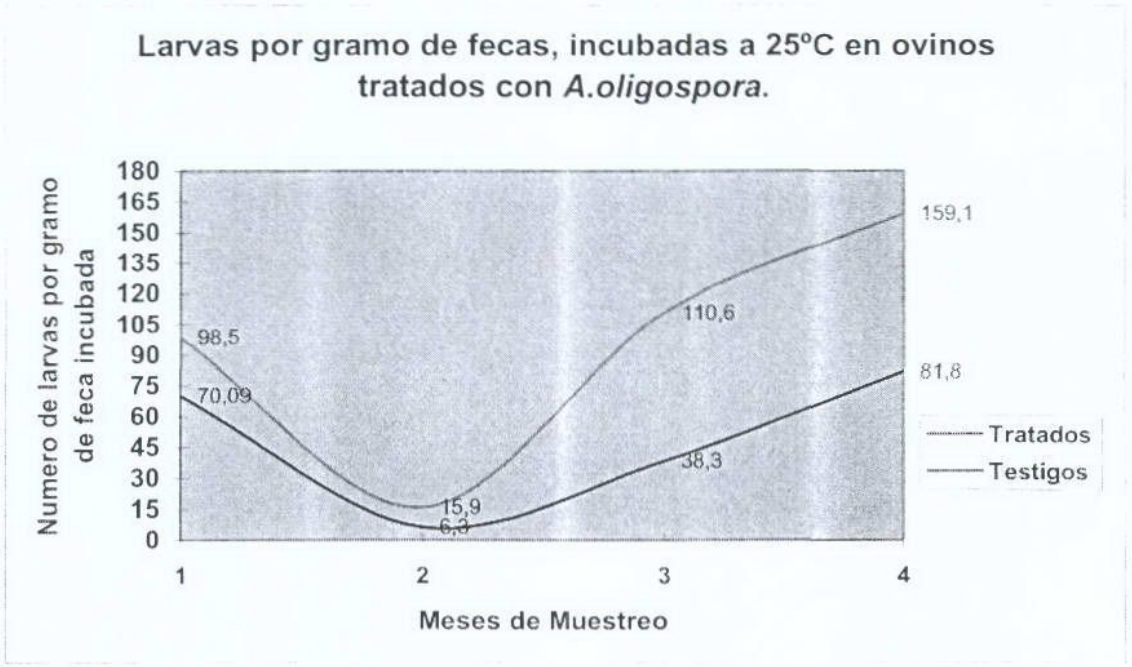
P<0.05 Test de rangosos multiples (Testigos estadisticamente diferentes de tratados en los dos últimos meses de tratamiento)

En el grafico 10, se aprecia la evolución del recuento de huevos tipo estrongylus (Haemonchus, Ostertagia Trichostrongylus, Cooperia, Oesophagostomun, Bunostomun ,Chabertia), por gramo de fecas en ovinos tratados con ***A. oligospora*** y en el grupo testigo que no recibió el tratamiento. El efecto sobre el número de huevos no es tan marcado como sobre las larvas infectivas sobre la pradera, esto se debe a que el controlador no actúa a nivel intestinal, es probable que el menor número de huevos se deba a un envejecimiento y a una baja de la fertilidad de los parásitos adultos a nivel intestinal en los animales tratados, que se contaminan a una menor tasa que los ovinos sin tratamiento.

Recuento de larvas en las fecas ovinas.

En el grafico siguiente se aprecia la evolución del número de larvas obtenidas a partir de fecas ovinas incubadas a 25°C, se destaca una menor recuperación de larvas a partir de los animales tratados ya que la presencia de los nematófagos en las muestras fecales, realiza un control de los estados infectivos de los nematodos gastrointestinales. En el recuento de larvas, a partir de su obtención en trampas de agua, solo se pueden contabilizar las que escapan al control del hongo nematófago.

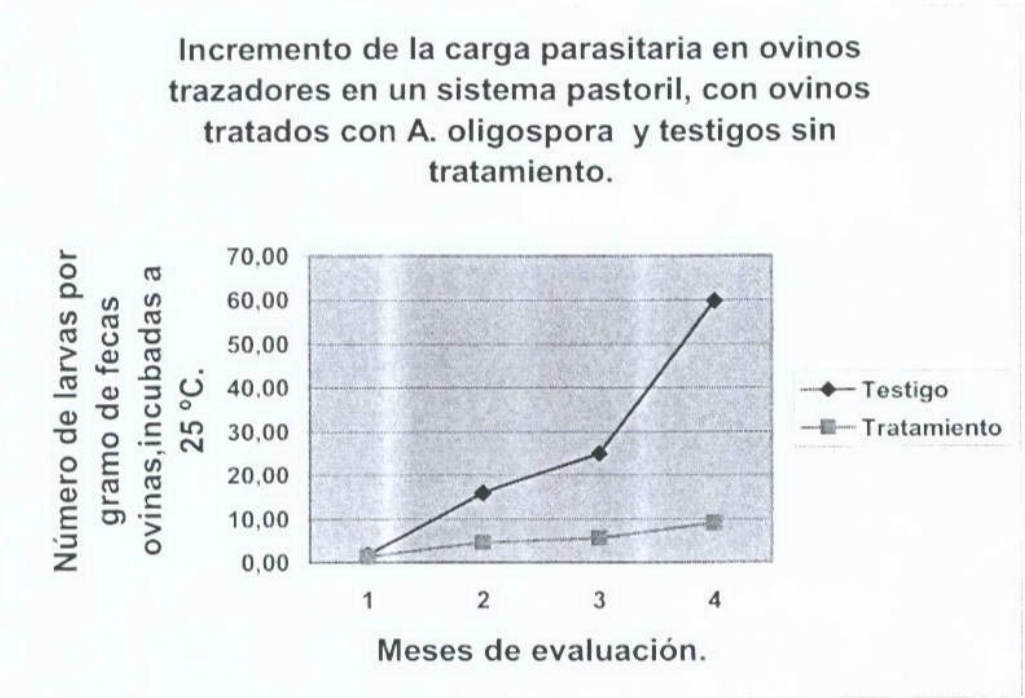
Gráfico 11.



4.4 b. Utilización de animales trazadores en el grupo de animales pastoreando sin tratamiento fúngico y con tratamiento fúngico antiparasitario.

Tasa de infestación en ovinos trazadores.

Grafico 12.



En el grafico 12, se aprecia el incremento en la infestación parasitaria en ovinos trazadores, presentes en el grupo bajo tratamiento con ***A. oligospora*** y sin el biocontrolador. De especial interés es la disminución en la tasa infestación en el grupo tratado, hecho que se expresa a través de la obtención de un número menor de huevos y larvas por gramo de fecas.

Los ovinos trazadores considerados en este grafico son los que se mantuvieron por todo el periodo de pastoreo, por lo tanto representan la evolución de la carga en todo el sistema, tanto el grupo tratado como testigo.

En los gráficos siguientes, 13 y 14, se entrega la información obtenida a partir de 2 periodos de incorporación de trazadores, ingresados al sistema en Marzo y Abril, de 2003 constatándose como en el caso anterior, que los animales del sistema tratado presentan una menor tasa de infestación, esto por el control que ejercen los hongos sobre el número de larvas infestantes sobre la pradera. Mensualmente se incorporaron 4 trazadores, 2 en cada grupo del ensayo.

Gráfico 13.

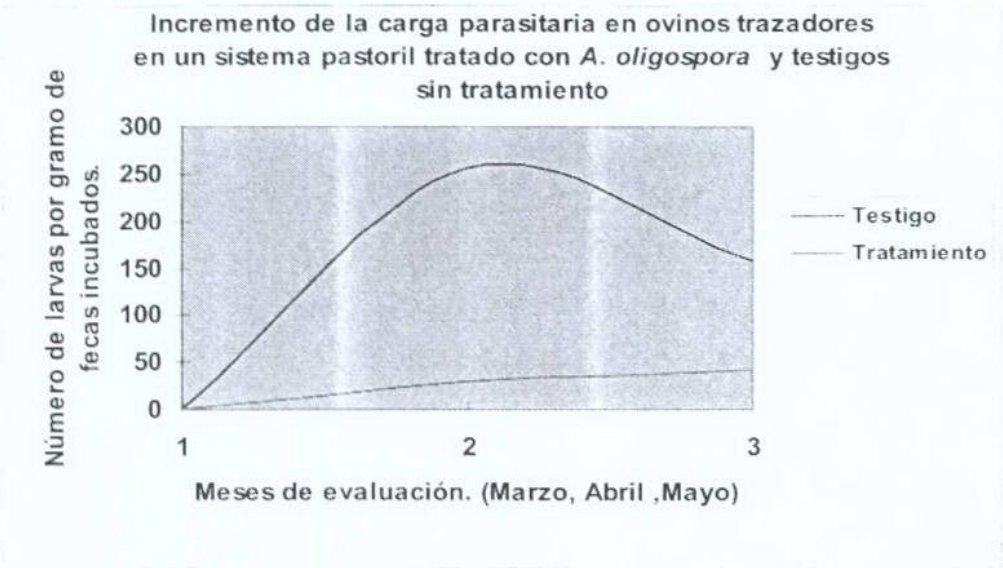
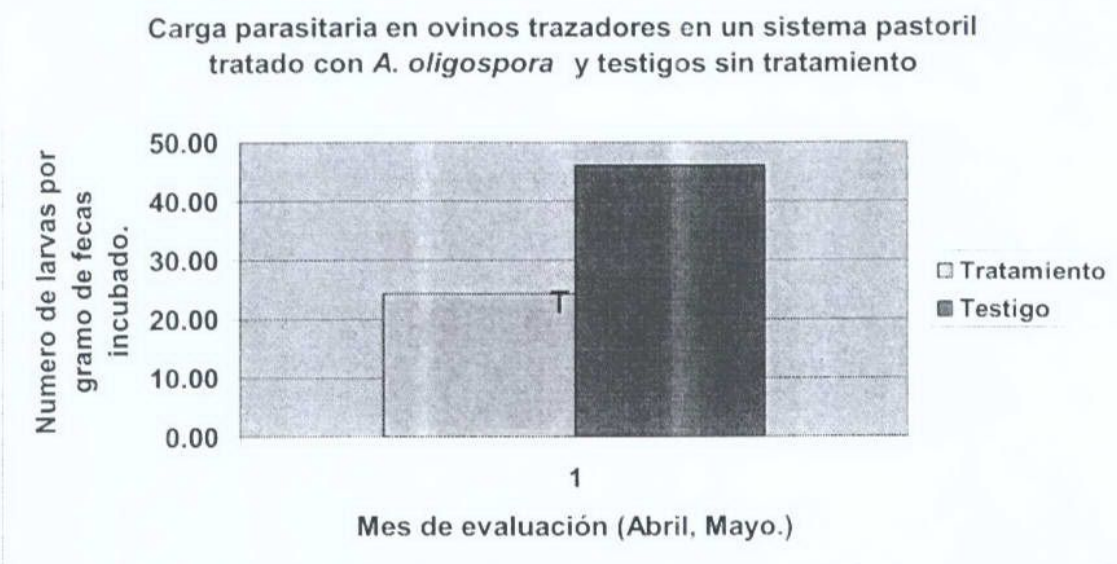


Gráfico 14.



En el grafico 14, se aprecia la diferencia en el número de larvas obtenidas a partir de las fecas de los trazadores incorporados en el último periodo de evaluación.

4.5 Recuento de larvas infectivas en la pradera natural en pastoreo con ovinos tratados y testigos.

Cuadro 21. Recuento de larvas de tercer estado de nemátodos gastrointestinales, presentes en una pradera natural de 4 has. Dispuesta en dos potrerillos.

(Cada lote fue utilizado con un grupo de 15 ovinos machos, (Corriedale*Merino*Milschaf), correspondientes a Testigos y tratados con A. oligospora, y 12 ovinos trazadores.)

Cuadro 20. Recuento de larvas de tercer estado de nemátodos gastrointestinales, presentes en una pradera natural. (Larvas por 200 grs. de forraje fresco)

Zona de muestreo	DICIEMBRE	ENERO	MARZO	ABRIL	MAYO
TESTIGO					
Nº larvas / 200 gr. forraje					
Ladera		43.22	24	14.44	S/I
Zona depresional		56.44	45.26	33.70	49.11
Zona depresional hidromórfica.		28.87	16.81	22.5	86.11
Promedio tres zonas	31.67	42.85a	28.72a	23.43[a]	67.61a
TRATAMIENTO NEMATOFAGOS					
Nº larvas / 200 gr. Forraje					
Ladera control		10.71	13.04	2.89	S/I
Zona depresional.		21.0	15.41	2.89	25.73
Zona depresional hidromórfica.		6.46	3.89	2.89	28.70
Promedio tres zonas,	33.66	12.72b	10.78b	2.89b	27.31b
Eficiencia de control %		70.3	62.46	87.6	59.60

Test de Duncan P<0.05 (a: b indican diferencias estadísticas)

S/I: sin información por baja de la disponibilidad de forraje

En el cuadro anterior se aprecia el cambio en el número de larvas infectantes en la pradera bajo pastoreo, a lo largo del periodo en el cual se realizó el ensayo, apreciándose una eficiencia en

el control de larvas de tercer estado de hasta un 87.6%. en el mes de Marzo, cuando se completó el periodo de tratamiento.

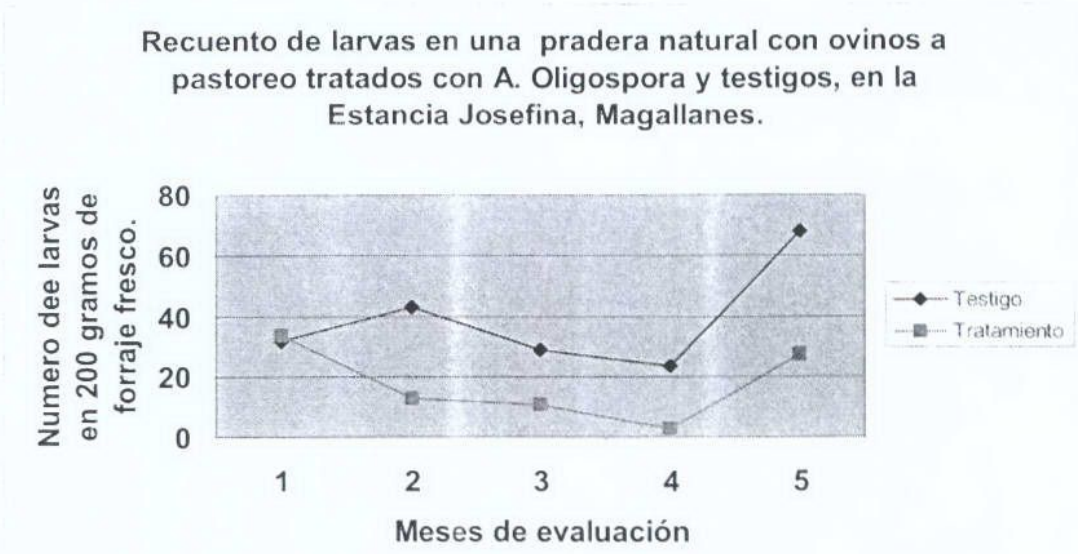
Cuadro 21 . Evolución del número de larvas infectivas en una pradera natural con ovinos tratados con *A. oligospora* como controlador.

Larvas L3 / 200 gr. de forraje fresco

	Diciembre	Enero	Marzo	Abril	Mayo
Testigo	31,67a	31,77±13.2a	28,72±16.7a	23,43±12.3a	69,9 1±17a
Tratamiento	33,66a	9,20±4.8b	10,78±9b	2,89±1,4b	27,31±3.0b

Test Duncan P<0.05 (a; b indican diferencias significativa)

Gráfico 15.



En el cuadro 21 y gráfico 24, se presenta la evolución del número de larvas infectantes en la pradera natural, en la estancia Josefina, con ovinos tratados con ***A. oligospora.*** La evolución general corresponde al comportamiento de las poblaciones de larvas en la pradera, observándose sobre ese patrón una disminución en el número de individuos infectivos en la pradera donde se ubicaron y pastorearon los animales tratados.

II) Segundo ensayo Magallanes: Estancia Josefina (2005).

Bloques minerales

4. Evaluación del efecto de los hongos nematófagos, sobre las larvas de tercer estado de nemátodos en la pradera y sobre la carga parasitaria en ovinos en pastoreo, Estancia Josefina.

4.1 Evaluación del nivel de consumo de los bloques minerales en los cuatro grupos de corderos en pastoreo

Consumo de bloques minerales en cuatro grupos de corderos en pastoreo.

Los animales fueron expuestos a los bloques a partir del 8 de Febrero, entre esta fecha y el 1 de marzo los animales consumieron trazas de los bloques minerales, por lo tanto se determinó incluir animales con experiencia en el uso de este tipo de elementos, estableciéndose a partir del mes de Marzo un consumo creciente, que se hizo mayor en el mes de Abril, estimándose que el consumo se realizo en un 30 % en el mes de Marzo y el 70 % en el mes de Abril.

Cuadro 22. Consumo total de Bloques Minerales, Kg., en un periodo de 60 días en cuatro grupos de 15 corderos en pastoreo.

	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
Consumo Marzo	4.8	4.2	9.68	11.45
Consumo Abril	11.2	9.8	22.48	26.71
Consumo Total Kg.	16	14	32.16	38.16

Grupo A: Bloque mineral sin Nematófago, Grupo B: Bloque mineral sin nematófago +Antiparasitario Panacur®; Grupo C: Bloque mineral con nematófago; Grupo D: Bloque mineral con nematófago +Antiparasitario Panacur®;

Cuadro 23.Consumo promedio de Bloques minerales, gr./día en un periodo de 60 días de pastoreo en 4 grupos de 15 corderos en pastoreo.

Grupos Ensayo	A	B	C	D
Gr./día	17,9	20,5	41,8	49,5

Grupo A: Bloque mineral sin Nematófago, Grupo B: Bloque mineral sin nematófago +Antiparasitario Panacur®; Grupo C: Bloque mineral con nematófago; Grupo D Bloque mineral con nematófago +Antiparasitario Panacur®;

4.2 Evaluación del peso de los animales en los grupos de animales en pastoreo

Peso de los animales tratados con *A. oligospora* administrado en Bloques minerales de 20,8 k. Los animales testigos recibieron solamente bloques minerales sin utilizar el controlador biológico.

Los animales que participaron del ensayo se destetaron en el mes de Febrero y se incorporaron en los potreros asignados al ensayo, en este ciclo de pastoreo, se trabajó con animales jóvenes que son de mayor sensibilidad al parasitismo, de manera de conocer el efecto del controlador biológico en esta categoría de ovinos, a diferencia del ciclo anterior en que se trabajó con carnerillos.

Cambio de Peso en 4 grupos de 15 ovinos tratados con *A. oligospora* administrado en bloques minerales a libre disposición con una concentración de 2.5 *10 ^{7} esporas por gramo de mezcla mineral y carbohidratos administrada en bloque.

Cuadro 24. Cambio de peso en 4 grupos de 15 ovinos consumiendo bloques minerales como mecanismo de administración del hongo controlador de nemátodos, *A. oligospora*.

Meses /Grupo	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
Febrero	21,00±1.1	21,73±1.3	21,80±1.3	22,07±1.4
Marzo	25,54±1.1	25,30±1.6a	26,86±1.4c	26,38±1.8c
Abril	26,46±1.45	26,00±1.98a	27,87±2.13c	27,54±2.67c
Mayo	28,50±1.51	28,00±2.31a	29,20±2.57	30,08±2.29c
Ganancia de peso en el periodo.	7,50	6,27	7,40	8,01
Diferencia Kg. Con testigo		-1,23	-0,10	0,51
Diferencia con testigo %		-16,4	-1,3	6,80

Letras diferentes indican diferentcias signig;ficativas P<=0.05

Grupo A: Bloque mineral sin Nematófago, Grupo B: Bloque mineral sin nematófago + Antiparasitario Panacur®;

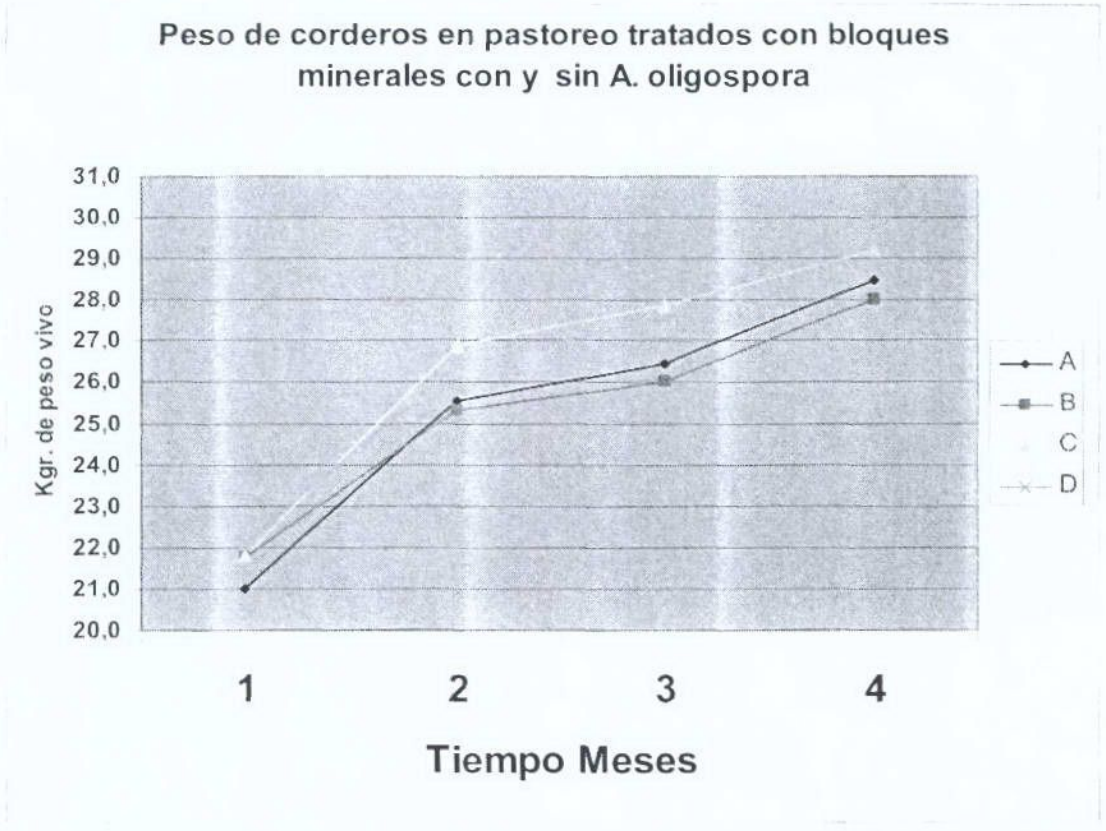
Grupo C: Bloque mineral con nematófago ;Grupo D Bloque mineral con nematófago + Antiparasitario Panacur®;

En el cuadro de cambio de peso, se aprecia que se ha generado una diferencia de peso de 0,51Kg. en promedio, por animal tratado, del grupo D respecto del testigo. En el caso del Grupo C La diferencia es de -0,10 Kg. en cuanto al Grupo B hay una diferencia negativa de -1,25 kg.. Esto al final del periodo de pastoreo, 1° de Mayo.

Respecto del consumo del dispositivo con sales minerales, tanto con hongos nematófagos como sin estos, en las observaciones de campo se aprecia, que este es irregular en el tiempo, entre los animales, y a lo largo del periodo de pastoreo, incrementándose en la medida que baja la cantidad y calidad del forraje.

Es posible también inferir, que una parte de la diferencia en el cambio de peso de los animales del grupo De debe al mayor consumo de energía y minerales.

Grafico 16.



Grupo A : Bloque mineral sin Nematófago, Grupo B: Bloque mineral sin nematófago +Antiparasitario Panacur®; Grupo C : Bloque mineral con nematófago ;Grupo D Bloque mineral con nematófago +Antiparasitario Panacur®;

En el gráfico anterior se aprecia el cambio de peso que ocurre en los animales durante el periodo de pastoreo, entre el mes de Febrero y Mayo. El consumo del biopreparado se produce en los meses de Marzo y Abril en que se entregan los controladores.

4.3 Evaluación de la sobrevivencia de los hongos nematófago obtenidos, al paso gastrointestinal de los animales

Presencia o ausencia del inoculo en las fecas ovinas, en animales con tratamiento y sin el.

Cuadro 25. Presencia o ausencia del inoculo (%) *A. oligospora* en 4 grupos de ovinos tratados con el biopreparado controlador de larvas

	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
Febrero	0	0	0	0
Marzo	13	0	54	0
Abril	0	0	76.5	25
Mayo	0	0	75.7	27

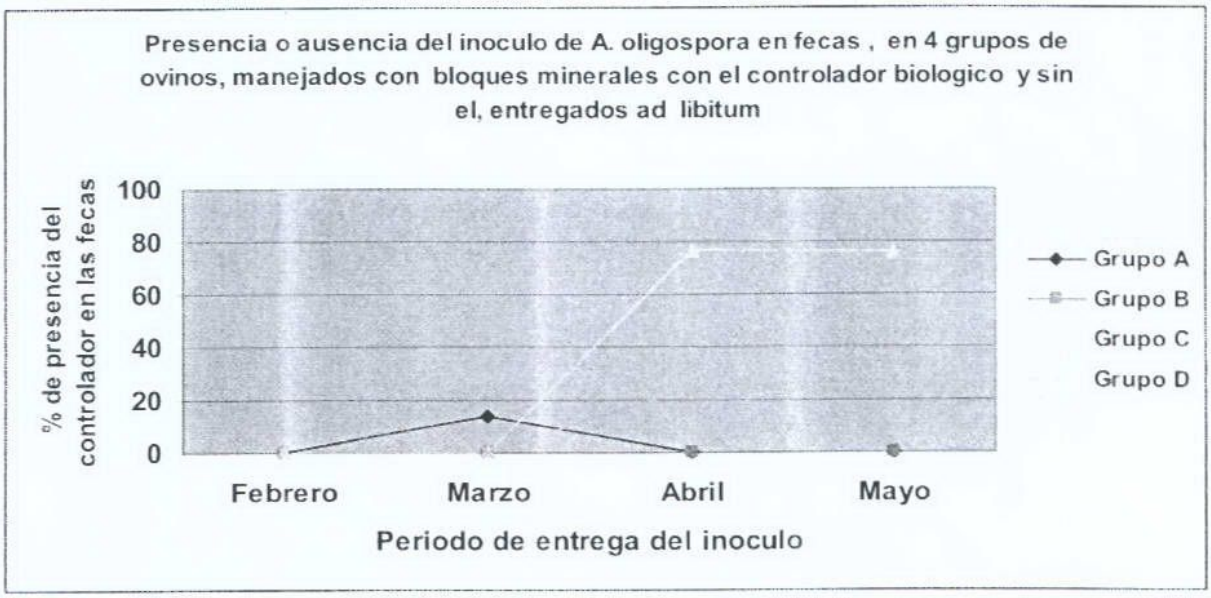
Grupo A : Bloque mineral sin Nematófago, Grupo B: Bloque mineral sin nematófago +Antiparasitario Panacur®; Grupo C: Bloque mineral con nematófago;Grupo D Bloque mineral con nematófago +Antiparasitario Panacur®;

Durante el presente año los resultados en este ámbito han sido variables, este efecto se debe a que los dispositivos minerales son consumidos a voluntad por los animales. Este consumo no es homogéneo por lo cual, la obtención de inoculo en las fecas va cambiando, los animales van consumiendo periódicamente el bloque de manera aleatoria, lográndose presencias de hasta un 75.7 %, valor que es mas bajo que el alcanzado en el ensayo del año anterior En el cuadro 10, se aprecia la presencia o ausencia del inoculo en las fecas animales, constatándose una aparición creciente del inoculo durante el tratamiento, esto permite afirmar que efectivamente el hongo corresponde al tratamiento y no un aumento de la presencia de controladores naturales en la zona, sin embargo no tiene el mismo nivel de aparición que en el ciclo anterior.

En esta temporada hay dos hechos que dificultaron la acción de los biocontroladores, la primera fue el tamaño de los bloques que dificultó el aprendizaje y el consumo de los corderos y la segunda causa, fue la dureza de los dispositivos.

Este Hecho nos lleva a buscar una alternativa distinta de aplicación del hongo. La tecnología necesaria se desarrollará en conjunto con la facultad de Química y Farmacia de la U de Chile, esta corresponde a cápsulas intrarruminales de liberación lenta, que aseguren la incorporación del inoculo al contenido digestivo de todos los animales y en una dosis homogénea, regulada en su aplicación de acuerdo al peso de cada animal. Este dispositivo intrarruminal corresponde a cápsulas de alto peso específico que permanecen en el piso de sistema reticulo-ruminal, liberando gradualmente las esporas de manera que se incorporen de forma constante en el contenido fecal que finalmente se introduce a la pradera..

Grafico 17.



Grupo A : Bloque mineral sin Nematófago, Grupo B: Bloque mineral sin nematófago +Antiparasitario Panacur®; Grupo C: Bloque mineral con nematófago;Grupo D Bloque mineral con nematófago +Antiparasitario Panacur®;

En el gráfico anterior se destaca la diferencia entre los dos grupos de ovinos evaluados, en cuanto a la presencia o ausencia de ***A. oligospora*** en la muestras fecales, obtenidas transrectalmente, apreciándose una mayor presencia en los animales tratados, de hasta un 75.7 % durante el periodo de aplicación. Se aprecia por otra parte, que en los animales testigos aparecen nematófagos nativos en las fecas, estos corresponden a organismos que naturalmente existen en los sistemas pastoriles.

4.4 Evaluación Coproparasitaria de los grupos de animales en pastoreo

Recuento de Huevos en las fecas ovinas.

El recuento de huevos se efectuó en el Laboratorio de parasitología del Servicio Agrícola y Ganadero, en la Estación lo Aguirre. Se debe destacar la colaboración prestada por los profesionales de esa institución. Los análisis realizados constituyeron un servicio especial otorgado al proyecto por parte del Servicio Agrícola y Ganadero ya que este centro dejó de otorgar prestaciones de esta naturaleza a organismos privados.

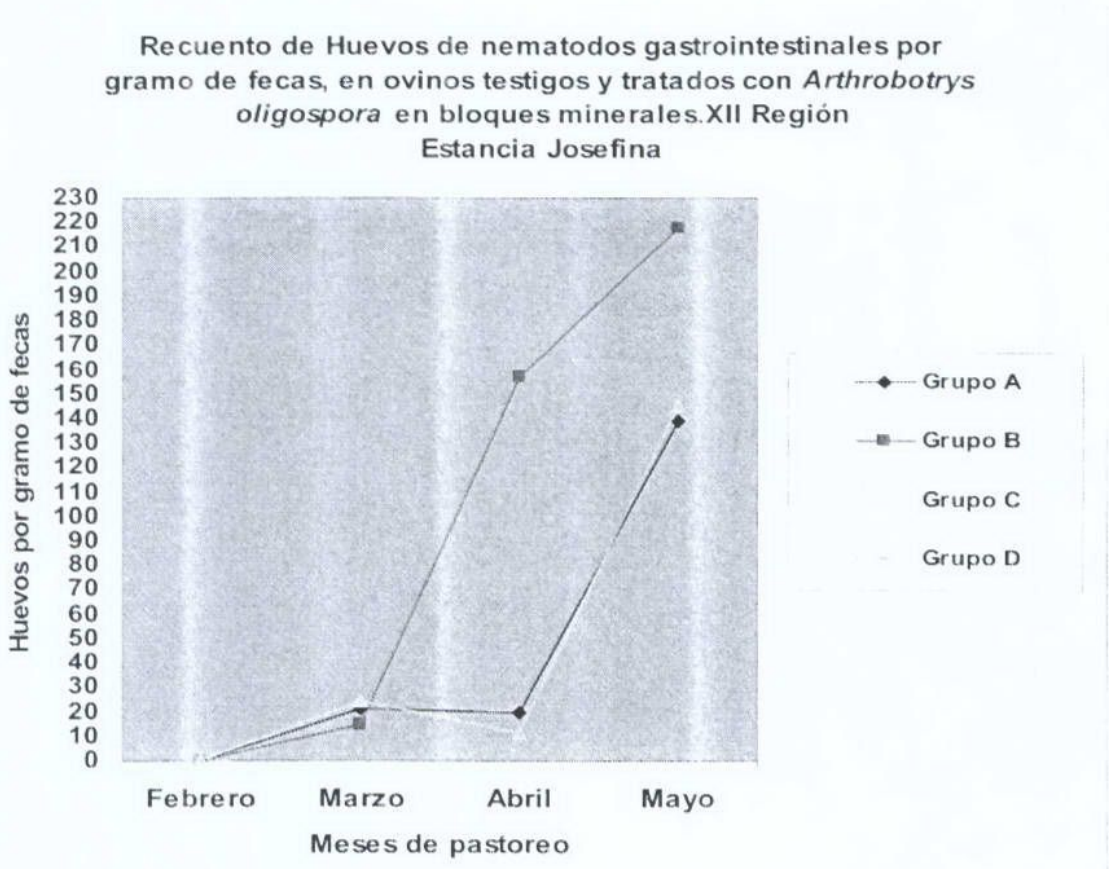
Recuento de huevos por gramo de fecas de nematodos gastrointestinales (Estrongilos y Nematodirus)

Cuadro 26. Recuento de huevos por gramo de fecas de nematodos gastrointestinales (Estrongylus y nematodirus) en 4 grupos de 15 ovinos tratados con y sin *A. oligospora* en un sistema en pastoreo en la estancia Josefina XII Región HPG.

	A	B	C	D
Febrero	0,2	0,28	0	0
Marzo	21,17	14,45	24,25	1,64
Abril	19,85	202,85	11,20	125,29
Mayo	139,00	217,69	145,43	44,73

Grupo A : Bloque mineral sin Nematófago, Grupo B: Bloque mineral sin nematófago +Antiparasitario Panacur®; Grupo C: Bloque mineral con nematófago;Grupo D Bloque mineral con nematófago +Antiparasitario Panacur®;

Gráfico 18.



Grupo A : Bloque mineral sin Nematófago. Grupo B: Bloque mineral sin nematófago +Antiparasitario Panacur®; Grupo C: Bloque mineral con nematófago; Grupo D Bloque mineral con nematófago +Antiparasitario Panacur®;

En el grafico 16 y cuadro 26, se aprecia la evolución del recuento de huevos de nematodos por gramo de fecas, en cuatro grupos de ovinos: Grupo A: Bloque mineral sin Nematófago; Grupo B: Bloque mineral sin nematófago +Antiparasitario Panacur®; Grupo C: Bloque mineral con nematófago; Grupo D Bloque mineral con nematófago +Antiparasitario Panacur®;

El cuadro y grafico anterior muestran la evolución del conjunto de huevos, no existiendo grandes diferencias en el conjunto de especies, esta situación cambia al analizar en relación a dos categorías de análisis como son Huevos Tipo Estrongilos y huevos de Nematodirus spp.

A continuación se analizarán los datos por categorías de parásitos, Estrongylus y Nematodirus

Análisis de los resultados del test coproparasitario según las categorías de nematodos.

a) Recuento de huevos de estrongylus, en fecas de corderos en pastoreo en una pradera natural en Magallanes, tratados con *A. oligospora* y testigos, tratados solamente con mezcla mineral o ésta más antiparasitario comercial.

Cuadro 27.

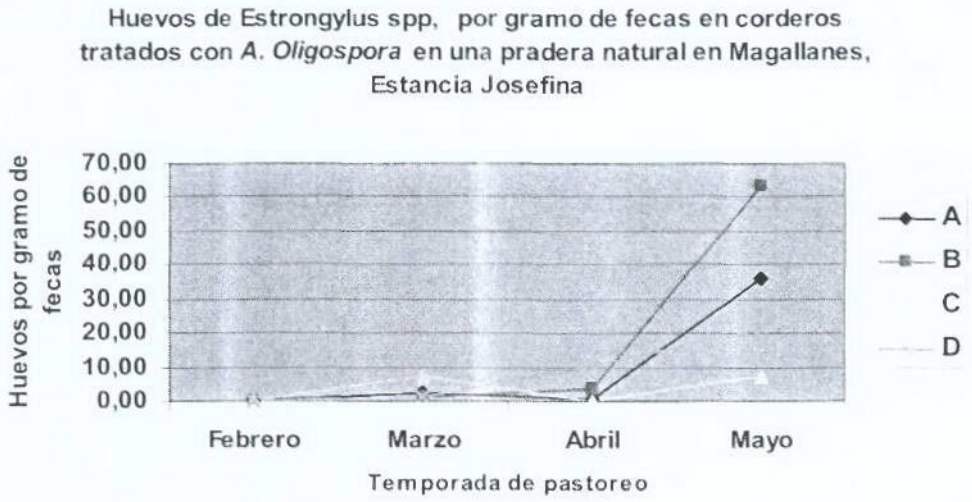
Huevos tipo Estrongylus por gramo de fecas en ovinos en pastoreo tratados con A. oligospora administrado en bloques minerales. Hpg.

Mes/Tratamiento	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
Febrero	0,00	0,08	0,00	0,00
Marzo	2,58	0,95	7,08	0,92
Abril	0,31	3,75	0,20	10,54
Mayo	35,67	63,23	7,08	21,55
Eficiencia de control %	-	-77,26 %	+80.15%	+39.59%

Grupo A : Bloque mineral sin Nematófago, Grupo B: Bloque mineral sin nematófago +Antiparasitario Panacur®;
Grupo C: Bloque mineral con nematófago; Grupo D Bloque mineral con nematófago +Antiparasitario Panacur®;

En el cuadro anterior se aprecia la el número de huevos de estrogylus detectados, por gramo de fecas en corderos, apareciendo claramente la tendencia existente en los tratamiento, se observa una disminución de la carga parasitaria al final del periodo de estudio en los grupos tratados con el biocontrolador. En el grupo C se estableció una eficiencia del +80,15%, es destacable el hecho de que este grupo de animales no recibió tratamiento antiparasitario convencional. Al comparar los tratamientos A y B se aprecia la misma relación. El antiparasitario convencional afecta la inmunidad de los animales? Y por esta razón en ambos grupos tratados el nivel de huevos es mayor?, indicando esto una mayor sobrevivencia y desarrollo de los parásitos adultos?, estas preguntas no se pueden responder en este trabajo pero se plantea una duda razonable respecto del efecto del tratamiento convencional, con Panacur®; en animales jóvenes.

Grafico 19.



Grupo A : Bloque mineral sin Nematófago, Grupo B: Bloque mineral sin nematófago +Antiparasitario Panacur®;
Grupo C: Bloque mineral con nematófago; Grupo D Bloque mineral con nematófago +Antiparasitario Panacur®;

En el gráfico anterior se expresan las tendencias, en la evolución de la carga parasitaria en corderos en pastoreo, respecto de huevos de estrongylus, expresada en huevos por gramo de fecas, en animales tratados y no tratados con A.oligospora. Los grupo C y D muestran con claridad el efecto del hongo nematófago.

b) Huevos de Nematodirus spp. por gramo de fecas en ovinos en pastoreo, tratados con A. oligospora administrado en bloques minerales. Hpg.

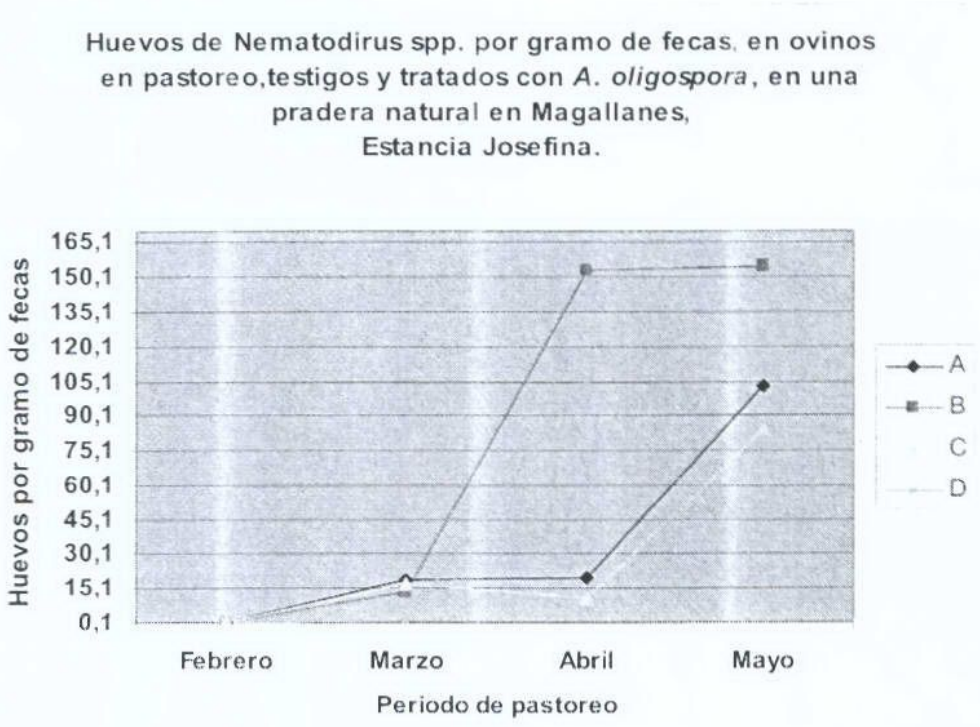
Cuadro 28. Huevos de Nematodirus spp. por gramo de fecas en ovinos en

pastoreo tratados con y sin A. oligospora administrado en bloques minerales. Hpg.				
	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
Febrero	0,20	0,20	0,00	0,00
Marzo	18,58	13,50	17,17	0,73
Abril	19,54	199,10	11,00	114,75
Mayo	103,33	154,46	84,43	23,18
Eficiencia de control %	-	-50.09%	18.29%	77.56%

Grupo A : Bloque mineral sin Nematófago, Grupo B: Bloque mineral sin nematófago +Antiparasitario Panacur®;
Grupo C: Bloque mineral con nematófago; Grupo D Bloque mineral con nematófago +Antiparasitario Panacur®;

En el cuadro anterior se puede observar el análisis del contenido mensual de huevos de ***Nematodirus spp*** en el contenido fecal de corderos tratados con *A. oligospora* y de los animales testigos, así como de los tratados con antiparasitario convencional, Panacur®. En el mes de Mayo, es evidente el menor número de huevos en los grupo C y D que han consumido el hongo nematófago. En este caso los valores de eficiencia son altos en el grupo D respecto del otro grupo que también recibió el controlador biológico. Estos valores se debieran estabilizar al entregar un biopreparado de manera homogénea y de liberación gradual en el tiempo como sería la introducción de cápsulas de uso intrarruminal.

Gráfico 20.



Grupo A : Bloque mineral sin Nematófago, Grupo B: Bloque mineral sin nematófago +Antiparasitario Panacur®;
Grupo C: Bloque mineral con nematófago; Grupo D Bloque mineral con nematófago +Antiparasitario Panacur®;

En el gráfico anterior se aprecia la evolución en la carga parasitaria, de los corderos durante el periodo de tratamiento, la cuenta de huevos en el mes de Mayo, entrega una visión del efecto final del tratamiento apreciándose una menor cuenta de huevos, por gramo de fecas, en los grupos tratados con el hongo.

4.5 Evaluación del efecto de los hongos nematófagos obtenidos, sobre las poblaciones de larvas de tercer estado de nemátodos en la pradera de Magallanes.

Recuento de larvas infestantes en una pradera natural en pastoreo con ovinos, tratados con *A. oligospora* y testigos.

Recuento del conjunto de larvas de tercer estado de nemátodos gastrointestinales, presentes en una pradera natural de 3.3 has. Con cuatro grupos de 15 ovinos en pastoreo, corderos, dispuesta en cuatro potrerillos de 8250 m^2

(Cada lote fue utilizado con un grupo de 15 ovinos machos y hembras- (Corriedale*Merino*Milschaf*Suffolk), correspondientes a Testigos y tratados con A. oligospora)

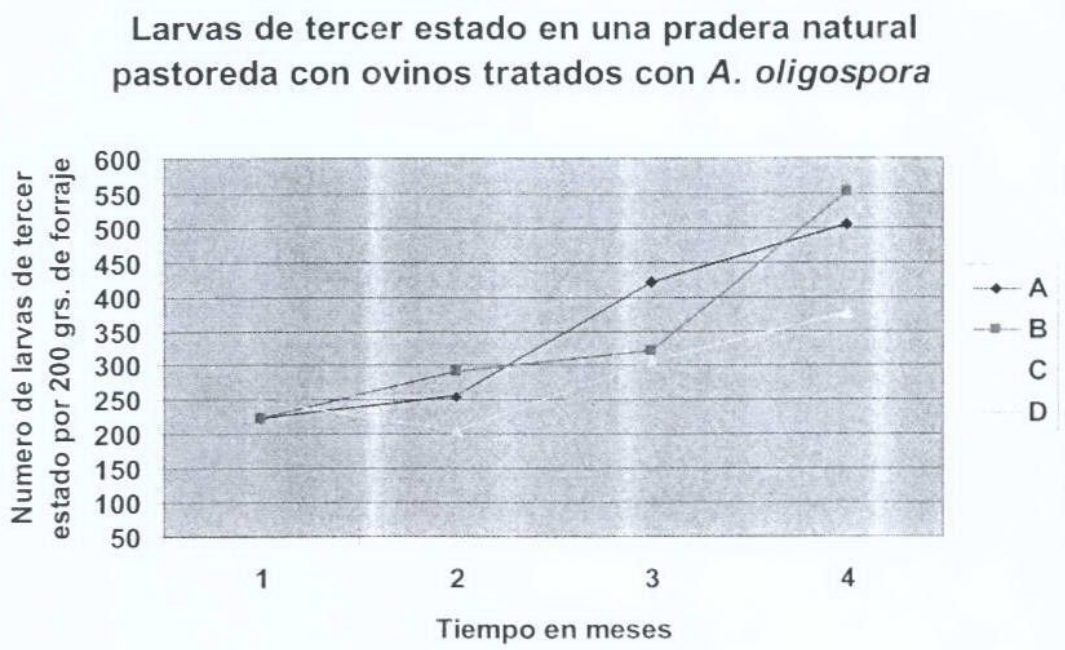
Cuadro 29.Número de larvas de tercer estado en una pradera natural pastoreada con cuatro grupos de corderos tratados con *A. oligospora*, incorporado en bloque minerales durante 60 días o Bloques minerales mas un tratamiento antiparasitario. *(Panacur ®)*

	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
Febrero	222	222	248	248
Marzo	257	292	207	263
Abril	421	320	306	243
Mayo	504	553	376	398

Grupo A : Bloque mineral sin Nematófago, Grupo B: Bloque mineral sin nematófago +Antiparasitario Panacur®; Grupo C: Bloque mineral con nematófago;Grupo D Bloque mineral con nematófago +Antiparasitario Panacur®;

En el cuadro anterior se aprecia el cambio en el número del conjunto de larvas infestantes en la pradera bajo pastoreo, a lo largo del periodo en el cual se realizó el ensayo, Es evidente la tendencia a la baja que se produce en los grupos C y D, que recibieron el hongo nematófago en los bloques minerales, respecto de los animales que no recibieron el controlador. Los animales de los grupos A y B superan las 500 larvas por cada 200 gramos de forraje presente en la pradera..

Grafico 21



Grupo A : Bloque mineral sin Nematófago, Grupo B: Bloque mineral sin nematófago + Antiparasitario Panacur®; Grupo C: Bloque mineral con nematófago;Grupo D Bloque mineral con nematófago + Antiparasitario Panacur®;

En el gráfico anterior, se presenta la evolución del número de larvas infestantes en una pradera natural, en la Estancia Josefina, con ovinos tratados con ***A. oligospora.*** La evolución general corresponde al comportamiento de las poblaciones de larvas en la pradera, observándose sobre ese patrón, una disminución en el número de individuos infectivos, donde se ubicaron y pastorearon los animales tratados. El cambio producido en las poblaciones de larvas, durante este ciclo en la pradera, es menor al alcanzado en la temporada anterior, en que el consumo del controlador sobre sustrato de cereales fue homogéneo y en entrega diaria para los dos grupos de animales que se trataron en esa etapa del estudio.

En el caso en estudio se introdujeron 140 carnerillos en la etapa previa a la realización del ensayo, por 11 días de manera ajustar la disponibilidad de forraje y de contar con una cantidad importante de larvas al comienzo del ciclo, esto significa también, que se añadió una contaminación adicional con huevos que eclosionaron durante el desarrollo del ensayo, esta condición entrega una mayor base de sustentación al uso de hongos nematófagos como

4. Evaluación del efecto de los hongos nematófagos, sobre las larvas de tercer estado de nemátodos en la pradera y sobre la carga parasitaria en ovinos en pastoreo, Predio Bandurrias.

4.1 Consumo de bloques minerales en borregas de un año.

Los animales consumieron los bloques minerales a partir segunda quincena de Marzo, en esta etapa los ovinos, solamente consumieron trazas de los bloques minerales, al igual que en el trabajo realizado en la Estancia Josefina en el ciclo anterior, por lo tanto se determinó introducir animales en corrales con bloques minerales y agua exclusivamente, para estimularlos a aumentar el consumo de estos dispositivos minerales. A partir del mes de Marzo se observó un consumo creciente, que se hizo permanente en los meses de Abril y Mayo. A partir del 12 abril se inició la evaluación e la carga e larvas de tercer estado en la pradera.

Cuadro 30.Consumo total y diario de Bloques Minerales en un periodo de 70 días en dos grupos de borregas Hampshire en pastoreo.

	Ovinos Testigos	Ovinos Tratados
Consumo Total Bloques minerales Kg /70 dias/ animal	2,380	2,170
Consumo Promedio por animal grs /dia	34	31

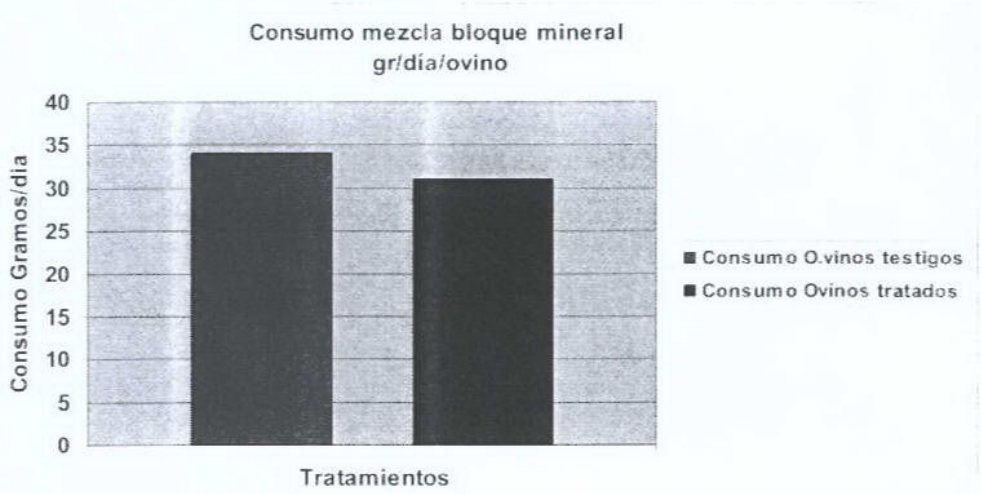
Ovinos Testigo: Bloque mineral sin Nematófago.

Ovinos Tratados: Bloque mineral con nematófago;

Cuadro 31.Consumos de esporas en relación al consumo de bloques minerales por ovino en animales con un peso promedio de 40 Kg.

Esporas por gramo de Bloque	Consumo diario grs. Ovinos 40 kg	Consumo de esporas por animal	Consumo de esporas por Kg de peso
$3.55*10^{8}$	31	$1,1*10^{10}$	$2,7*10^{8}$

Grafico 22.



En el gráfico anterior se aprecia el consumo de minerales por día en dos grupos de ovinos, tratados y testigos durante 70 días de evaluación.

El consumo total en todo el periodo de tratamiento fue de, 75 bloques minerales de 10 kg cada uno con *A oligospora* en los animales tratados y 12 bloques minerales sin el hongo en los animales testigos.

4.2) Peso de los animales tratados con *A. oligospora* administrado en Bloques minerales de 10k. Los animales testigos recibieron solamente bloques minerales sin utilizar el controlador biológico.

Los animales que participaron del ensayo corresponden a borregas que nacieron en el mismo año y se destetaron en el mes de Noviembre. En este ciclo de pastoreo, se trabajo con animales jóvenes que presentan mayor sensibilidad al parasitismo, y que han sido encastados en el mes de Mayo de 2006, de manera de conocer el efecto del controlador biológico en esta categoría de animales.

Cambio de Peso en 2 grupos de ovinos tratados con *A. oligospora* administrado en bloques minerales a libre disposición, con una concentración de $3.55x10^{8}$ esporas por gramo de mezcla mineral y carbohidratos administrada en bloque.

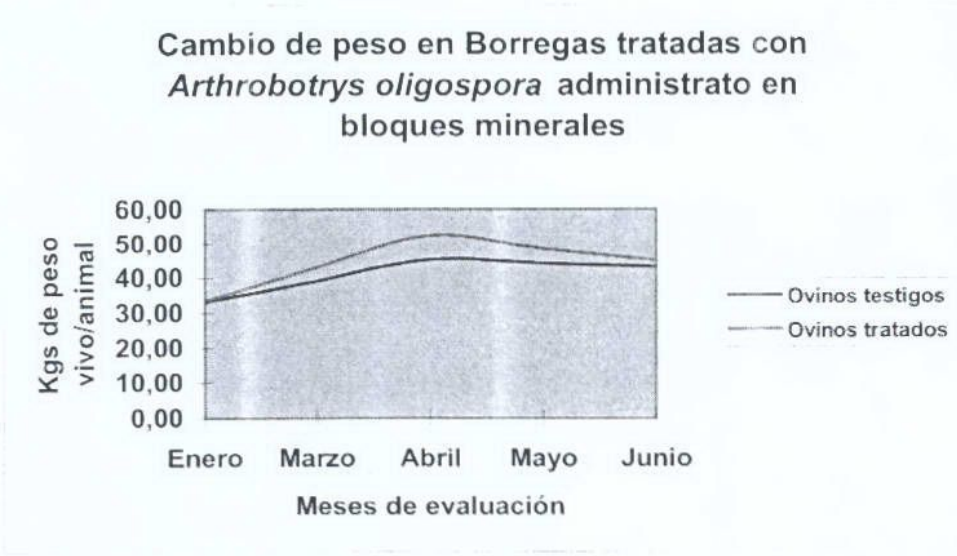
Cuadro 32 Cambio de peso en 2 grupos de ovinos consumiendo bloques minerales como mecanismo de administración del hongo controlador de nematodos *A. oligospora.*					
Tratamientos	Enero	Marzo	Abril	Mayo	Junio
Ovinos testigos	33.13±2.12	39.2±2.13	45.3±2.15	44.2±2.23	43.1±2.3
Ovinos tratados	33.5±3.7	42.9±4.1	52.3±5.09	48.5±5.09	45.0±5.1
Diferencia de peso	+0.37	+3.7	+7	+4.3	+2.9

Ovinos testigos: Bloque mineral sin Nematófago, Ovinos tratados: Bloque mineral con *A. oligospora*

En el cuadro anterior de cambio de peso, se aprecia que se ha generado una diferencia de 2.9 Kg. en promedio, por animal tratado, del grupo de los ovinos tratados respecto de los ovinos testigos al final del periodo de pastoreo, 1 de Junio de 2006. La diferencia de mayor significado se produce durante el primer mes de tratamiento controlado y que alcanza a los 7 kilogramos entre ambos grupos, el periodo efectivo de consumo se produce entre el 12 de Abril y el 22 de Junio. Los animales tuvieron un periodo de consumo preexperimental de 22 días entre el 20 de Marzo y el 11 de Abril.

Respecto del consumo del dispositivo con sales minerales, tanto con hongos nematófagos como sin estos, en las observaciones de campo se aprecia, que este es irregular en el tiempo, pareciera ser que el estimulo para el consumo es el descenso de la Temperatura ambiente ya que la disponibilidad de forraje no fue restrictiva a lo largo del tiempo, solamente varia la composición botánica, con un verano abundante en tréboles y un otoño-invierno con incremento de las gramíneas.

Grafico 23.



En el gráfico anterior se aprecia el cambio de peso que ocurre en los animales durante el periodo de pastoreo, entre el mes de Enero y Junio. El consumo del biopreparado se produce en los meses de Marzo, Abril , Mayo y Junio en que se entregan los controladores.

4.3 Evaluación de la sobrevivencia de los hongos nematófago obtenidos, al paso gastrointestinal de los animales

Presencia o ausencia del inoculo en las fecas ovinas en predio Bandurrias.

En el cuadro siguiente se observa la presencia de inoculo de ***A oligospora*** en animales con tratamiento y sin el, apreciándose que en los testigos se presenta un número de animales en los cuales aparece el inóculo en 8.33 % de ellos, al comienzo del ensayo y 41,66% al final de este. Sin embargo este grupo presenta bajas concentraciones fecales del hongo, menores a 30 conidioforos por placa.

En el grupo tratado se aprecia que al final del ensayo el 100 % de los animales presenta al hongo controlador en sus fecas y este se encuentra en altas concentraciones en un 88,88 %de ellos, y en concentración media en un 11,2% de ellos. Esta condición se explica porque el 12 de Abril de 2006 los animales llevaban 22 días consumiendo el dispositivo de entrega del nematófago.

La presencia de un 8,33% de inoculo al inicio del ensayo en los animales testigos, se explica por la permanencia de A. Oligospora en el campo por la realización de una tesis en el año anterior en el mismo lugar.

Cuadro 33. Evaluación del porcentaje de animales (%) con presencia del hongo *A. Oligospora* en fecas de ovinos con consumo de bloques minerales

Tratamientos	12/04/06 (evaluación al inicio del consumo de bloques)	02/06/06 (evaluación al término del ensayo)	Nivel de Presencia
Ovinos tratados	30%	100%	88,88% A+11,2%M
Ovinos testigos	8.33%	41.66%	Baja.

Presencia de hongos en fecas: B= bajo (1 a 30 conidióforos); M= medio (31-60 conidióforos); A= alto (+ de 61 conidióforos)

4.4 Evaluación Coproparasitaria de los grupos de animales en pastoreo

- El recuento de huevos, se realizó en el Servicio Agrícola Ganadero (SAG).

Análisis de los resultados del test coproparasitario según las categorías de nematodos.

El recuento de huevos se efectuó en el Laboratorio de parasitología del Servicio Agrícola y Ganadero, en la Estación lo Aguirre. Se debe destacar la colaboración prestada por los profesionales de esa institución. Los análisis realizados constituyeron un servicio especial otorgado al proyecto por parte del Servicio Agrícola y Ganadero ya que este centro de de otorgar prestaciones de esta naturaleza a organismos privados.

En el siguiente cuadro se observa la evolución de la cantidad de huevos de nematodos tanto de Nematodirus spp como de Estrongylos ovinos, no se observan grandes diferencias en estos valores, dado que el efecto de los hongos nematófagos es en la pradera y no hay el tiempo suficiente en el ensayo, para que se produzca una reifestación, de acuerdo a la carga de larvas en la pradera, los animales luego del trabajo fueron tratados con antiparasitarios

convencionales, el sentido de esta aplicación es desarrollar un sistema integrado de control parasitario.

Cuadro 34.Huevos por gramo de fecas y categoría de nemátodos en ovinos testigos y tratados.

	Nematodirus spp		
	Enero	Abril	Mayo
Ovinos Testigos	9.37	19.86	1.27
Ovinos Tratados	9.37	24.04	2.90
	Estrongylos spp		
Ovinos Testigos	9.77	76.43	53.09
Ovinos Tratados	9.77	59.2	87.82

En el gráfico siguiente se aprecia la evolución de la carga de huevos por gramo de fecas en ovinos bajo tratamiento antiparasitario con *A .oligospora* y sin el.

4.5 Recuento de larvas infestantes en una pradera natural en pastoreo con ovinos, tratados con A. oligospora y testigos.

Recuento del conjunto de larvas de tercer estado de nemátodos gastrointestinales, presentes en una pradera natural de 8 has. Con 2 grupos de ovinos, 350 tratados y 50 ovinos testigos en pastoreo, borregas, dispuestas en 2 potreros de 7 y 1 ha respectivamente.

Cuadro 35. Número de larvas de tercer estado en una pradera natural pastoreada con Borregas hampshire tratados con *A. oligospora*, incorporado en bloques minerales durante 70 días o Bloques minerales sin el controlador. (Larvas por 200 grs. de forraje fresco)

	Abril	Mayo	Junio	Julio
Ovinos Tratados	128.75±8.19	139.43±8.73	414±71.15a	202±58.96a
Ovinos Testigos	162.29±34.3	279.07±148.36	1193±216.3b	1232±190.7b
Eficiencia de control %	20.7	50.0	65.3	83.6

Ovinos Tratados: Bloque mineral con Nematófagos, Ovinos Testigos: Bloque mineral con nematófagos

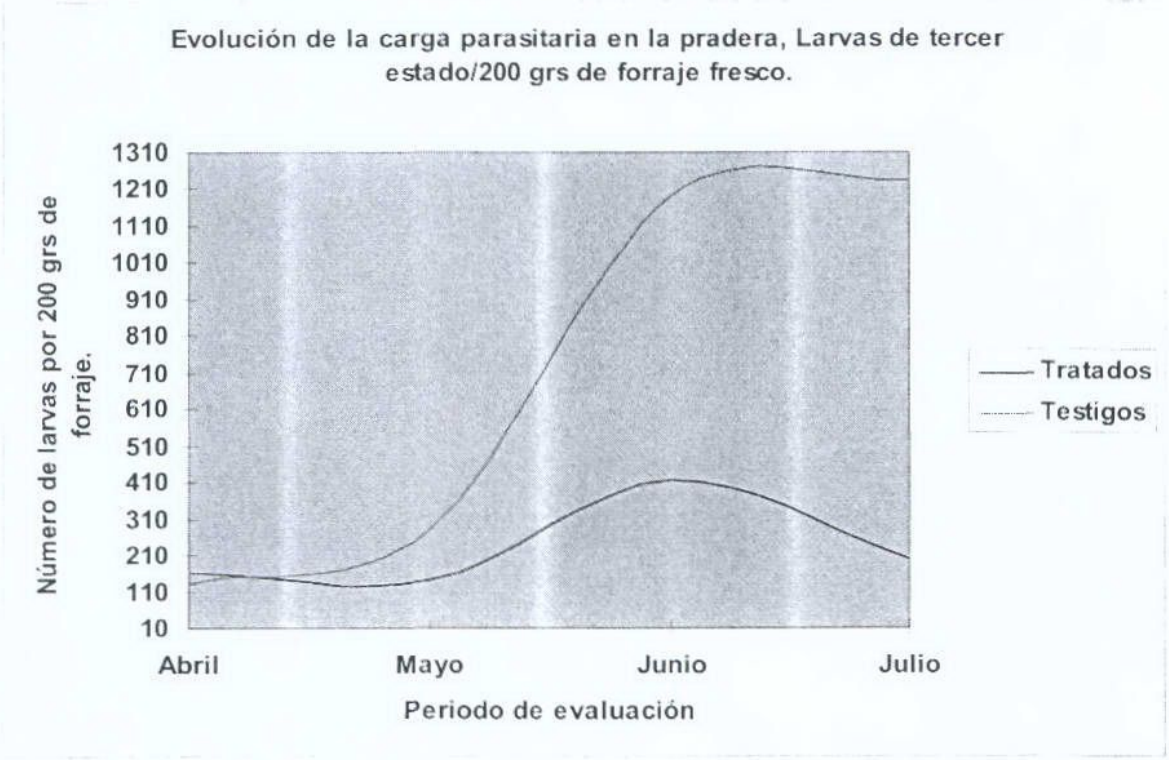
Test De duncan P<0.05 Letras distintas indican diferencias significativas.

En el cuadro anterior, se aprecia la disminución en el número larvas infestantes en la pradera bajo pastoreo con ovinos tratados con ***A. oligospora*** en bloques minerales, a lo largo del periodo en el cual se realizó el ensayo. Es evidente la tendencia a la baja que se produce en los ovinos tratados, que recibieron el hongo nematófago, respecto de los animales que no recibieron el controlador. Los animales tratados no superan las 414 larvas por cada 200 gramos de forraje presente en la pradera.

También se aprecia en el cuadro precedente, el incremento en la eficiencia de control logrado durante la aplicación del hongo nematófago en la dieta de los animales en experimentación. Esta varia entre un 20.7% al comienzo del periodo en evaluación en el mes de abril y un 83.6% en el mes de Julio. Se debe destacar las condiciones climáticas particulares del otoño del año 2006, con humedad y temperaturas adecuadas para el desarrollo larvario y fúngico. El tratamiento se empezó a evaluar cuando ya existía un consumo constante y permanente del

sistema de administración en bloques. Por esta razón se aprecia un cierto nivel de control en el primer mes de evaluación.

Grafico 25.

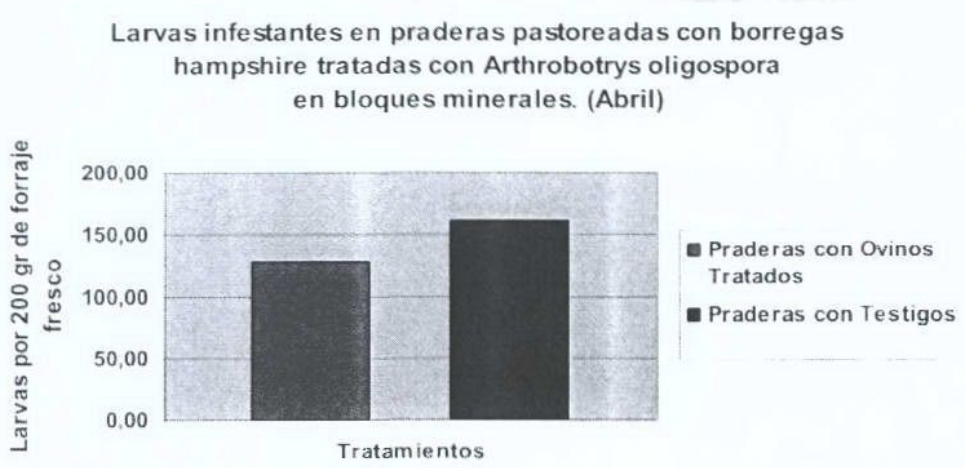


En el gráfico anterior, se presenta la evolución del número de larvas infestantes en una pradera natural, en el predio Bandurrias, con ovinos tratados con ***A. oligospora.*** La evolución general corresponde a la esperada, de acuerdo a los ensayos anteriores realizados en sistemas en producción extensiva, lo interesante del caso que se analiza, es que corresponde a un sistema de gran intensidad de manejo, con alta carga animal, lográndose, una disminución en el número de individuos infectivos, donde se ubicaron y pastorearon los animales tratados. El cambio producido en las poblaciones de larvas, durante este ciclo en la pradera, es el mayor logrado durante el presente estudio, dada la magnitud que alcanza la carga de parasitaria en la pradera. Además se debe destacar que este ensayo a diferencia de los anteriores, se realizó con un rebaño de tamaño comercial, 400 borregas simultáneamente, lo que permite consolidar como resultado la eficiencia del agente controlador desarrollado.

En los siguientes gráficos y cuadros se analiza la carga mensual de larvas en la pradera durante el periodo de evaluación.

Cuadro 36. Número de larvas de nemátodos ovinos en 200 gramos de forraje fresco en una pradera pastoreada por borregas Hampshire en el mes de Abril de 2006	
Praderas con Ovinos Testigos	Praderas con Ovinos Tratados
128.75±8.19	162.29±34

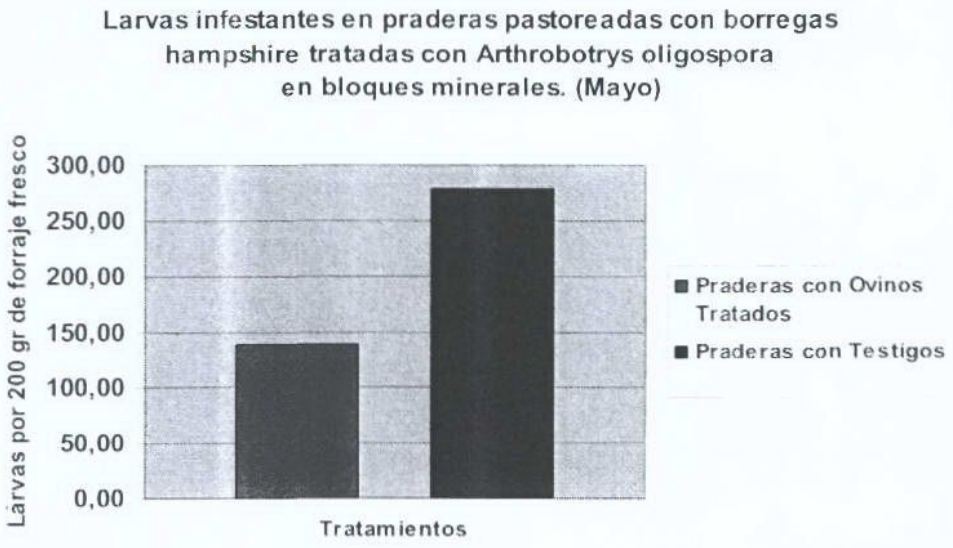
Grafico 26



En el cuadro y grafico anterior se aprecia el número de larvas presentes en el sistema de pastoreo al comienzo del periodo. El consumo de los bloques con el hongo nematófago había comenzado de manera consistente 22 dias antes. La presente evaluación se realizó el 12 de Abril.

Cuadro 37.Número de larvas de nemátodos ovinos en 200 gramos de forraje fresco en una pradera pastoreada por borregas Hampshire en el mes de Mayo de 2006	
Praderas con Ovinos Testigos	Praderas con Ovinos Tratados
279.07±148.36	139.43±8.73

Grafico 27

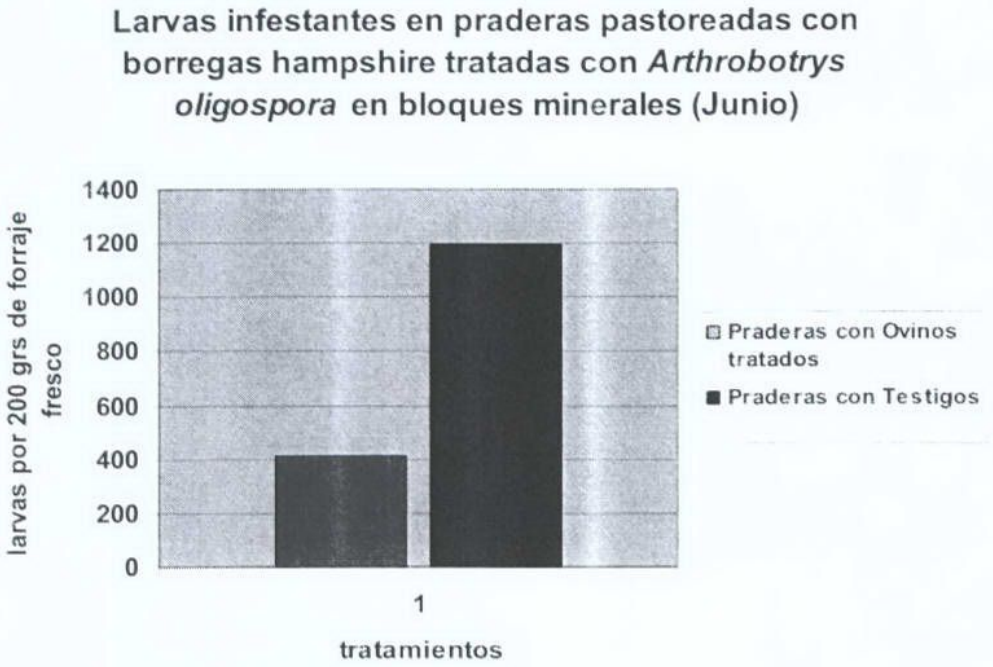


En el cuadro y gráfico anterior, se aprecia el incremento durante el mes de Mayo, del número de larvas de nemátodos en la pradera pastoreada, por los animales testigos sin tratamiento, en este caso borregas Hampshire. Es clara la diferenciación que se empieza a producir entre el grupo testigo y el grupo de animales tratados.

Cuadro 38. Número de larvas de de nemátodos ovinos en 200 gramos de forraje fresco en una pradera pastoreada por borregas Hampshire en el mes de Junio.

Praderas con Ovinos Testigos	Praderas con ovinos Tratados
1193±216.3b	414±71.15a

Grafico 28.

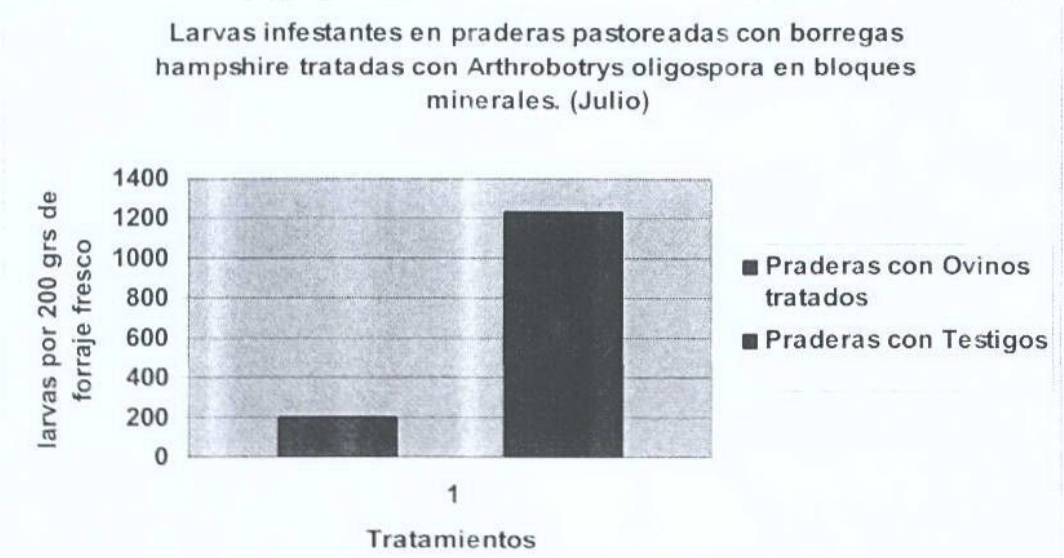


La situación que se aprecia en el cuadro y gráfico anterior es el incremento en la diferencia entre ambos grupos de animales en cuanto a la presencia de larvas de tercer estado en la pradera. Esta evaluación es en el mes Junio y se habían cumplido 70 días de administración del controlador biológico a los animales.

Cuadro 39. Número de larvas de nemátodos ovinos en 200 gramos de forraje fresco en una pradera pastoreada por borregas Hampshire en el mes de Junio.

Praderas con Ovinos Testigos	Praderas con ovinos Tratados
1232±190.7b	202±58.96a

Grafico 29



La situación que se aprecia en el cuadro y gráfico anterior es una ampliación en la diferencia obtenida entre ambos grupos de animales respecto de la población de larvas en el sistema de pastoreo. Esta evaluación se realizó con posterioridad a la finalización de la entrega de controladores en bloques minerales, esto permite sostener que los hongos nematófagos continúan actuando sobre la carga parasitaria de la pradera, reduciéndola.

Ensayo 2007, Bandurrias.

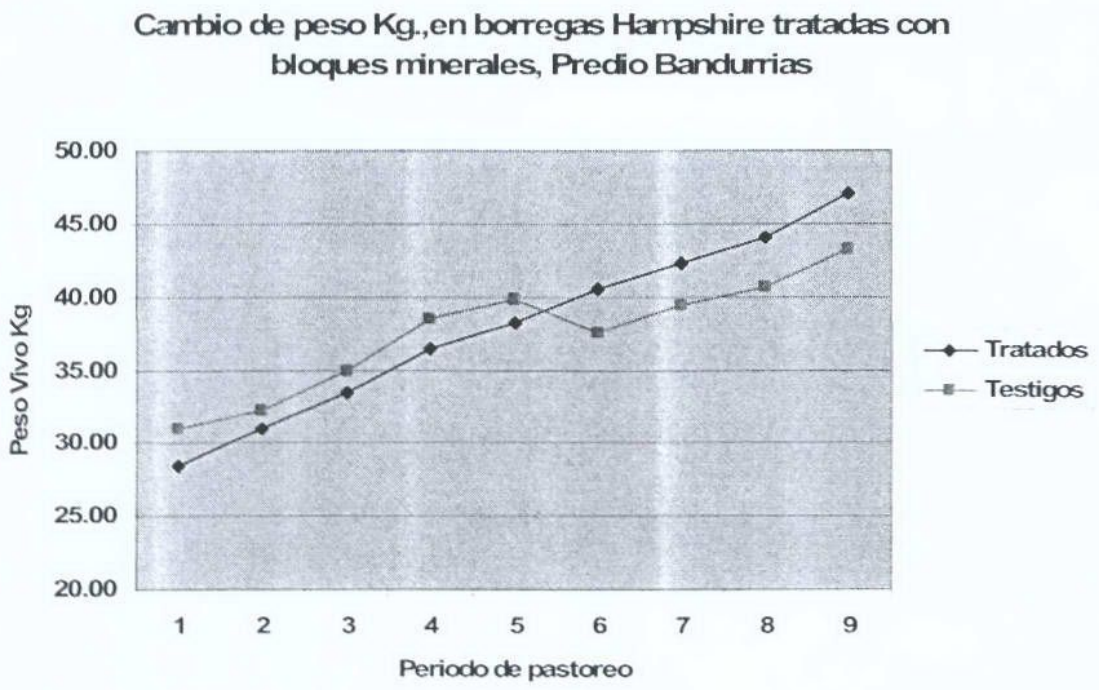
4.1 – 4.2 Evaluación del efecto del consumo de Bloques minerales sobre el peso de borregas hamphire en pastoreo.

Cuadro 40. Consumo de mezcla mineral y cambio de peso en borregas Hampshire tratadas durante un periodo de pastoreo, Predio bandurrias VI Región

Tratamientos	P. inicial Kg.	P. final Kg.	Consumo minerales Kg.	Cambio diario de peso Kg.	Ganancia de peso Periodo Kg.
Ovinos tratados con bloques minerales	28.43±2.0a	47.00±2.9a	0.070	0.182	18.57
Ovinos testigos	31.02±2.4a	43.17±3.23b	0	0.119	12.15

El cuadro anterior se aprecia el cambio de peso de dos grupos de ovinos tratados con bloques minerales y energéticos desarrollados por el proyecto para introducir el controlador biológico y utilizar este dispositivo como un sistema de entrega. **Como se** estableció con anterioridad los bloques hacen un aporte d 2.4 M.cal. Por kilo de material consumido además de vitaminas minerales y oligoelementos. Los aumentos de peso del periodo son moderados a bajos, esto a causa de problemas de riego ocurrido durante el ensayo que limitaron el consumo de alimento en la etapa media del ensayo.

Grafico 30



En el gráfico anterior se aprecia el cambio de peso a través del periodo de utilización de los bloques minerales y energéticos, apreciándose un descenso marcado del peso en los animales que no recibieron el aporte de los dispositivos de sales minerales y energía. Durante la etapa media del ensayo se produjo un descenso de la materia seca ofrecida por ha. que afectó marcadamente el aumento de peso de los animales sin el aporte mineral y energético.

2. Hitos: Se deberá hacer un completo y detallado análisis y reflexión en cuanto al avance, cumplimiento o eventual atraso del hito definido para el periodo.

La ruta crítica del proyecto corresponde a una secuencia de eventos en el tiempo con mayor dificultad en su consecución, estos corresponden a los siguientes:

A) **Obtención de los inóculos de *Arthrobotrys oligospora***, este hecho fundamental en el desarrollo del proyecto, tuvo una demora inesperada producto de la necesidades de ajuste de los métodos de cultivo, para lograr la reproducción del hongo se diseño e implementó un sistema de obtención de larvas de nematodos a partir de contenido fecal, las que se utilizaron para estimular el crecimiento de los hongos.

B) Evaluación de las cepas a través del método de Tilley Terry, esto permitió conocer in vitro la resistencia de las cepas a l efecto digestivo de los animales y por lo tanto elegir las mejores.

C) Evaluación in vivo de las cepas, para conocer la real capacidad de transito a través del aparato digestivo de rumiantes.

D) Evaluación in vitro de la capacidad de control de lavas de nematodos.

E) Evaluación in vivo de las esporas de las cepas obtenidas.

F) Introducción de las esporas en bloques obtenidos a partir de mezclas minerales vitaminas cereales, las cuales fueron evaluados para conocer su consumo.

G) Evaluación de campo a nivel experimental.

H) Evaluación de campo en rebaño ovino de tamaño comercial.

3. Actualización del análisis económico

3.1. Actualizar análisis de mercado.

El mercado de este biocontrolador se mantiene en términos generales en las mismas condiciones en las cuales se desarrolló el estudio original. No se han desarrollado productos equivalentes al obtenido por el proyecto. La ventaja que existe hoy día es el interés por el mercado mundial por las carnes naturales, nicho que amplia las expectativas de negocio del producto final al que ha llegado el proyecto.

3.2. **Actualizar criterios y supuestos utilizados en la formulación del análisis económico del proyecto, se deberá generar un esquema que permita identificar como se comportan dichos supuestos a lo largo de ejecución del proyecto.**

Los criterios y supuestos utilizados en la formulación del análisis económico del proyecto, se han modificado en el sentido de plantearse de manera mas realista, conociendo el comportamiento en términos de innovación de los productores de carne de ovino y este proyecto que inicialmente se planteó sobre un universo potencial de introducción de la tecnología, equivalente a la totalidad de la masa ovina de la XII región hoy se plantea con un mercado objetivo menor y con un potencial de crecimiento que abarque o considere la masa de borregas de reposición y las ovejas madres de los agricultores que exporten carnes naturales. Para esta evaluación se consideraron porcentajes de adopción de la tecnologota de 2.5, 3,5 y 4,5 % de la mas ovina de la Décimo Segunda región esto determina un negocio razonable y que se plantea como un modulo o unidad de negocios que se pueda replicar o hacer crecer en función de la naturaleza del producto a generar. Los elementos o tecnologías a considerar en este planteamiento incluyen un Fermentador, cámara de incubación, cámara de secado y producción de bloques o cápsulas.

3.3. Actualización análisis económico con proyecto.

II SITUACION CON PROYECTO

	Año						
ITEM	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
INGRESOS							
Venta de antiparasitario		136293356	190810699	245328041	245328041	245328041	245328041
Ingresos Totales		**136293356**	**190810699**	**245328041**	**245328041**	**245328041**	**245328041**
EGRESOS							
Costos Fijos de Producción		43200000	43200000	43200000	43200000	43200000	43200000
Costos Variables de Producción		49463230	65218388	81019833	81653379	82344391	83099611
Gastos de Adm. y Ventas		5451734	7632428	9813122	9813122	9813122	9813122
Egresos Totales		**98114964**	**116050816**	**134032954**	**134666500**	**135357513**	**136112732**
UTILIDAD ANTES IMPUESTO		**38178392**	**74759883**	**111295087**	**110661541**	**109970529**	**109215309**
FLUJO NETO CAJA (M$)		**98114964**	**74759883**	**111295087**	**110661541**	**109970529**	**109215309**

DESGLOSE DETALLADO DEL FLUJO DE CAJA

FLUJO DE INGRESOS		1	2	3	4	5	6
Venta de antiparasitarios (kg/año)		2272	3180	4089	4089	4089	4089

FLUJO DE EGRESOS		1	2	3	4	5	6
COSTOS FIJOS	**$/mensual**						
Gerente producción	1500000	18000000	18000000	18000000	18000000	18000000	18000000
Biólogo de producción	1000000	12000000	12000000	12000000	12000000	12000000	12000000
Técnicos (2 obreros)	500000	6000000	6000000	6000000	6000000	6000000	6000000
Personal administrativo (1)	600000	7200000	7200000	7200000	7200000	7200000	7200000
SubTotal C.FIJOS		**43200000**	**43200000**	**43200000**	**43200000**	**43200000**	**43200000**
COSTOS VARIABLES							
Sustratos de cultivos		11925669	16695936	21466204	21466204	21466204	21466204
Medio de cultivos		18172448	25441427	32710406	32710406	32710406	32710406
Mantención y recambio activos		1500000	1500000	1500000	1500000	1500000	1500000
Energía para producción		6814668	7155401	7513171	7888830	8283271	8697435
Fletes		1800000	1800000	1800000	1800000	1800000	1800000
Material de vidrio		800000	920000	1058000	1216700	1399205	1609086
Desinfectantes		500000	575000	661250	760438	874503	1005679
Material de Vidrio		1135778	1590089	2044400	2044400	2044400	2044400
Calefacción		6814668	9540535	12266402	12266402	12266402	12266402
SubTotal C Variables		**49463230**	**65218388**	**81019833**	**81653379**	**82344391**	**83099611**
GASTOS ADM Y VTAS							
Personal (2)		4088801	5724321	7359841	7359841	7359841	7359841
Imprevistos (1,5% de ingresos brutos)		1362934	1908107	2453280	2453280	2453280	2453280
SubTotal Gtos.Adm y Vtas.		**5451734**	**7632428**	**9813122**	**9813122**	**9813122**	**9813122**

GOBIERNO DE CHILE
FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA

EVALUACIÓN PROYECTO PURO ($/AÑO)

	AÑOS						
	0	1	2	3	4	5	6
Flujo de caja situación proyecto puro		98114964	74759883	111295087	110661541	109970529	109215309
INVERSIONES PARA:							
Proyecto Innovación Tecnológica (Aporte FIA)	79777980						
Inversiones para escalamiento	40000000						
Capital de Trabajo para la Producción	40000000						
FLUJO NETO CAJA ($)	-159777980	98114964	74759883	111295087	110661541	109970529	109215309

VAN (12%)	$ 227.410.667
TIR	56,5%

4. Análisis de impacto logrado a la fecha, midiendo y diferenciando al menos los siguientes aspectos:

4.1. Ventas y/o ingresos anuales ($),

En el estado actual del proyecto se han evaluado los prototipos de las presentaciones, sin realizar una promoción a nivel masivo y de mercados locales y nacionales.

4.2. Nivel de empleo anual (JH):

No hay nuevos empleos, solo a nivel del desarrollo de los prototipos de las presentaciones a nivel industrial se ha utilizado temporalmente mano obra aportada por la empresa ECOFOS, empresa que ha terminado de desarrollar la presentación en bloques, esto ha significado la contratación de dos personas .

4.3. Número de productores o unidades de negocio que pueden haberse replicado, y generación de nuevas ventas y/o servicios.

Este proyecto tenia como horizonte el desarrollo de un producto en términos de prototipo que debe patentarse e industrializarse. La unidades de réplica derivadas del proyecto son agrícola Bandurrias que introdujo el uso de bloques en el conjunto e su ovejería esto en el plano agrícola, por otra parte en el plano industrial la empresa ECOFOS implementó la producción industrial de los bloques e hizo el aporte para la implementación del ensayo en el predio Bandurrias.

4.4. Nuevos empleos generados por efecto del proyecto.

Temporalmente se dio trabajo a mano de obra temporal en la producción de bloques a nivel industrial.

4.5. Nuevas capacidades o competencias científicas, técnicas y profesionales generadas (número de tesistas o residentes, nivel o grado). Se han realizado tes tesis de grado, dos en desarrollo y una concluida.

1ª. Universidad Iberoamericana de Ciencia y Tecnología. Facultad de Medicina Veterinaria. "Evaluación del efecto de *A. oligospora* en un sistema de producción ovina en pastoreo". Eduardo Zapata A.

2ª Universidad de la Frontera. Facultad de Agronomía.
"Efecto del hongo A. oligospora sobre la población de lavas de tercer estado en sistemas de producción bovina en pastoreo" Nicole Herbener Paslask.

3ª Universidad Católica el Maule. Facultad de agronomía. "Evaluación in vitro e in vivo de aislamientos de hongos nematófagos para su utilización en bovinos en pastoreo" Rodrigo Mac- Donald S.

4.6. Número de publicaciones científicas y ranking de la revista (por ejemplo ISI).
No se han hecho publicaciones.
4.7. Número de patentes generadas.
No se han generado patentes

5. Antecedentes completos y detallados del número y tipo de usuarios que solicitó, solicita y solicitará los servicios y/o productos generados.

Agrícola Bandurrias.
Estancia Josefina.
Agrícola Reñihue.
Agrícola Huaquén
Estas empresas han solicitado los dispositivos generados por el proyecto, y se espera abastecerlos durante el segundo semestre de 2007.

6. Resultados e impactos probables al cierre del proyecto

GOBIERNO DE CHILE
FUNDACIÓN PARA LA
INNOVACIÓN AGRARIA

Ficha técnica Bloques minerales antiparasitarios:

EcoBlock ®

Bio-Energy

CARACTERÍSTICAS:

EcoBlock ® Bio-Energy, es un dispositivo para la administración permanente de un hongo perteneciente al genero Arthrobotrys. Éste es un controlador biológico de larvas de tercer estado en la pradera que complementariamente entrega minerales, energía y vitaminas.
Su conformación es la de un bloque logrado por presión sobre carbohidratos y minerales.

El Género Arthrobotrys, es un grupo de hongos, que controlan naturalmente las larvas de nematodos parásitos de animales en la pradera, capaces de capturar las larvas con un sistema de redes y anillos que detienen y digieren al parásito en su estado larvario. Este sistema ha sido evaluado en la patagonia y en la zona central logrando hasta un 87% de control de las larvas infestantes en el forraje. Complementariamente el dispositivo aporta minerales como fósforo, calcio, potasio, azufre, selenio y sodio entre otros nutrientes, con elevada biodisponibilidad. También se asocian en este bloque carbohidratos de alta digestibilidad, aportando energía, indicado para períodos de alta demanda del rebaño.

EcoBlock ® Bio-Energy, aporta permanentemente el hongo controlador debiéndose introducir en los sistemas en pastoreo en otoño y primavera, de modo de inocular el forraje en los momentos de alto riesgo parasitario.

EcoBlock ® Bio-Energy, contiene un hongo que resiste la digestión ruminal y es depositado en las fecas en conjunto con los huevos de parásitos, posteriormente germina al mismo tiempo en que eclosionan los huevos de los nematodos, por lo que es capaz de actuar focalizadamente sobre los estados infestantes.

EcoBlock ® Bio-Energy, aporta también vitaminas minerales y energía de acuerdo a la demanda diaria de estos nutrientes, mejorando la disponibilidad de estos elementos a nivel ruminal.

[illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible]

COMPOSICIÓN PROXIMAL Y DIGESTIBILIDAD POR CADA 1.000 gr.

Análisis	Unidad	MS 100%*
Esporas de Artrobotrys	Esporas por gr	10⁶ esporas gr
Humedad	%	-
Ceniza	%	42,01
Fibra Cruda	%	1,16
Extracto Etéreo	%	1,15
Proteína Cruda	%	6,88
Fibra detergente Neutro	%	8,54
Fibra detergente Ácido	%	6,40
Energía Metabolizable	Mcal/k	2,06
Calcio (Ca)	%	11,40
Fósforo (P)	%	3,90
Hierro (Fe)	mg/kg	3153,00
Magnesio (Mg)	mg/kg	0,44
Azufre (S)	%	0,20
Selenio (Se)	mg/kg	20,00

Vitaminas	Unidad	Contenido
Vitamina A	UI	2.500.000,0
Vitamina D	UI	500.000,0
Vitamina E	UI	25.000,0

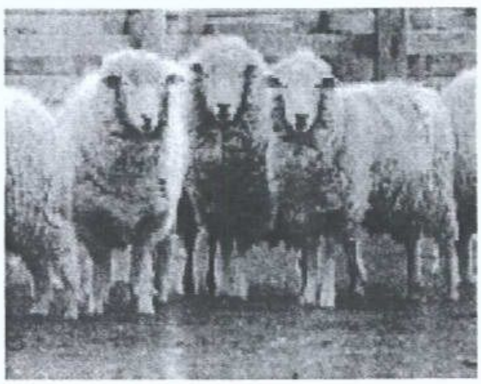
ADMINISTRACIÓN Y DOSIFICACIÓN

EcoBlock ® Bio-Energy, se administra en ovinos por ocho semanas, en otoño y primavera durante el ciclo de pastoreo, en especial en borregas y en ovejas en el último tercio de gestación y lactancia. En carneros en el período anterior al encaste.

EcoBlock ® Bio-Energy, se debe entregar en el potrero protegiéndolo de la lluvia y de la humedad en general.

RECOMENDACIONES DE USO

En Ovinos y Caprinos el consumo puede alcanzar entre 40 - 60 gr/animal/día.



PRESENTACIÓN

Bloques de 10 kg.
Distribuir los bloques en forma homogénea.

EcoBlock ® Bio-Energy

EcoFos Ltda. Panamericana Norte Km. 10,5, Lote 2, Lleu-Lleu
Fono/Fax: 56-2-6334172, Dirección Postal 53148 - Santiago / www.ecofos.cl
Departamento Comercial: ventas@ecofos.cl, Departamento Agrícola: agricola@ecofos.cl
ITAS S.A. Carretera General San Martín - Km 15,5 - Parcela 6 - Pudahuel - Chile
Fono (56)2 7495009

4. **Fichas** técnicas y análisis económico del cultivo, rubro, especie animal o tecnología que se desarrolló en el proyecto, junto con un análisis de las perspectivas del rubro después de finalizado el proyecto. Se deberá incorporar toda la información relativa a la participación e identificación del sector productivo.

En el punto 3..2 se desarrolló la evaluación económica.

5. **Impactos** del proyecto: descripción y cuantificación de los impactos obtenidos, y estimación de lograr otros en el futuro, comparación con los esperados, y razones que explican las discrepancias. Algunos indicadores de impacto son mencionados en el instructivo del informe de avance técnico.

    A) Los impactos de mayor relevancia tienen que ver con la generación de un concepto diferente en el control de nematodos parásitos de animales domésticos, que corresponde al control de la población de individuos infestantes en la pradera y no al interior de los animales rebajando la principal fuente de infestación de los sistemas de producción animal en pastoreo.

    B) Generación de un insumo nuevo con un alto potencial de mercado que integra elementos de control parasitario y de suplementación mineral y energética.

    C) Generación de una alta demanda por parte de productores ovinois de Magallanes que esperan la implementación de la etapa comercial de os prototipos desarrollados.

6. **Problemas** enfrentados durante la ejecución del proyecto (legales, técnicos, administrativos, de gestión) y las medidas tomadas para enfrentar cada uno de ellos.

8. **Conclusiones**, desde el punto de vista técnico, económico y de gestión.

1. Se aislaron y evaluaron 16 cepas de *A. oligospora* con capacidad de control de nematodos.

2. Se aislaron y evaluaron 2 cepas de *A. superba* con capacidad de control de nematodos.

3. Se alcanzó un máximo de control de larvas de tercer estado en placas de un 99.14% con *A oligospora* a las 24 horas

4. *A. oligospora* presento un nivel de control a nivel de campo de larvas de tercer estado de nematodos de rumiantes 87.66 y 83.6%.

5. Se desarrolló una presentación de A. oligospora incorporado en bloques minerales de 10 Kilogramos de peso.

6. Se desarrolló una presentación en cápsulas con una duración limitada a 35 días.

7. El consumo de la presentación mineral en bloque en animales sin restricción forrajera se estabiliza en 31-34 gramos por animal/día.

8. El consumo de la presentación mineral en bloque en animales con restricción forrajera se estabiliza en 70 gramos por animal/día.

9. El consumo diario del dispositivo mineral produjo una diferencia de peso en borregas hampshire estadísticamente significativa de 3.83 kg

9. **Recomendaciones**, desde el punto de vista técnico, económico y de gestión.

a) El trabajo de investigación sobre la eficacia de este e tipo de hongos, nematófagos en general y A. oligospora en particular se debiere extender a otras especies animales, en especial todos aquellos que realizan parte de su ciclo productivo en pastoreo, producción de carne, leche en el sur de Chile y producción equina.

b) En lo económico se debe plantear el establecimiento de una planta de producción semi-industrial o industrial de este tipo de controladores, que permita su masificación a corto plazo de manera de apoyar a los productores que están iniciando el proceso de transición hacia tipos particulares de mercado como el de las carnes naturales y orgánicas.

c) En el plano e la gestión el proyecto parece ser adecuada la definición de hitos de manera que las evaluaciones se realicen en función de puntos de particular importancia en el avance del proyecto. Por otra parte estos hitos se deben ir revisando en la medida que se avanza en el desarrollo de la investigación y del aprendizaje que van obteniendo los equipos técnicos.

10. **Otros aspectos de interés.**

Los hongos aislados y evaluados por el proyecto tienen un enorme potencial en el control de patologías vegetales y es un área respecto de la cual se deben analizar.

Objetivos del proyecto BIOT- 01- P-20

Objetivo General planteado en el proyecto:

Aislamiento identificación, reproducción y evaluación de hongos nematófagos de los géneros *Duddingtonia* y *Arthrobotrys* para u uso en e sistemas orgánicos de producción de carne ovina en Magallanes.

Objetivos específicos:

1) Aislamiento e identificación de hongos nematófagos de los géneros *Duddingtonia* y *Arthrobotrys*, a partir de muestras fecales de ovinos en pastoreo, en Magallanes, mediante la utilización de nematodos trampa .

2) Reproducción en sustratos sólidos de hongos nematófagos de los géneros *Duddingtonia* y *Arthrobotrys*.

3) Evaluación *in vitro* e *in vivo* del efecto de los procesos digestivos de ovinos, sobre la viabilidad de las conidias de los géneros *Duddingtonia* y *Arthrobotrys*.

4) Evaluación del efecto de los hongos nematófagos obtenidos, sobre las poblaciones de larvas de tercer estado de nemàtodos, en la pradera y sobre la carga parasitaria de ovinos en Magallanes.

5) Desarrollo de un estudio de mercado que permita ubicar el segmento de aplicación de esta innovación para definir la presentación y competencia respecto de los productos convencionales.

Hongos atrapa-nemátodos

150 especies descritas, pertenecen a la Clase: Hyphomycetes, seis géneros son los de mayor importancia en control de parásitos: *Duddingtonia, Arthrobotrys, Dactylella, Geniculifera, Monacrosporium, Nematoctonus*. (Liou and Tzean, 1997), comúnmente encontrados en material vegetal en descomposición, fecas y suelo

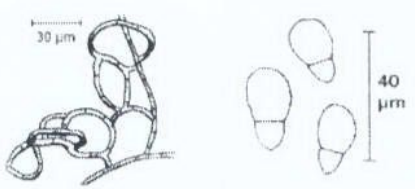
CARACTERISTICAS DE HONGOS NEMATOFAGOS

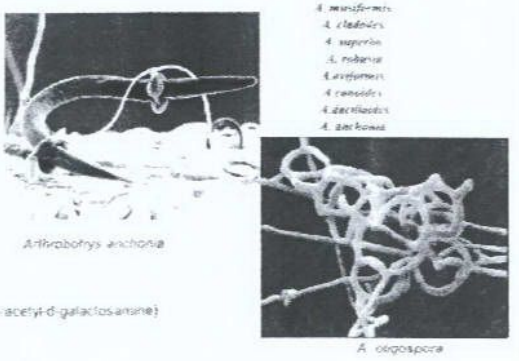
Presentan crecimiento de hifas que se extienden en el suelo, alrededor del sustrato

Desarrollan varios métodos de trampa basados en anillos contráctiles; hifas, prominencias o redes adhesivas

Los órganos trampas pueden ser producidas continuamente o en respuesta a la presencia de nemátodos

REDES TRIDMENCIONALES Y ESPORAS

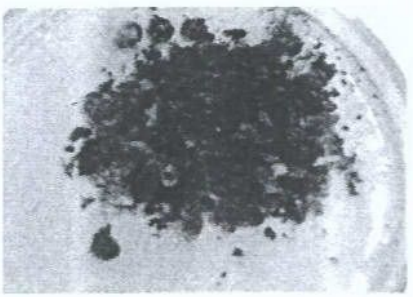




Hongos Nematófagos

Arthrobotrys oligospora, Duddingtonia flagrans,

Producen estructuras resistentes (clamidosporas) que le permiten sobrevivir el paso a través del tracto gastrointestinal (anaerobiosis, enzimas, temperatura)



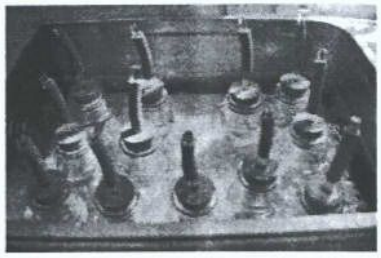
Terapéutica tradicional para parasitismo

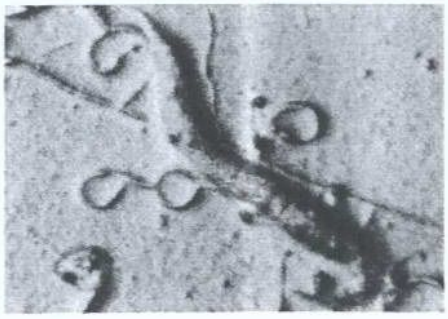
A nivel del hospedador: mediante el empleo de antihelmínticos como vía para eliminar a los parásitos y de esta manera destruir la fuente de contaminación de los potreros

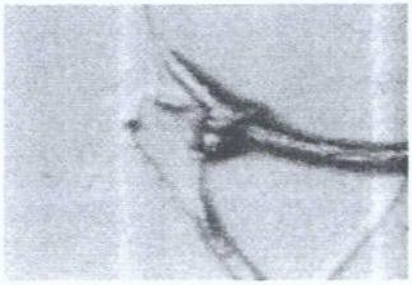
A nivel del medio ambiente: para impedir el contacto entre las formas infestantes de los parásitos con los animales del rebaño (95% masa de parasitaria, introd.mecanismos de regulación)

I Fase evaluativa en predio experimental
Centro de Educación y Tecnología

Biología del sistema







Cuadro 1. Cepas con uso potencial como controlador biológico de nematodos.

	Cepa	Localidad	Especie
1	(9b) P. Arenas	E.Josefina-1	*A.superba* Duddington*
2	Pta Arenas (Galpon)	E. Josefina-2	*A.oligospora* Fres. var oligospora*
3	(9a) P. Arenas	E.Josefina-3	*A.superba**
4	Conejo (Cobna)	CET-Cobna	*A.oligospora* Fres. var oligospora*
5	(4a) (Chimbarongo ovino)	VICONTO Chimbarongo)	*A.oligospora* Fres. var oligospora*
6	(Caballo Lampa	Lampa	*A.oligospora* Fres. var oligospora*
7	1. Alpaca (Placilla)	Los Robles	*A.oligospora* Fres. var oligospora*
8	2. Cabra	Caimanes	*A.oligospora* Fres. var oligospora*
9	3. Casa blanca	Cordillera	*A.oligospora* Fres. var oligospora*
10	4. Llama (Placilla)	Los robles 2	*A.oligospora* Fres. var oligospora*
11	5. Oveja Catemu	Cerrillos	*A.oligospora* Fres. var oligospora*
12	6. P. Arenas	Estepa	*A.oligospora* Fres. var oligospora
13	7. Vaca Catemu	Cerrillos	*A.oligospora* Fres. var oligospora
14	Cepa 1 equino	Temuco	*A.oligospora* Fres. var oligospora
15	Cepa 11 equino	Lanco	*A.oligospora* Fres. var oligospora
16	Cepa 12 ovino	Lanco	*A.oligospora* Fres. var oligospora
17	Cepa 16 ovino	Puyehue	*A.oligospora* Fres. var oligospora
18	Cepa 17 ovino	Pucon	*A.oligospora* Fres. var oligospora

Cuadro 2. Evaluación in vitro del nivel de control de 12 aislados del género Arthrobotrys, sobre 1000 larvas de tercer estadio, evaluadas a las 24, 72 y 96 horas de exposición al hongo controlador *A. oligospora*

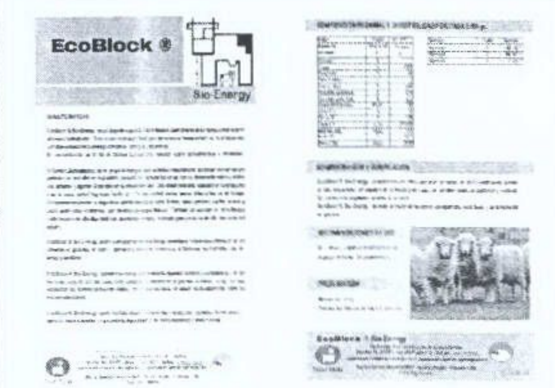
Cepas evaluadas	N° larvas 24 horas	Control de Larvas 24 horas %	N° Larvas 48 horas	Control Larvas 48 horas %	N° Larvas 72 horas	Control de Larvas 72 horas %	N° larvas 96 horas	Control de Larvas 96 horas %
Cepas evaluadas	N° larvas 24 horas	Control de Larvas 24 horas %	N° Larvas 48 horas	Control Larvas 48 horas %	N° Larvas 72 horas	Control de Larvas 72 horas %	N° larvas 96 horas	Control de Larvas 96 horas %
(9b) P. Arenas	[illegible]	[illegible]	0.0	100.0	0.0			
Pta Arenas (Galpon)	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0.0	100.0		
(9a) P. Arenas	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0.0	100.0		
Conejo (Cobna)	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
(4a) Chimbarongo ovino	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0.0	100.0		
Caballo Lampa	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0.0	100.0		
1. Alpaca (Placilla)	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
2. Cabra	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0.0	100.0
3. Casa blanca	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0.0	100.0
4. Llama (Placilla)	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0.0	100.0
5. Oveja Catemu	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0.0	100.0
6. P. Arenas	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0.0	100.0
7. Vaca	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0.0	100.0

Cuadro 4. Evaluación in vitro de la resistencia exhibida por los diferentes aislados del género Arthrobotrys a la digestión ruminal y gástrica, a través del método de Tilley Terry

Cepas aisladas del género Arthrobotrys	Concentración inicial de esporas de los diferentes aislados del hongo	Concentración final de esporas de los hongos evaluados, después del método de Tilley Terry
(9b) Pta Arenas	1.0×10^{7} esporas/ml	1.0×10^{8} esporas/ml
(4b) Pta Arenas (Galpon)	3.5×10^{8} esporas/ml	2.9×10^{5} esporas/ml
(9a) Pta. Arenas	7.5×10^{8} esporas/ml	1.0×10^{8} esporas/ml
Conejo (Cobna)	7.5×10^{8} esporas/ml	2.0×10^{5} esporas/ml
(4a) Chimbarongo ovino	5.0×10^{8} esporas/ml	1.5×10^{5} esporas/ml
Caballo Lampa	5.8×10^{8} esporas/ml	1.7×10^{5} esporas/ml
1. Alpaca (Placilla)	3.8×10^{7} esporas/ml	6.0×10^{5} esporas/ml
2. Cabra	1.5×10^{7} esporas/ml	5.0×10^{5} esporas/ml
3. Casa blanca	2.8×10^{7} esporas/ml	6.0×10^{5} esporas/ml
4. Llama (Placilla)	2.2×10^{7} esporas/ml	4.0×10^{5} esporas/ml
5. Oveja Catemu	1.4×10^{7} esporas/ml	8.5×10^{5} esporas/ml
6.*Pta Arenas (oveja)	1.8×10^{7} esporas/ml	0
7. *Vaca	1.5×10^{7} esporas/ml	0

Cuadro 9. Composición proximal y digestibilidad de los bloques minerales utilizados como vehículo del controlador biológico *A. oligospora*

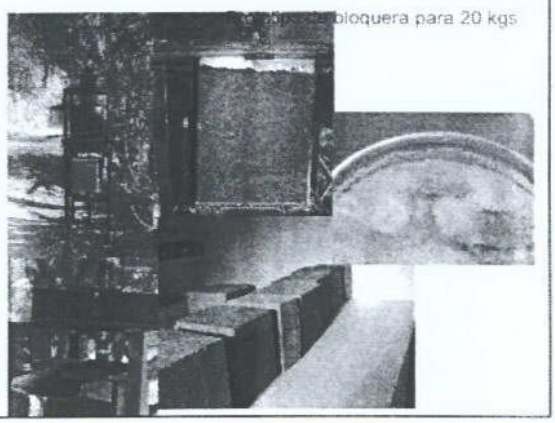
Análisis	Unidad	SD 100%?	SS 87.09%
Humedad	%		3.95
Cenizas	%	41.97	40.83
Fibra cruda	%	1.07	1.00
Extracto Etéreo	%	3.25	3.13
Proteína cruda	%	6.87	6.65
Fibra detergente Neutro	%	6.54	6.29
Fibra detergente Ácido	%	6.48	6.22
Energía Metabolizable	Mcal/k	2.90	2.85
Calcio	%	13.20	12.66
Fósforo	%	1.00	0.78
Cobre	mg/kg	64.0	62.5
Hierro	mg/kg	5152.0	5060.0
Mn	mg/kg	283.4	275.0
Mg	mg/kg	0.48	0.47
Potasio	%	1.059	1.000
Sodio	%	0.75	0.74
Zn	%	177.581	167.586
S	%	0.156	0.150



Diseño de un sistema de administración .

A) Bloques minerales.

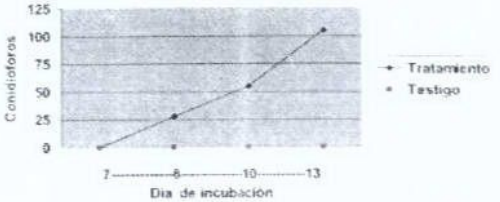
B) Cápsulas intrarruminales de digestión lenta .



Cuadro 10. CONTROL DE CALIDAD DE LOS HONGOS NEMATÓFAGOS EMPLEADOS PARA LA ELABORACIÓN DE BLOQUES	
Concentración de esporas/gramo de sustrato seco (avena-arroz)	2.3 x 10^{10} esporas/g
Viabilidad de las esporas	86%
Pureza	100%

A. Oligospora deshidratado, para incorporación en bloques

Unidades formadoras de colonias de *Arthrobotrys oligospora*, en 2 gramos de heces ovinas incubadas en agar-agua despues de 7 dias de consumo de 52 gramos de bloque mineral, inoculado con el hongo nematofago



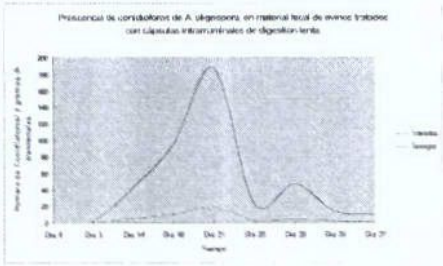
Diseño de cápsulas intrarruminales

Cuadro 12. Cambio de peso de capsulas formuladas en base a Gelucire 50/02, Avicel, lactosa spray dried e incorporando afrechillo tamizado Grs.

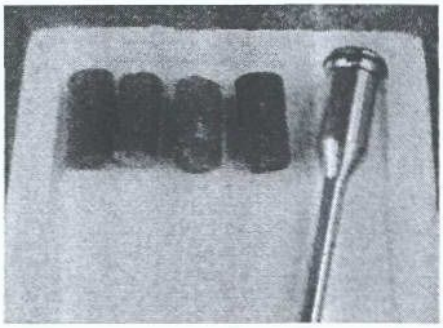
Cuadro 15. Cambio de peso en cápsulas intrarruminales de digestión lenta, evaluación en un cordero fistulado. (gramos)

Cápsulas	Peso inicial	Concentracion esporas	8 dias	16 dias	24 dias	35dias
4	17.92±0.8	3.06 x 10⁷	13.28±2.3	5.40±0.6	4.16±0.7	3.45±0.9

Evaluación in vivo de cápsulas intrarruminales de digestión lenta



Cápsulas y lanzabolos



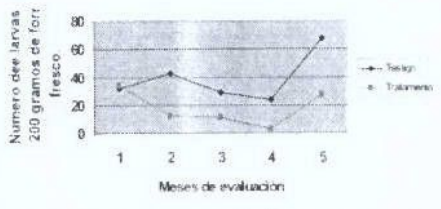
Cuadro 13. Concentración de esporas *A. oligospora* por gramo de cápsula.

1	15/03/2006	1.0 x 10⁸
A	30/03/2006	7.2 x 10⁷
B		6.7 x 10⁷
A	04/04/06	3.6 x 10⁸
B		4.6 x 10⁷
C		2.8 x 10⁷
D		1.8 x 10⁷

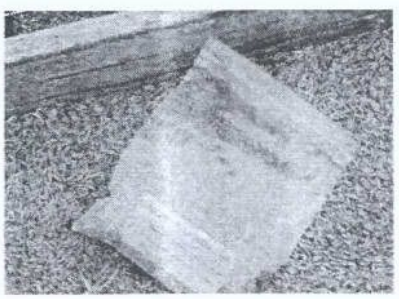
I) Primer ensayo Magallanes: Estancia Josefina (2003-2004)

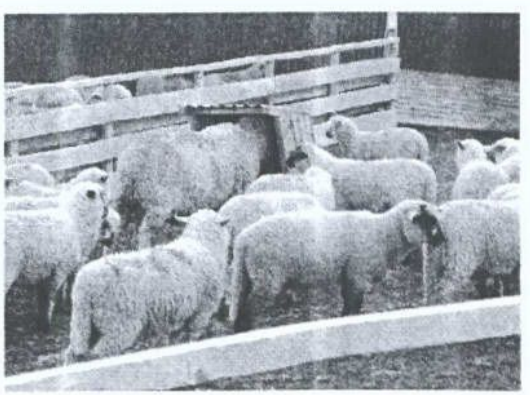
Administración de *A. oligospora* en Sustrato sólido, cereales.

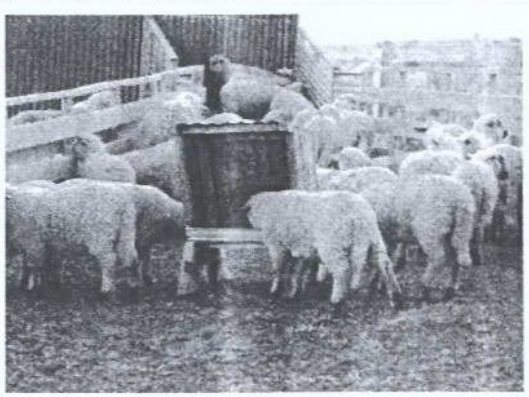
Recuento de larvas en una pradera natural con ovinos a pastoreo tratados con A. Oligospora y testigos, en la Estancia Josefina, Magallanes.



Administración del controlador biológico con cereales , 200 grs. por animal







Segunda Etapa Evaluativa:

Evaluación del efecto de cuatro tipos de bloques minerales inoculados con A. oligospora sobre la población de larvas de tercer estado en un sistema de ovinos en pastoreo.

Grupo A: Bloque mineral sin Nematófagos.

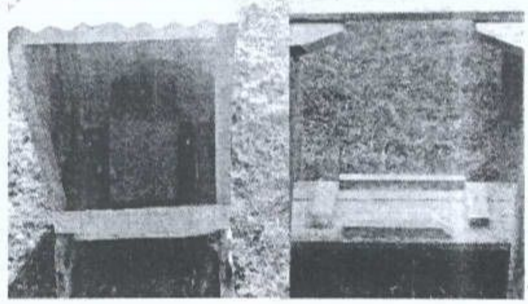
Grupo B: Bloque mineral sin nematófago + Fenbemdazol.

Grupo C: Bloque mineral con nematofago.

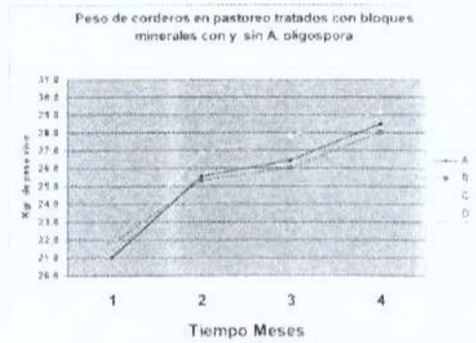
Grupo D: Bloque mineral con nematófago +Fenbendazol

Cuadro 24.Consumo medio de Bloques minerales, gr./dia en un periodo de 60 dias de pastoreo en 4 grupos de 15 corderos en pastoreo.				
Grupos Ensayo	A	B	C	D
Gr./dia	17,9	20,5	41,8	49,5

Dispositivos para el consumo



Cuadro 24. Cambio de peso en 4 grupos de 15 ovinos consumiendo bloques minerales como mecanismo de administración del hongo controlador de nemátodos, *A. oligospora*.				
Meses /Grupo	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
Febrero	21,00±1.1	21,73±1.3	21,80±1.3	22,67±1.4
Marzo	25,54±1.1	25,30±1.6a	26,86±1.4c	26,38±1.8c
Abril	26,46±1.45	26,00±1.98a	27,47±2.13c	27,54±2.67c
Mayo	28,50±1.51	28,00±2.31a	29,20±2.57	30,08±2.29c
Ganancia de peso en el periodo Marzo -Mayo	2.96	2.7	2.82	3.7



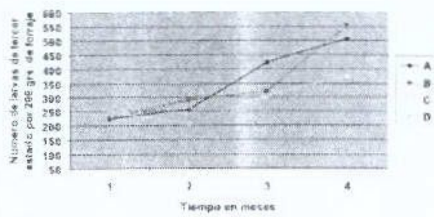
Huevos tipo Estrongylus** por gramo de fecas en ovinos en pastoreo tratados con A. oligospora administrado en bloques minerales. Hpg.				
Mes/Tratamiento	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
Febrero	0.00	0.08	0.00	0.00
Marzo	2.58	0.95	7.08	6.92
Abril	0,31	3.75	0.20	10.54
Mayo	35,67	63.21	7.09	21.25
Eficiencia de control %	-	77.26 %	-86.33%	-39.59%

Cuadro 28. Huevos de Nematodirus spp. por gramo de fecas en ovinos en pastoreo tratados con y sin A. oligospora administrado en bloques minerales. Hpg.				
	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
Febrero	0.20	0.20	0.00	0.00
Marzo	18.58	13.50	17.17	0.73
Abril	19.54	199.10	11.00	114.75
Mayo	103.33	154.46	84.43	23.18
Eficiencia de control %	-	-50.09%	18.29%	77.56%

Cuadro 29.Número de larvas de tercer estado en una pradera natural pastoreada con cuatro grupos de corderos tratados con *A. oligospora*, incorporado en bloque minerales durante 60 días o Bloques minerales mas un tratamiento antiparasitario. *(Panacur ®)*

	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
Febrero	222	222	248	248
Marzo	257	292	207	263
Abril	421	320	306	243
Mayo	504	553	376	398
%	--	109.72	74.60	78.97

Larvas de tercer estado en una pradera natural pastoreda con ovinos tratados con *A. oligospora*



III Etapa evaluativa: Establecimiento de ensayos VI Región: Predio Bandurrias.

III) Establecimiento de ensayos VI Región: Predio Bandurrias.

Evaluación del efecto de los hongos nematofagos sobre las larvas de tercer estado de nematodos en la pradera y sobre la carga parasitaria en ovinos en pastoreo, Predio Bandurrias 2006

Cuadro 30.Consumo total y diario de Bloques Minerales en un periodo de 70 días en dos grupos de borregas Hampshire en pastoreo.

	Ovinos Testigos	Ovinos Tratados
Consumo Total Bloques minerales Kg /70 días/ animal	2.380	2.170
Consumo Promedio por animal grs /día	34	31

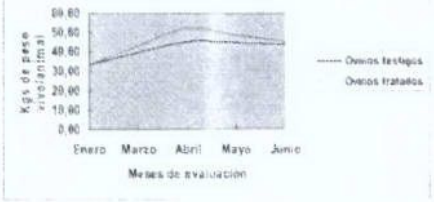
Cuadro 31.Consumos de esporas en relación al consumo de bloques minerales por ovino en animales con un peso promedio de 40 Kg.

Esporas por gramo de Bloque	Consumo diario grs. Ovinos 40 kg	Consumo de esporas por animal	Consumo de esporas por Kg de peso
$3.55*10^{8}$	31	$1,1*10^{10}$	$2,7*10^{8}$

Cuadro 32 Cambio de peso en 2 grupos de ovinos consumiendo bloques minerales como mecanismo de administración del hongo controlador de nematodos *A. oligospora*

Tratamientos	Enero	Marzo	Abril	Mayo	Junio
Ovinos testigos	33.13±2.12	38.2±2.13	45.3±2.15	44.2±2.23	43.1±2.3
Ovinos tratados	33.5±3.7	42.8±4.1**	52.3±5.09**	48.5±5.0**	45.0±5.1

Cambio de peso en Borregas tratadas con *Arthrobotrys oligospora* administrato en bloques minerales

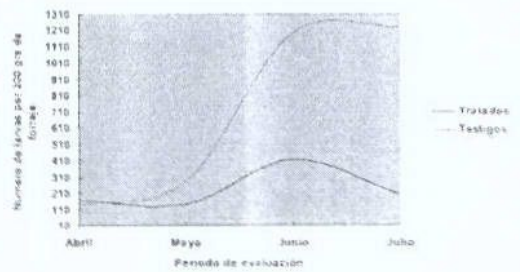


Cuadro 35. Número de larvas de tercer estado en una pradera natural pastoreada con Borregas hampshire tratados con *A. oligospora* incorporado en bloques minerales durante 70 días o Bloques minerales sin el controlador. (Larvas por 200 grs. de forraje fresco)

	Abril	Mayo	Junio	Julio
Ovinos Tratados	128.75±8.19	139.43±8.73	414±71.15a	262±58.96a
Ovinos Testigos	162.29±34.3	279.87±148.36	1193±216.3b	1232±190.7b
Eficiencia de control %	20.7	50.6	65.3	83.6

Ovinos Tratados: Bloque mineral con Nematofagos. Ovinos Testigos: Bloque mineral con nematofagos.
Test de duncan P<0.05 Letras distintas indican diferencias significativas

Evolución de la carga parasitaria en la pradera. Larvas de tercer estado/200 grs de forraje fresco



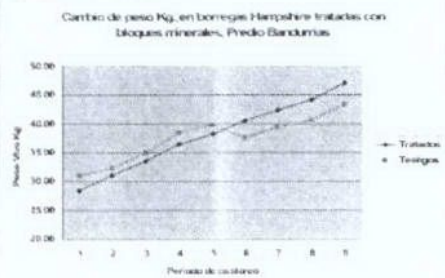
2007 Evaluación del efecto del consumo de bloques minerales sobre el cambio de peso borregas Hampshire tratadas durante un periodo de pastoreo. (96 días)

Cuadro 40. Consumo de mezcla mineral y cambio de peso en borregas Hampshire tratadas durante un periodo de pastoreo. Predio bandurrias VI Región.

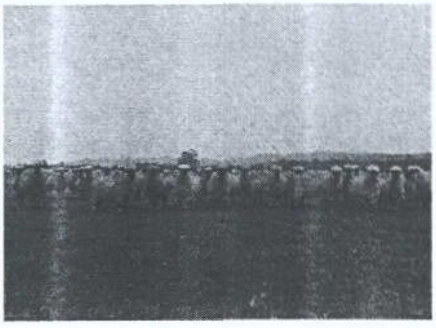
Tratamientos	P. inicial Kg.	P. final Kg.	Consumo minerales Kg.	Cambio diario de peso Kg.	Ganancia de peso Periodo Kg.
Ovinos tratados con bloques minerales	28.43±2.6a	47.00±2.9A	0.870	0.182	18.57
Ovinos testigos	31.62±2.4a	43.17±2.23b	0	0.119	12.15

Test de T P<0.05

Cambio de peso Kg. en borregas Hampshire tratadas con bloques minerales, Predio Bandurrias



Rebaño Predio bandurrias



"Aislamiento y evaluación de hongos nematófagos para el control de parásitos gastrointestinales en sistemas orgánicos de producción de carne ovina en Magallanes".

Raúl Venegas V., Médico Veterinario
Patricia Palazuelos F., Biologa MSc
Hugo Vera V., Estancia Josefina

Restricciones Agricultura ecológica

Transición
Aumento eficiencia
Sustitucion de insumo
Rediseño de sistemas

Demandas de la A. Ecológica
Insumos
Maquinaria
Diseño de sistemas
Profesionales

Reintroducción de mecanismos de regulación internos
Apertura de cuellos de botella

Articulacion con la empresa o generacion de ellas

Hongos Nematófagos

Grupo de micro-hongos (Hyphomycetes) ubicuos, comúnmente encontrados en material vegetal en descomposicion, fecas y suelo

HONGOS: ATRAPA-NEMATODOS
NEMATOFAGOS
PREDATORES

CARACTERISTICAS DE HONGOS NEMATOFAGOS

- Presentan crecimiento de hifas que se extienden en el suelo, alrededor del sustrato
- Desarrollan varios métodos de trampa basados en anillos contráctiles; hifas, prominencias o redes adhesivas
- Los órganos trampas pueden ser producidas continuamente o en respuesta a la presencia de nematodos

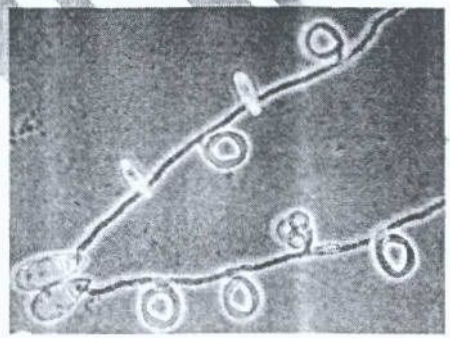
Estructuras de captura Hongos nematófagos

REDES ADHESIVAS

HIFAS ADHESIVAS

PROMINENCIAS ADHESIVAS

ANILLOS CONSTRICTORES



Hongos Nematófagos

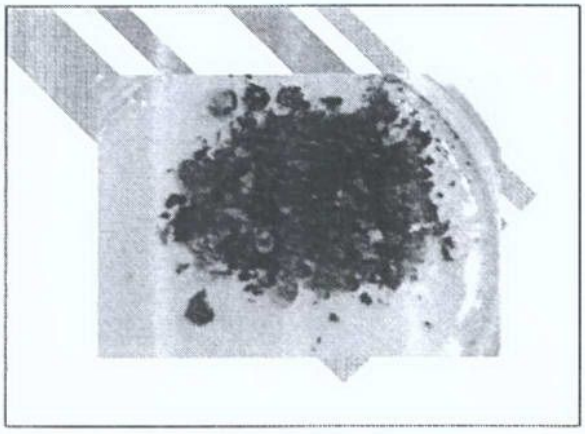
Arthrobotrys oligospora, Duddingtonia flagrans,

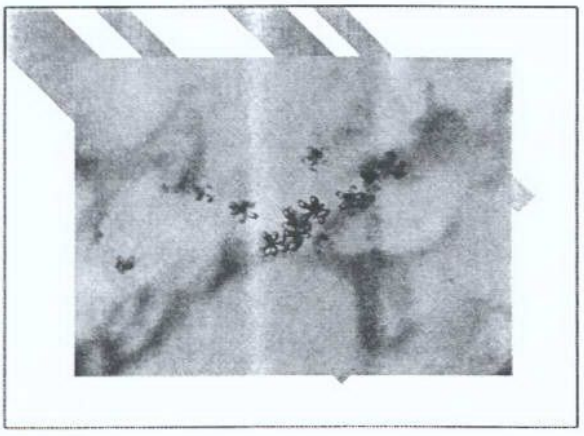
- Producen estructuras resistentes (clamidosporas), que le permiten sobrevivir el paso a través del tracto gastrointestinal (anaerobiosis, enzimas, temperatura)
- Reproducción en sustrato sólido

⇩

Hongo en sustrato sólido se mezcla con la dieta de los animales susceptibles al parasitismo:

Esporas en el alimento ⟶ atraviesan el tracto digestivo ⟶ el hongo cae junto con las fecas ⟶ germina, desarrolla estructuras trampa y reduce los estados infectivos



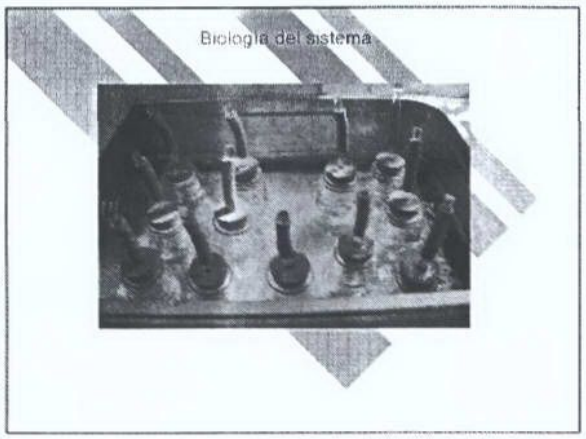


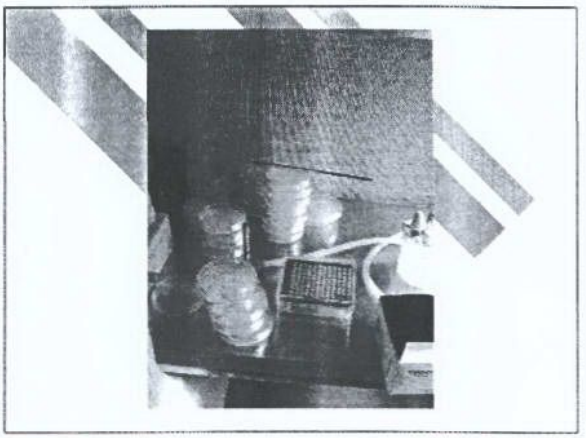
Parásitos y organos parasitados en ovinos y caprinos

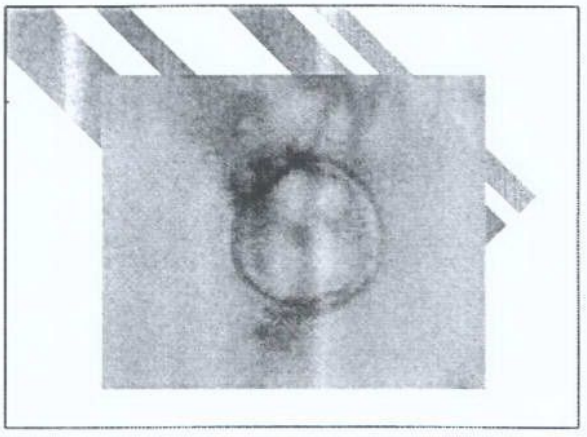
Abomaso	Nematodos	*Haemonchus contortus* *Ostertagia circumcincta* *Ostertagia trifurcata*
Intestino delgado	Nematodos	*Toxocara vitulorum* *Cooperia spp.* *Trichostrongylus spp.* *Nematodirus spp.* *Strongyloides papillosus* *Capillaria spp.*
Ciego y colon	Nematodos	*Oesophagostomum spp.* *Chabertia ovina* *Trichuris ovis*

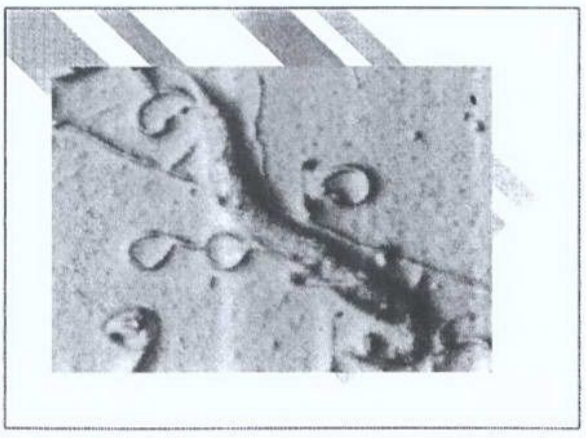
Terapéutica tradicional para parasitismo

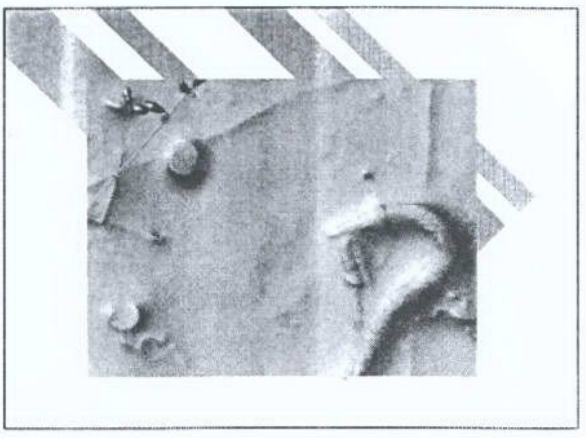
- *A nivel del hospedador*, mediante el empleo de antihelmínticos como vía para eliminar a los parásitos y de esta manera destruir la fuente de contaminación de los potreros.
- *A nivel del medio ambiente*, para impedir el contacto entre las formas infestantes de los parásitos con los animales del rebaño (95% masa de parasitaria, introd. mecanismos de regulación)

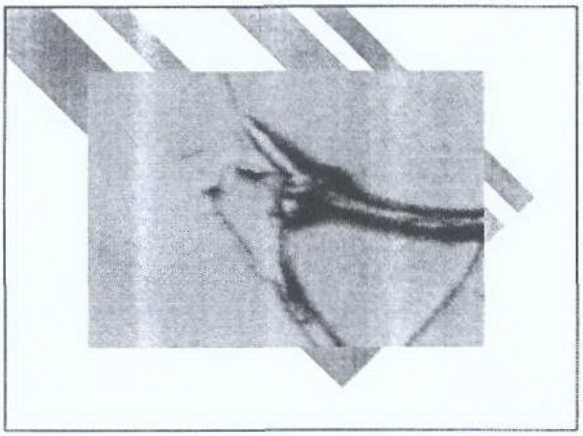

Biología del sistema

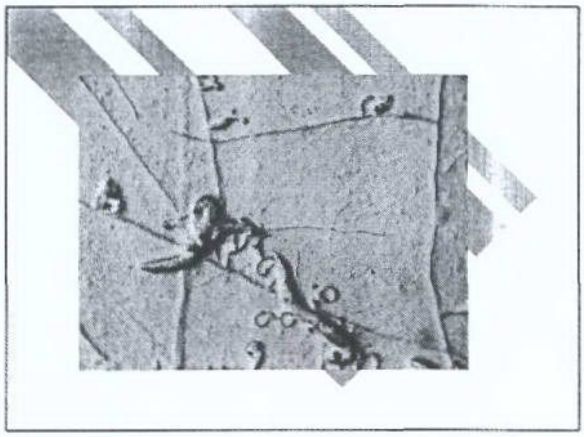




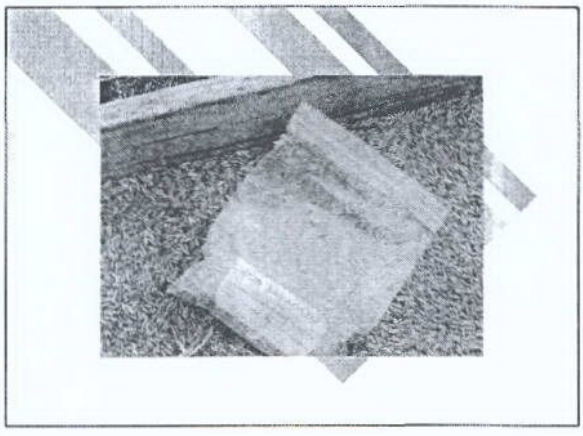


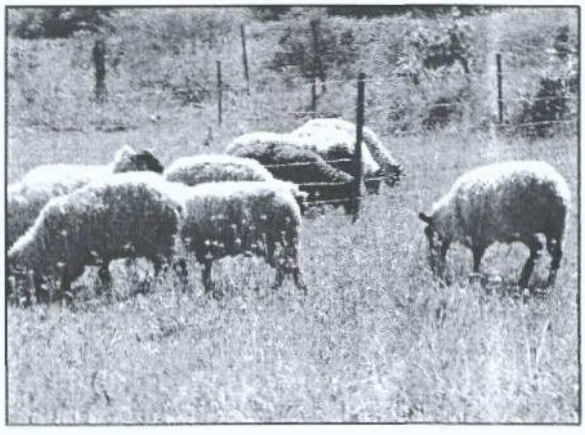


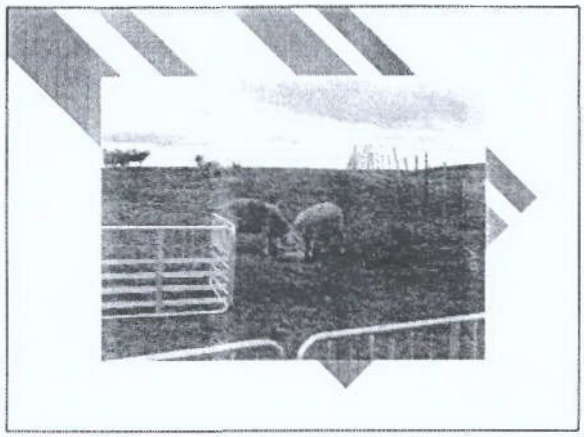




Desarrollo tecnológico





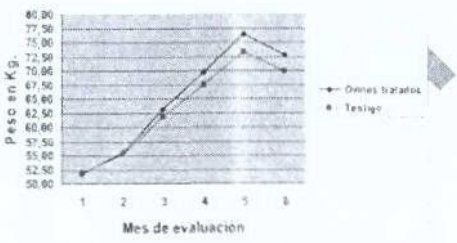


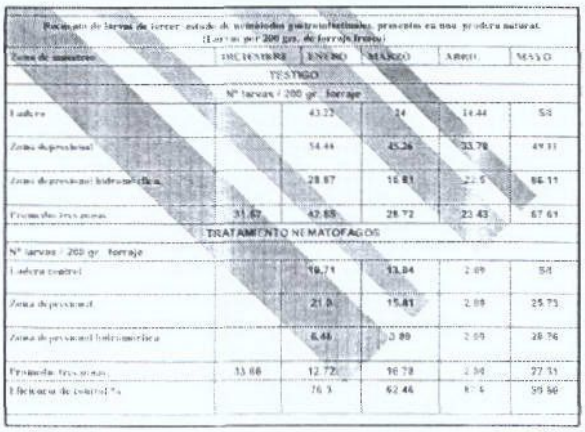
Grado de control de diferentes aislados de hongos nematófagos sobre 1000 larvas de nemátodos

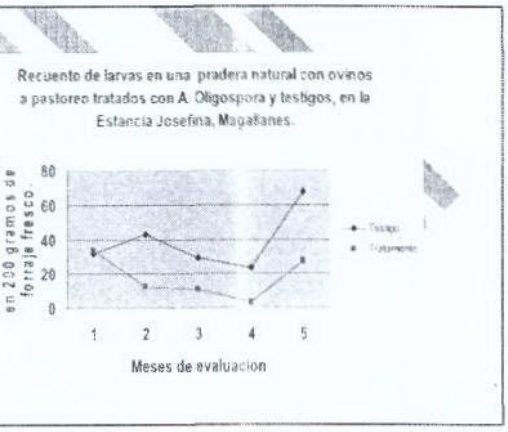
Aislados	Horas de evaluación	N° de nematodos vivos	Eficiencia %
A	48	0	100
B	48	5	99.5
C	48	132	86.8
	72	25	97.5
	96	2	99.8

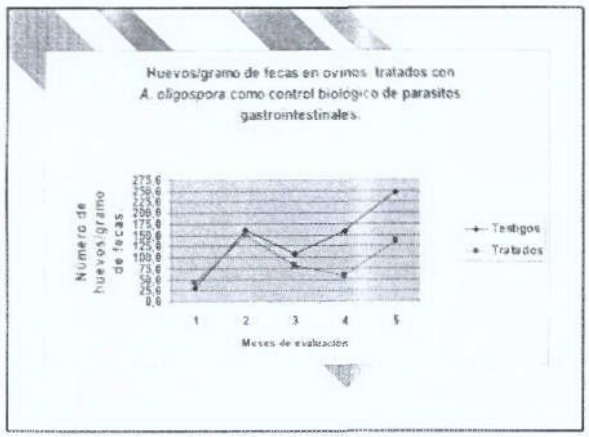
Administración de Biopreparado en base a *A. oligospora* a 15 ovinos en dosis de 10^8 conidias por Kg. de p. v.

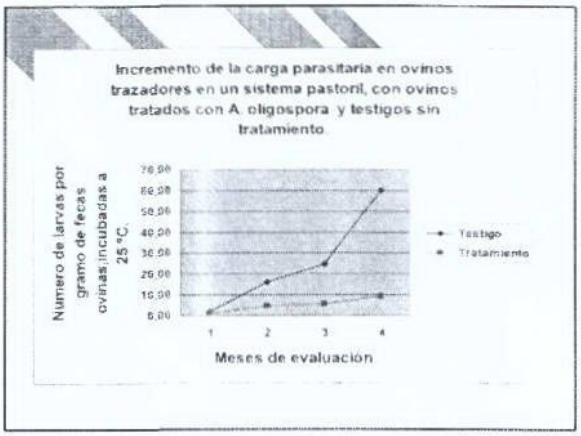
Peso animales	Animales tratados 51.08 ±3.1	Testigos 51.9±4.1
Avena grano	200 grs./ovino	200 grs./ovino
Sustrato deshidratado Por 8 semanas	17-22 grs./grupo/día	0











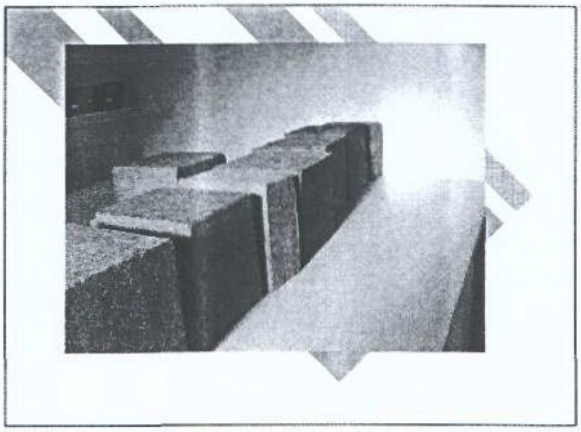
Segunda Etapa evaluativa

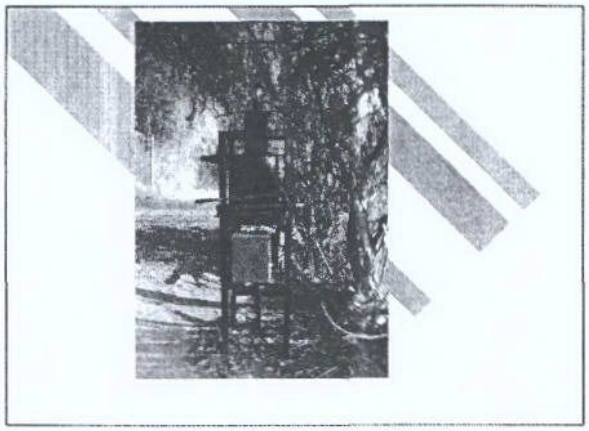
Grupo A: Bloque mineral sin Nematófagos.

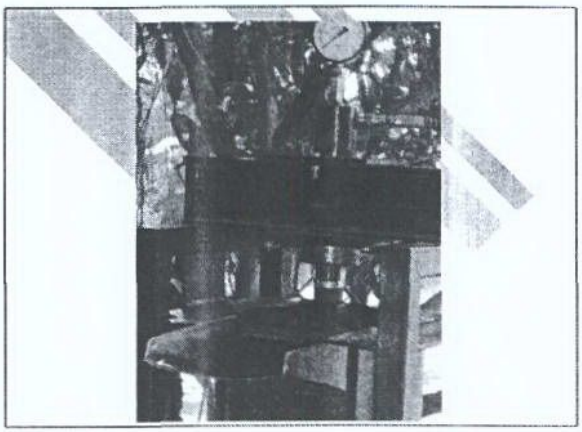
Grupo B: Bloque mineral sin nematófago +Antiparasitario Panacur®.

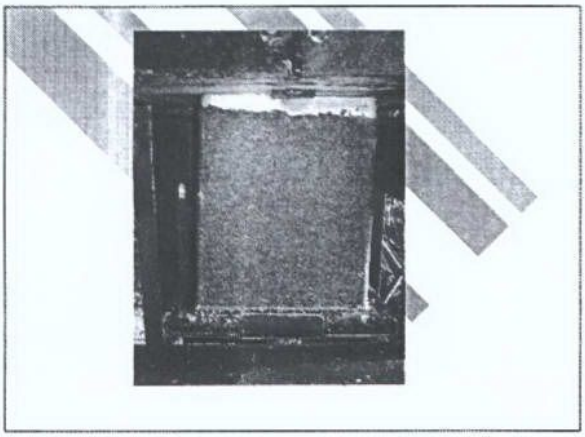
Grupo C: Bloque mineral con nematófago.

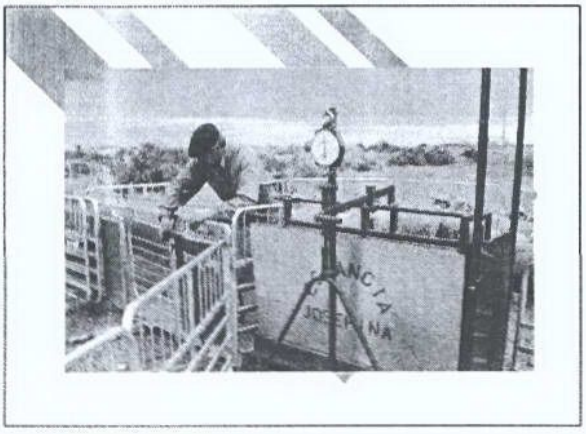
Grupo D: Bloque mineral con nematófago +Antiparasitario Panacur®;

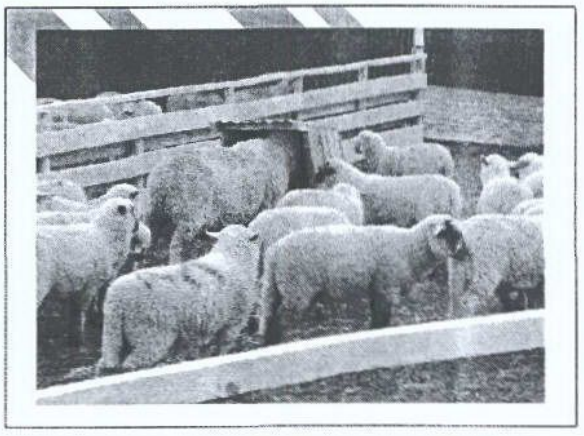


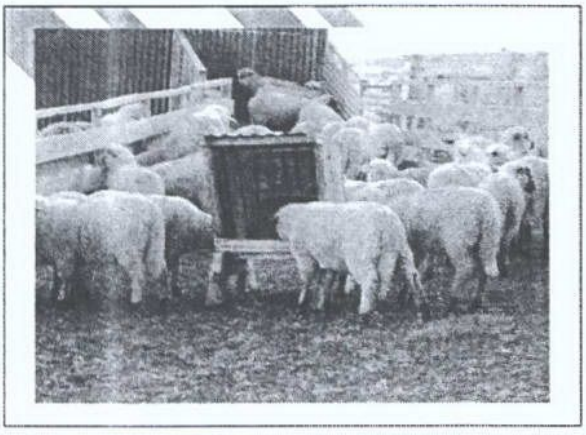


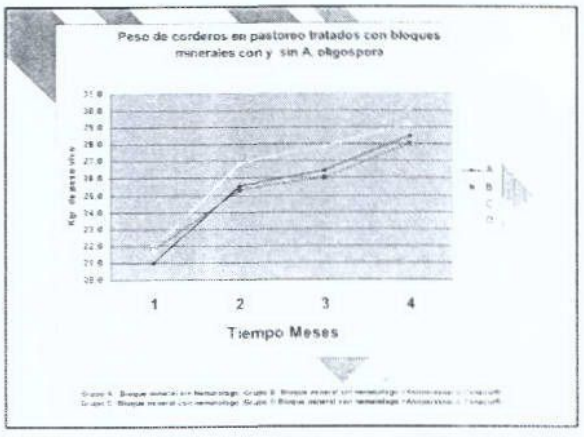








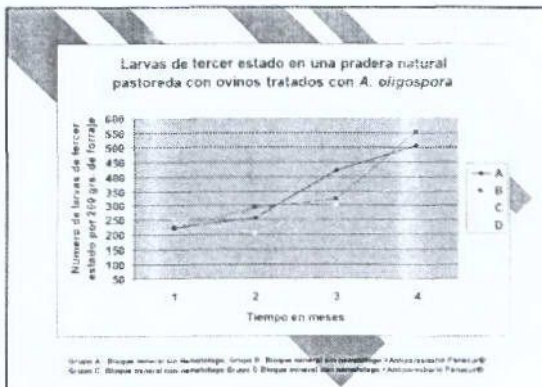



Peso de corderos en pastoreo tratados con bloques minerales con y sin A. oligospora
Kg. de peso vivo
1
2
3
4
Tiempo Meses

Número de larvas de tercer estado en una pradera natural pastoreada con cuatro grupos de corderos tratados con *A. oligospora*, incorporado en bloque minerales durante 60 días o Bloques minerales mas un tratamiento antiparasitario. (*Panacur* ®)

Mes	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
Febrero	222	222	248	248
Marzo	257	292	207	263
Abril	421	320	306	243
Mayo	504	563	376	398

Grupo A: Bloque mineral sin nematodega. Grupo B: Bloque mineral sin nematodega + Arthrobotrys oligospora (Panacur®)
Grupo C: Bloque mineral con nematodega. Grupo D: Bloque mineral con nematodega + Arthrobotrys oligospora (Panacur®)

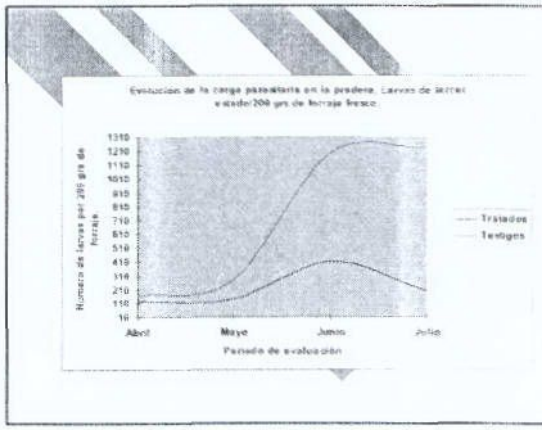


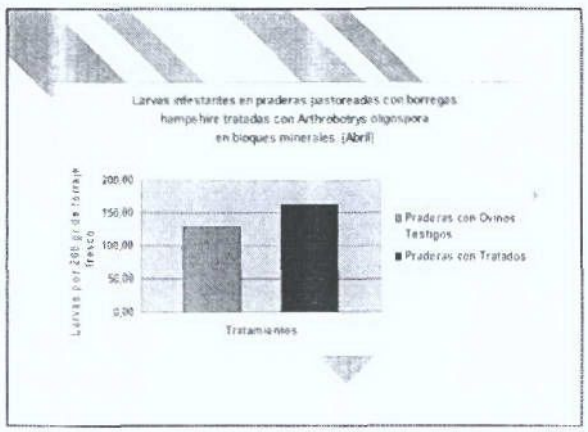
Grupo A: Bloque mineral sin nematodega. Grupo B: Bloque mineral sin nematodega + Arthrobotrys oligospora (Panacur®)
Grupo C: Bloque mineral con nematodega. Grupo D: Bloque mineral con nematodega + Arthrobotrys oligospora (Panacur®)

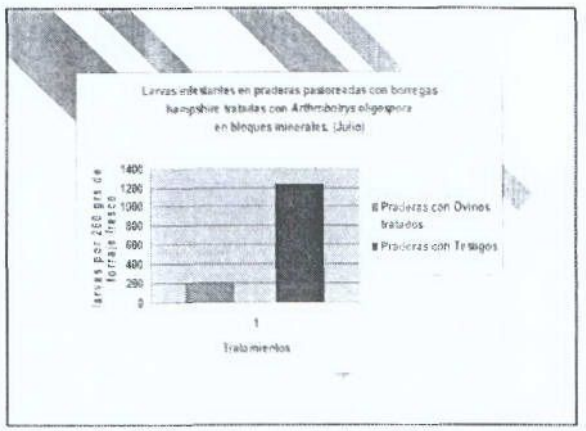
Tercera Etapa

Evaluación del efecto de A. Oligospora sobre la población de larvas de nematodos en una pradera bajo manejo intensivo pastoreada por ovinos Hampshire. Rebaño Comercial 400 borregas

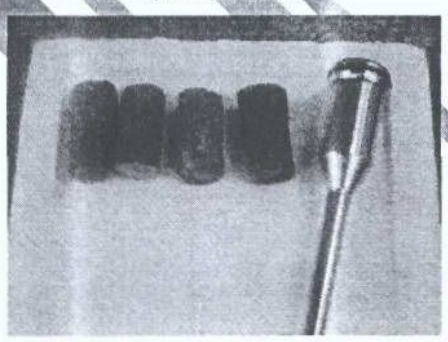
Julio 2006



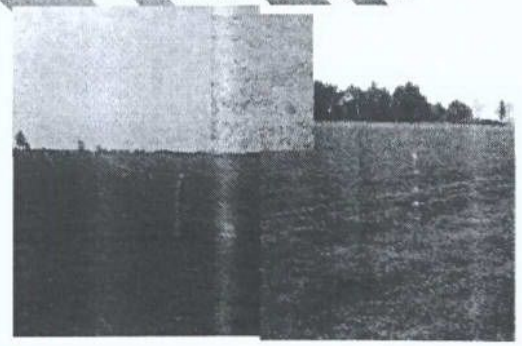




Cápsulas y lanzabolos

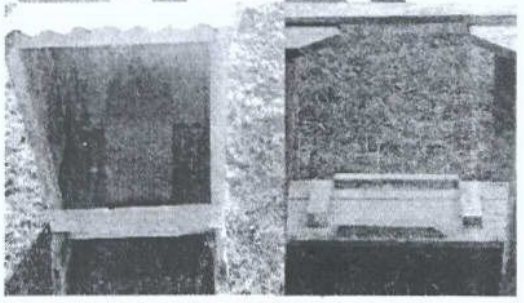


Manejo de praderas y fertilización



Condición general de los ovinos

Dispositivos para el consumo



"Aislamiento y evaluación de hongos nematófagos para el control de parásitos gastrointestinales en sistemas orgánicos de producción de carne ovina en Magallanes".

Raúl Venegas V., Médico Veterinario, Msc. (MVS)
Patricia Fuentes F., Biólogo MSc.
Hugo Soto V., Estación Josefina

Hongos Nematófagos

Grupo de micro-hongos (Hyphomycetes) ubicuos, comúnmente encontrados en material vegetal en descomposición, fecas y suelo.

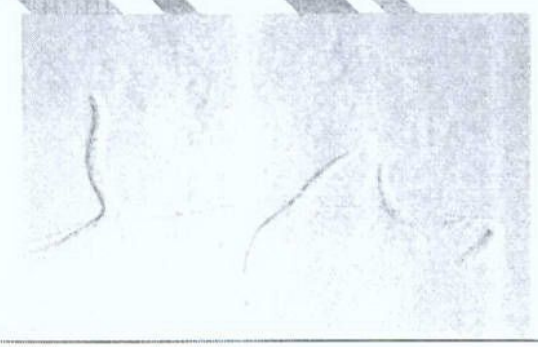
HONGOS: ATRAPA-NEMATODOS
NEMATOFAGOS
PREDATORES

CARACTERISTICAS DE HONGOS NEMATOFAGOS

- Presentan crecimiento de hifas que se extienden en el suelo, alrededor del sustrato
- Desarrollan varios métodos de trampa basados en anillos contráctiles; hifas, prominencias o redes adhesivas
- Los órganos trampas pueden ser producidas continuamente o en respuesta a la presencia de nemátodos

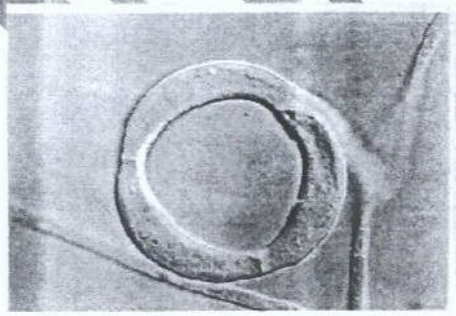
REDES ADHESIVAS

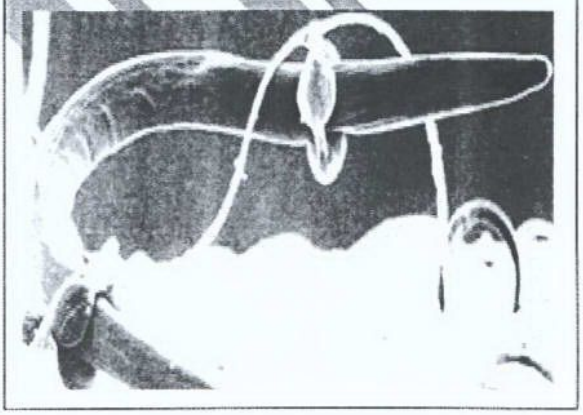
HIFAS ADHESIVAS

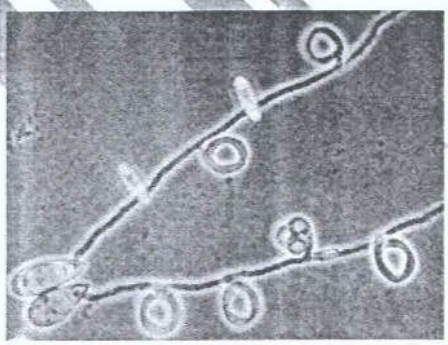


PROMINENCIAS ADHESIVAS

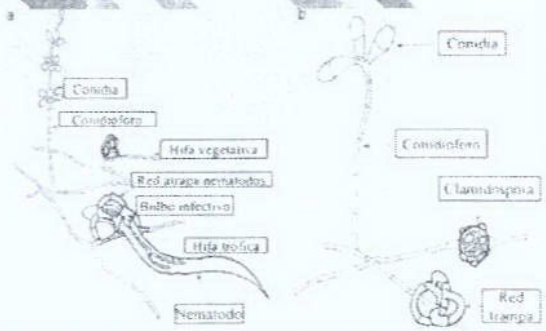
ANILLOS ADHESIVOS







HONGO ATRAPA NEMATODOS



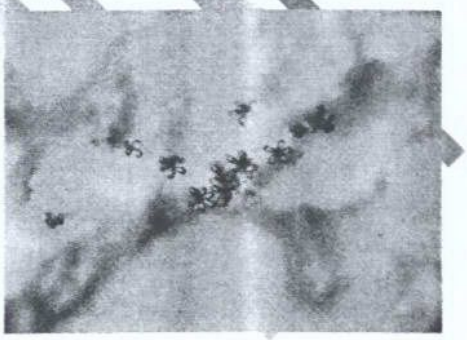
Hongos Nematófagos

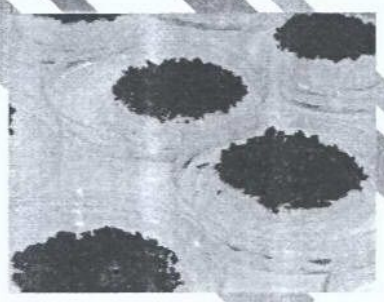
Duddingtonia flagrans, *Arthrobotrys oligospora*

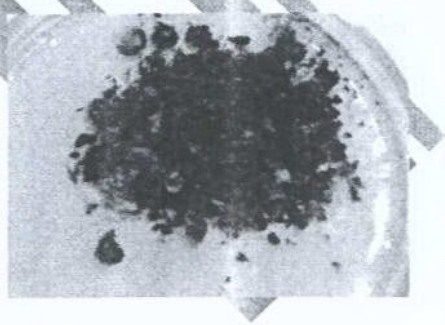
- Producen estructuras resistentes (clamidosporas) que le permiten sobrevivir el paso a través del tracto gastrointestinal (anaerobiosis, enzimas, temperatura)
- Reproducción en sustrato sólido

Hongo en sustrato sólido se mezcla con la dieta de los animales susceptibles al parasitismo:

Esporas en el alimento → atraviesa el tracto digestivo → el hongo cae junto con las fecas → germina, desarrolla estructuras trampa y reduce los estados infectivos







Resumen de parasitos y organos parasitados en ovinos y caprinos

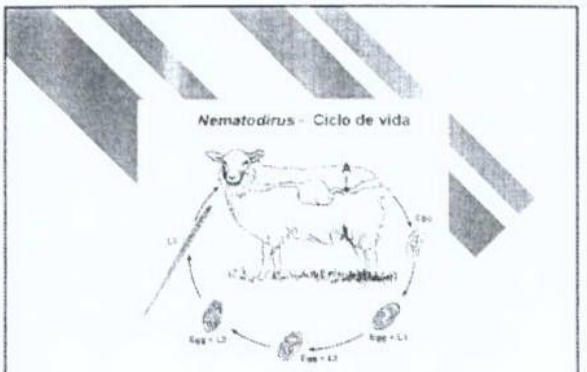
Abomaso	Nematodos	*Haemonchus contortus* *Ostertagia circumcincta* *Ostertagia trifurcata*
Intestino delgado	Nematodos	*Toxocara vitulorum* *Cooperia spp.* *Trichostrongylus spp.* *Nematodirus spp.* *Strongyloides papillosus* *Capillaria spp.*
Ciego y colon	Nematodos	*Oesophagostomum spp.* *Chabertia ovina* *Trichuris ovis*

Terapéutica tradicional para parasitismo

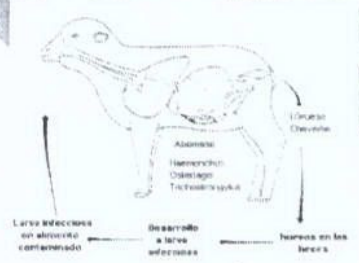
- La terapéutica tradicional se ha basado en el control químico mediante el uso de antihelmínticos.
- El desarrollo de estrategias de control de las helmintiasis abarca dos niveles:

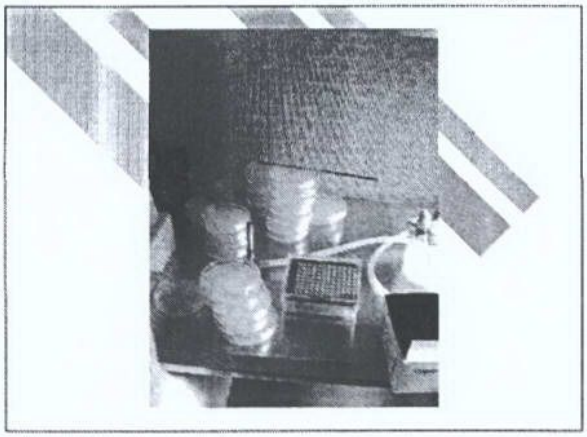
Terapéutica tradicional para parasitismo

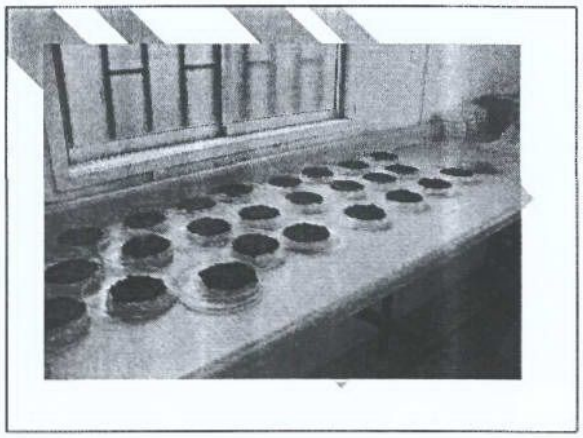
- *A nivel del hospedador:* mediante el empleo de antihelmínticos como vía para eliminar a los parásitos y de esta manera destruir la fuente de contaminación de los potreros.
- *A nivel del medio ambiente:* para impedir el contacto entre las formas infestantes de los parásitos con los animales del rebaño.

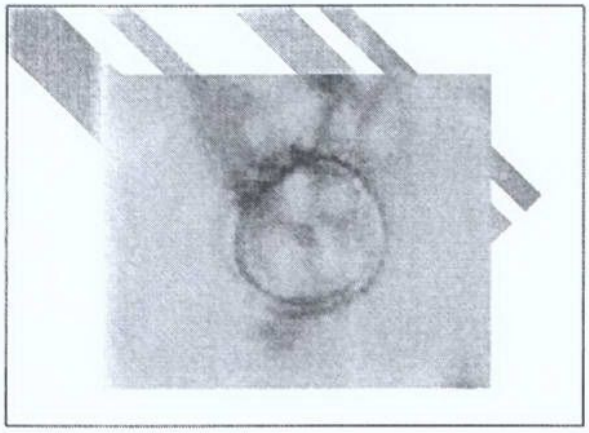


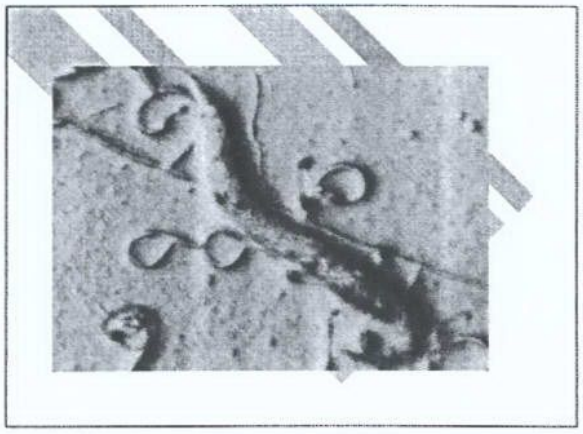
Parasitismo a pastoreo en ovinos

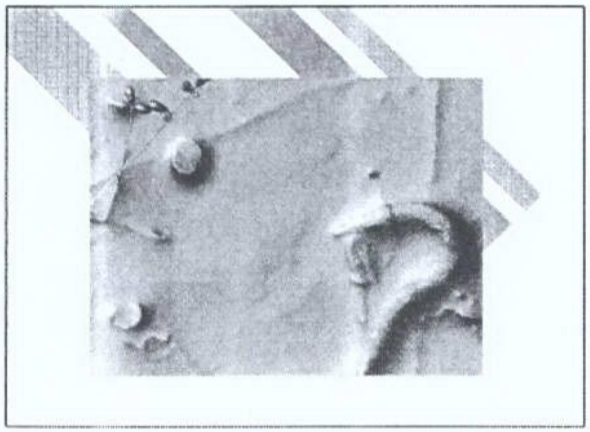


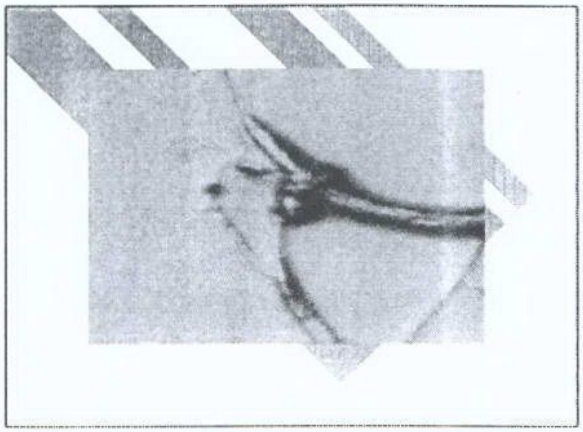


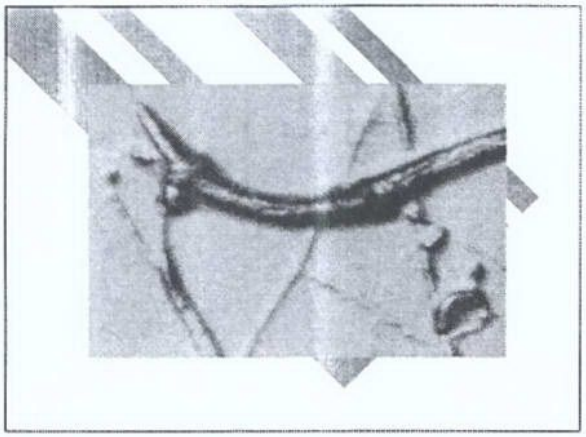


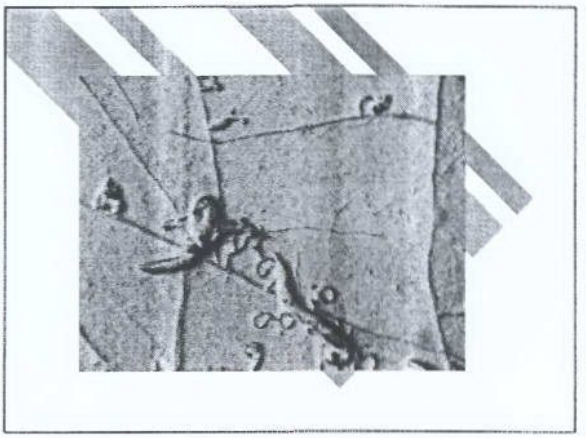


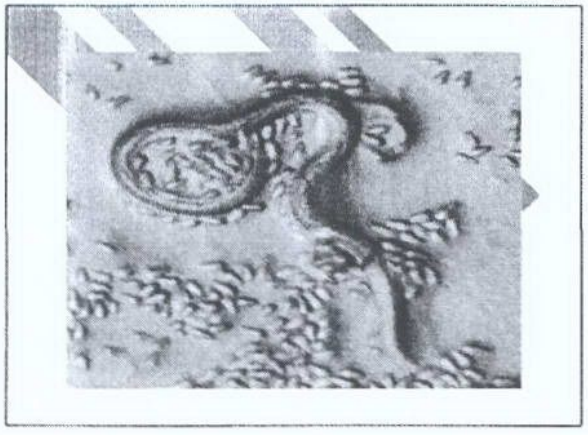


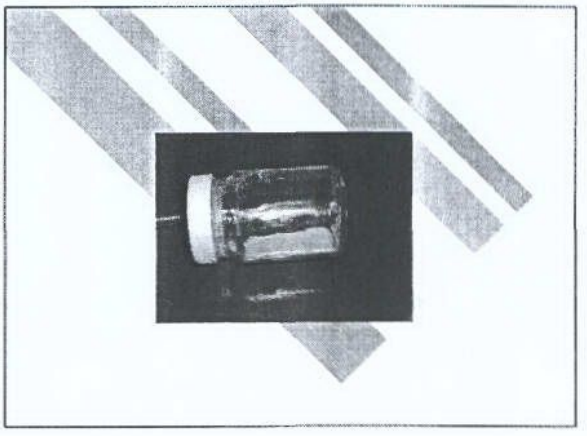


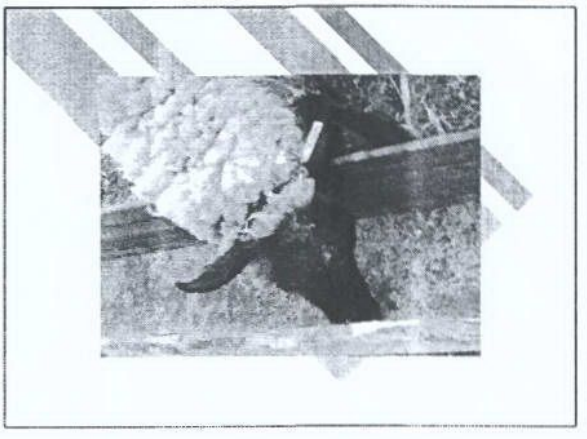


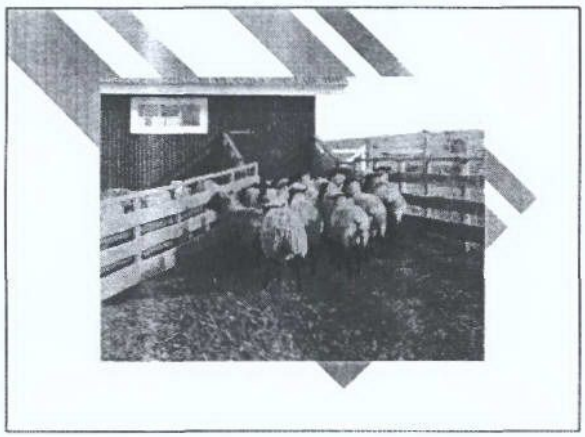


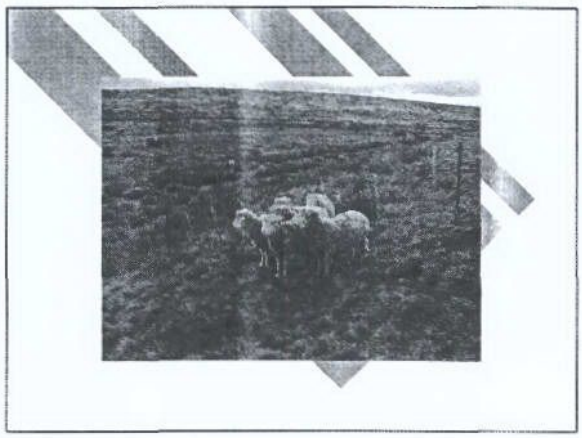


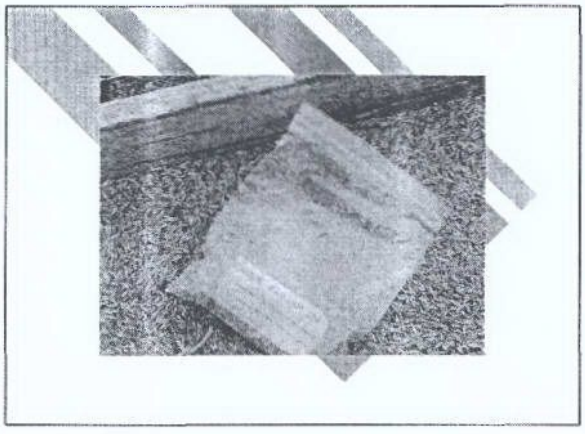


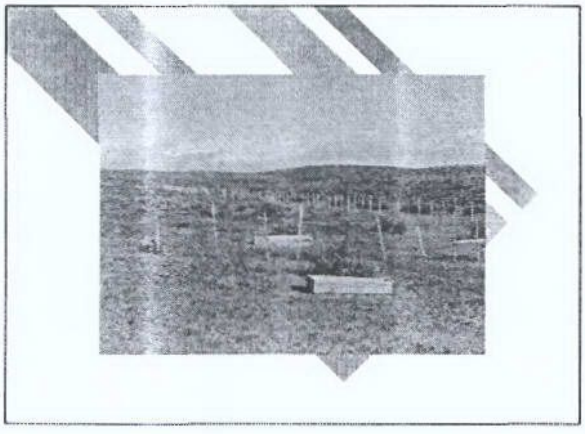


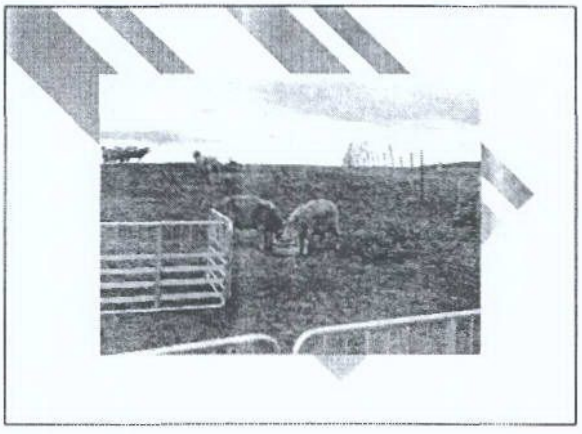


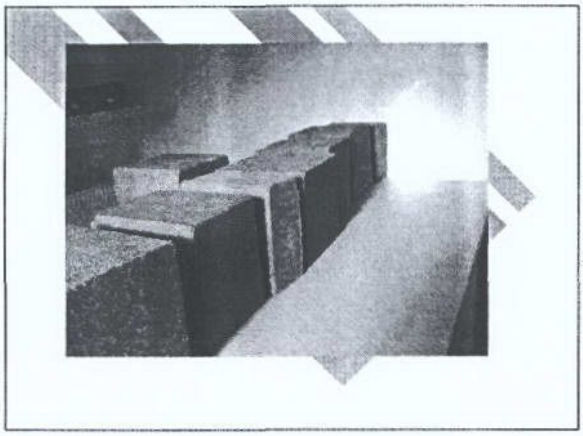


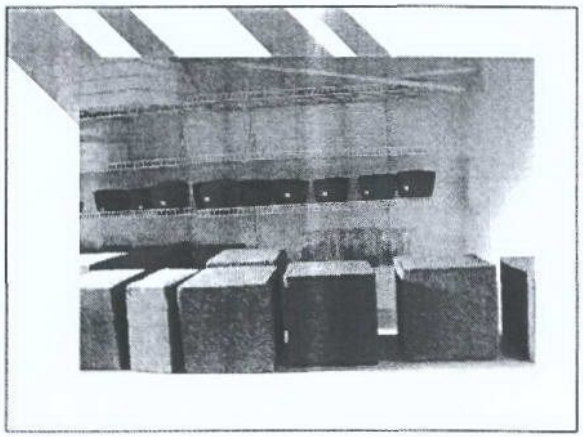


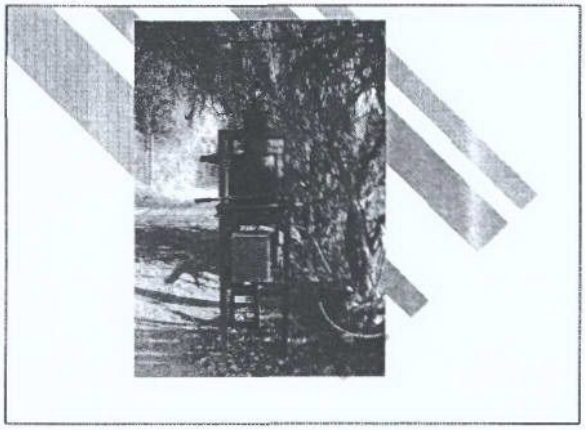


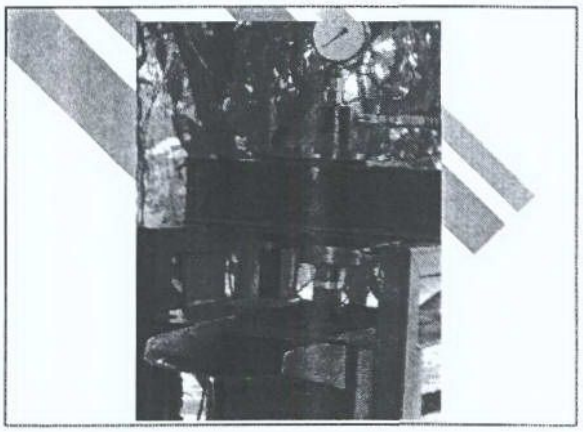


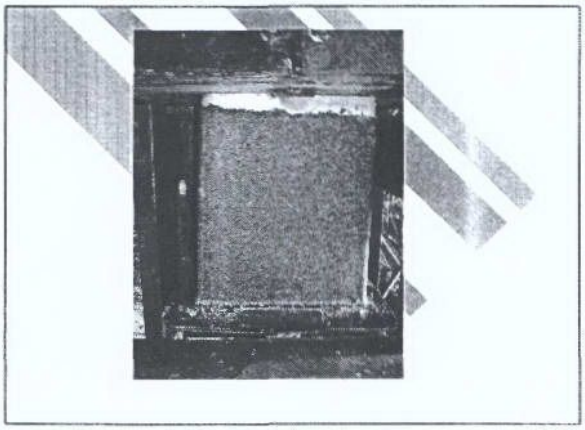


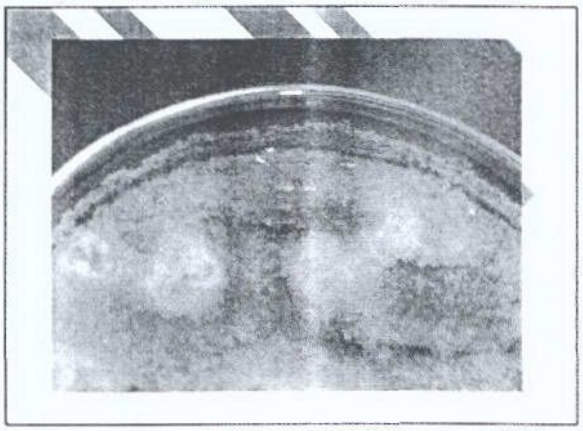


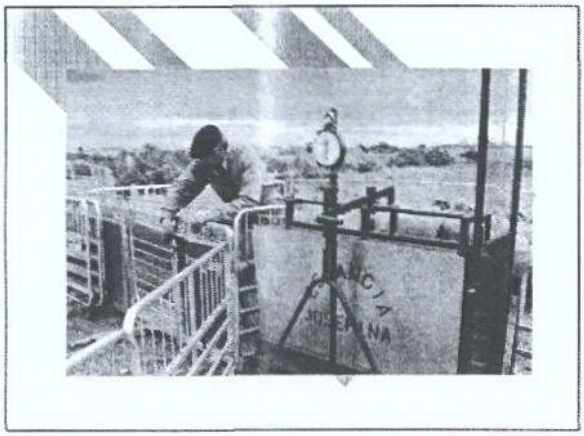


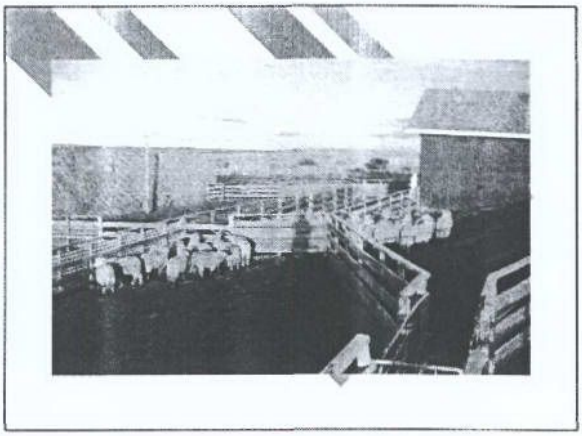


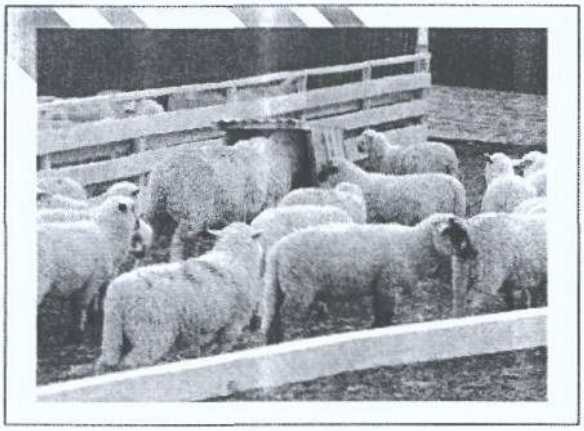


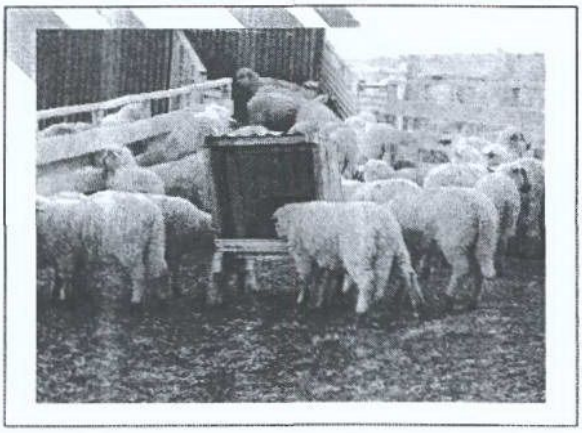


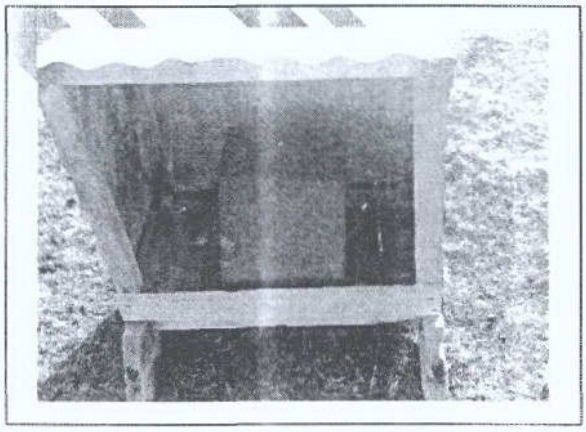


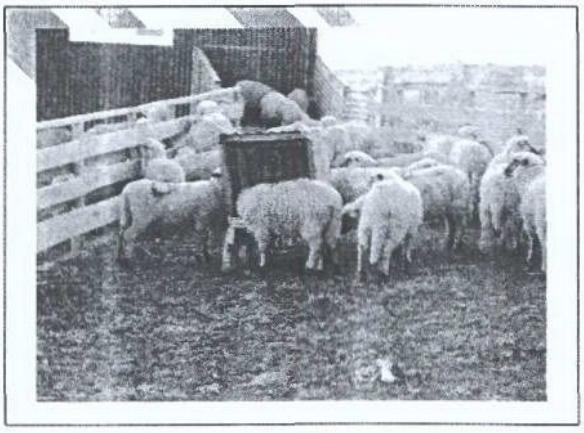












Grado de control de diferentes aislados de hongos nematófagos sobre 1000 larvas de nemátodos

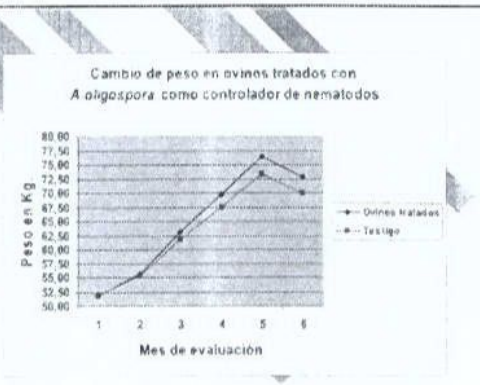
Aislados	Horas de evaluación	N° de nematodos vivos	Eficiencia %
A	48	0	100
B	48	5	99.5
C	48	132	86.8
	72	25	97.5
	96	2	99.8

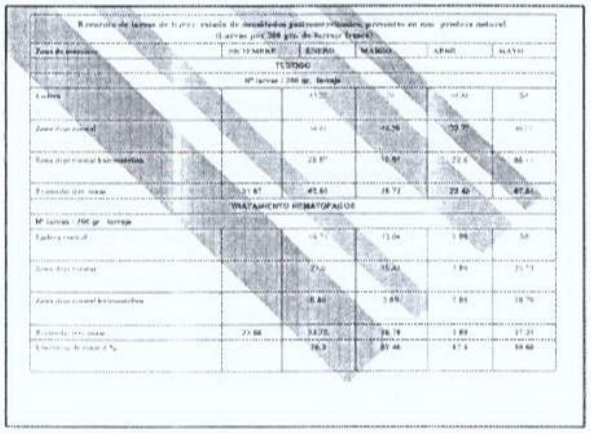
Administración de Biopreparado en base a *A. oligospora* a 15 ovinos en dosis de 10^8 conidias por Kg. de p. v.

Peso animales	Animales tratados 51.08 ±3,1	Testigos 51.9±4.1
Avena grano	200 grs./ovino	200 grs./ovino
Sustrato deshidratado Por 8 semanas	17-22 grs./grupo/dia	0

Cambio de Peso (Kg.) en 15 ovinos tratados con *A. oligospora* en dosis de 2 gramos por animal. $2,5 * 10^8$ conidias por gramo de preparado.

Tratamiento	DICIEMBRE	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL	MAYO
Ovinos tratados *A. Oligospora*	51.86±4.35	55.54±4.24	63.07±4.24	69.76±4.45	78.33±4.84	72.86±4.21
Grupo Testigos	51.87±3.40	55.13±3.82	61.66±3.86	67.43±4.23	73.20±4.66	69.58±4.83

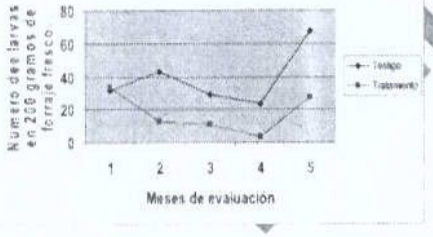




Evolución del número de larvas infectivas en una pradera natural con ovinos tratados con *A. oligospora* como controlador.
Larvas L3 / 200 gr. de forraje fresco

	Diciembre	Enero	Marzo	Abril	Mayo
Testigo	31.67	42,85	28,72	23.43	67.61
Tratamiento	33.66	12.72	10,78	2,89	27.31

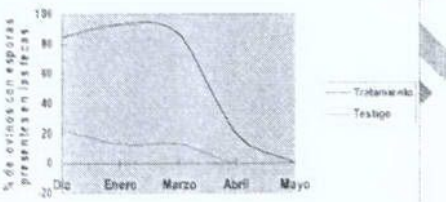
Recuento de larvas en una pradera natural con ovinos a pastoreo tratados con A. Oligospora y testigos, en la Estancia Josefina, Magallanes.



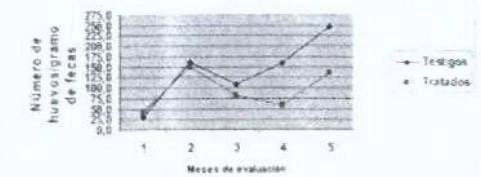
Presencia/ausencia del inoculo *de A. oligospora* en los animales bajo experimentación %.

Mes de evaluación	Tratamiento	Testigo
Diciembre	84,6	23,07
Enero	93,33	13,33
Marzo	86,66	13,33
Abril	20	0
Mayo	0	0

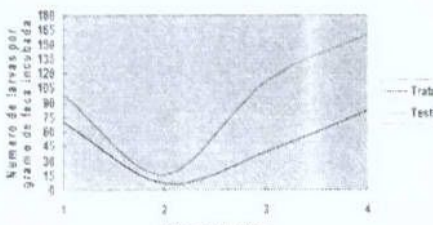
Presencia de A. oligospora %,en las fecas de dos grupos de 15 ovinos, tratados y testigos.



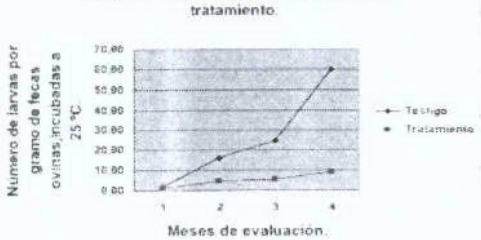
Huevosigramo de fecas en ovinos tratados con *A. oligospora* como control biologico de parasitos gastrointestinales

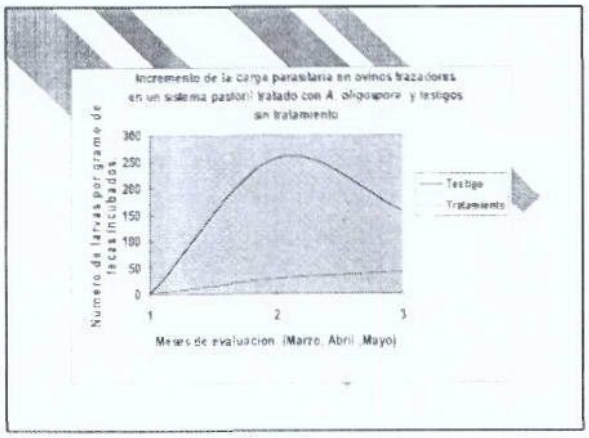


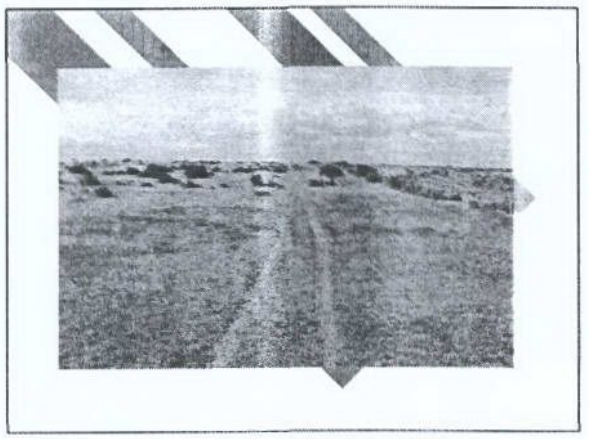
Larvas por gramo de fecas, incubadas a 25°C en ovinos tratados con *A.oligospora*.



Incremento de la carga parasitaria en ovinos trazadores en un sistema pastoril, con ovinos tratados con A. oligospora y testigos sin tratamiento.




Incremento de la carga parasitaria en ovinos trazadores en un sistema pastoril tratado con A. oligospora y testigos sin tratamiento
Numero de larvas por gramo de heces incubados
360
250
200
150
100
50
0
1
2
3
Meses de evaluacion (Marzo, Abril, Mayo)
Testigo
Tratamiento



"Aislamiento y evaluación de hongos nematófagos para el control de parásitos gastrointestinales en sistemas orgánicos de producción de carne ovina en Magallanes".

Raúl Venegas V., Médico Veterinario, Mgs. DMV (c)
Patricia Palazuelos F., Biologa MSc
Hugo Vera V., Estancia Josefina

Hongos Nematófagos

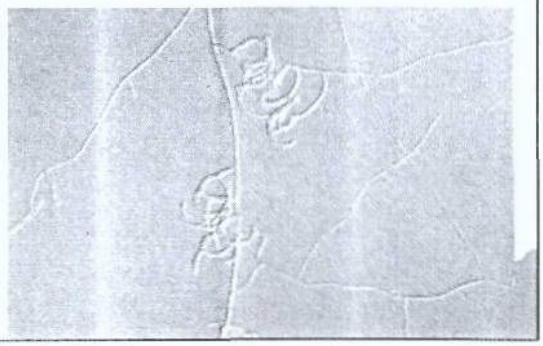
Grupo de micro-hongos (Hyphomycetes) ubicuos, comúnmente encontrados en material vegetal en descomposición, fecas y suelo

HONGOS: ATRAPA-NEMATODOS
NEMATOFAGOS
PREDATORES

CARACTERISTICAS DE HONGOS NEMATOFAGOS

- Presentan crecimiento de hifas que se extienden en el suelo, alrededor del sustrato
- Desarrollan varios métodos de trampa basados en anillos contráctiles; hifas, prominencias o redes adhesivas
- Los órganos trampas pueden ser producidas continuamente o en respuesta a la presencia de nemátodos

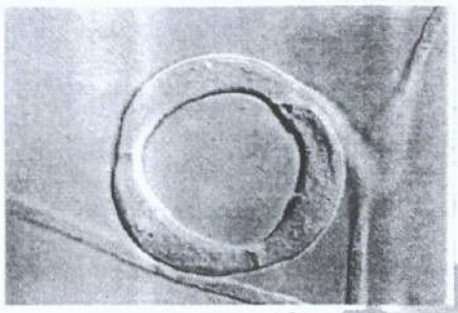
REDES ADHESIVAS

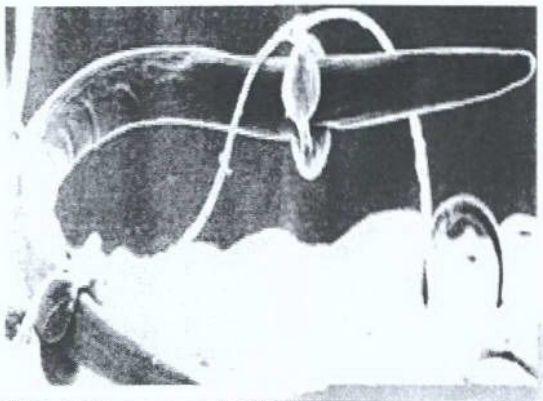


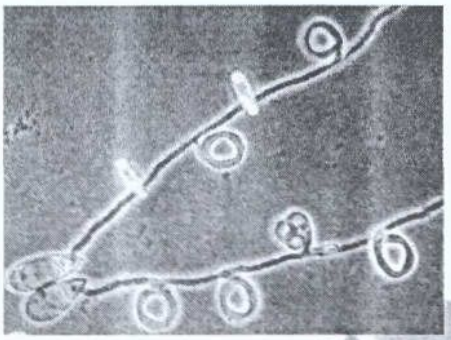
HIFAS ADHESIVAS

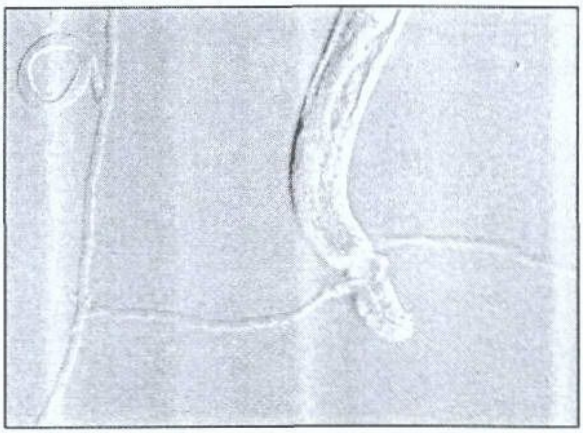
PROMINENCIAS ADHESIVAS

ANILLOS ADHESIVOS

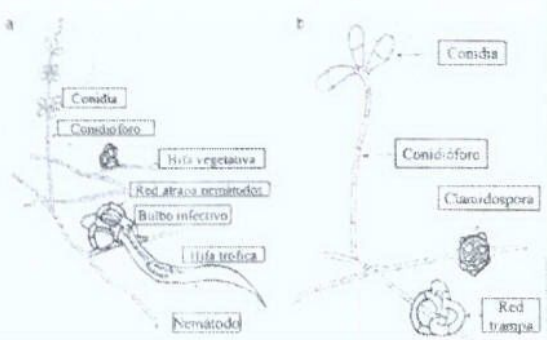








HONGO ATRAPA NEMATODOS



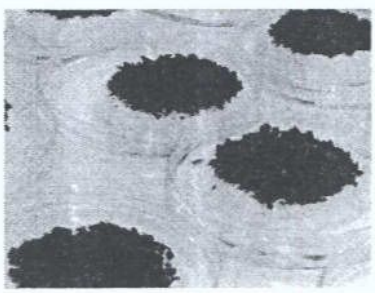
Hongos Nematòfagos

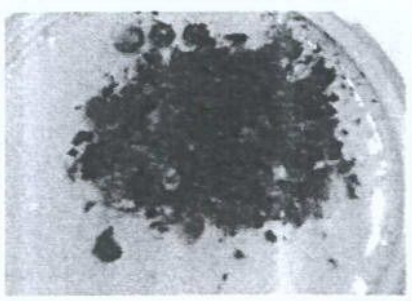
Duddingtonia flagrans, Arthrobotrys oligospora

- Producen estructuras resistentes (clamidosporas) que le permiten sobrevivir el paso a través del tracto gastrointestinal (anaerobiosis, enzimas, temperatura)
- Reproducción en sustrato sólido

Hongo en sustrato sólido se mezcla con la dieta de los animales susceptibles al parasitismo

Esporas en el alimento → atraviesa el tracto digestivo → el hongo cae junto con las fecas → germina, desarrolla estructuras trampa y reduce los estados infectivos





Resumen de parasitos y organos parasitados en ovinos y caprinos

Abomaso	Nematodos	*Haemonchus contortus* *Ostertagia circumcincta* *Ostertagia trifurcata*
Intestino delgado	Nematodos	*Toxocara vitulorum* *Cooperia spp.* *Trichostrongylus spp.* *Nematodirus spp.* *Strongyloides papillosus.* *Capillaria spp*
Ciego y colon	Nematodos	*Oesophagostomum spp.* *Chabertia ovina* *Trichuris ovis*

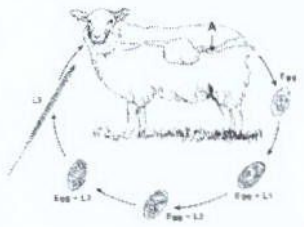
Terapéutica tradicional para parasitismo

- La terapéutica tradicional se ha basado en el control químico mediante el uso de antihelmínticos.
- El desarrollo de estrategias de control de las helmintiasis abarca dos niveles

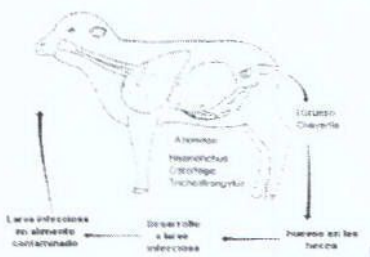
Terapéutica tradicional para parasitismo

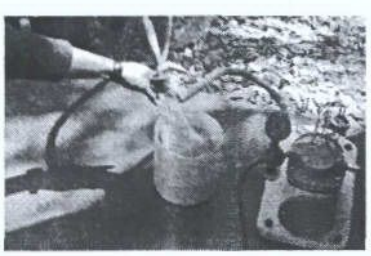
- *A nivel del hospedador:* mediante el empleo de antihelmínticos como vía para eliminar a los parásitos y de esta manera destruir la fuente de contaminación de los potreros
- *A nivel del medio ambiente:* para impedir el contacto entre las formas infestantes de los parásitos con los animales del rebaño.

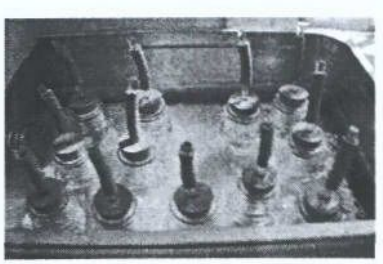
Nematodirus - Ciclo de vida

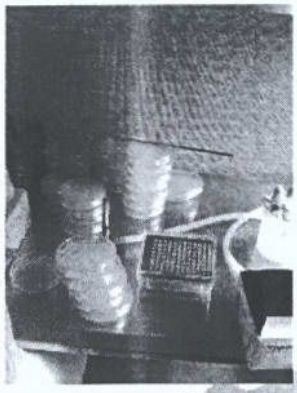


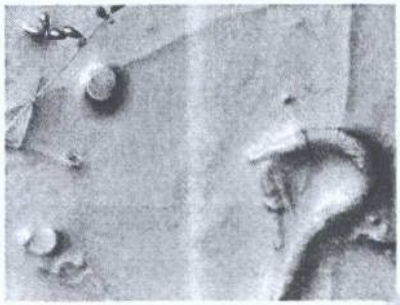
Parasitismo a pastoreo en ovinos

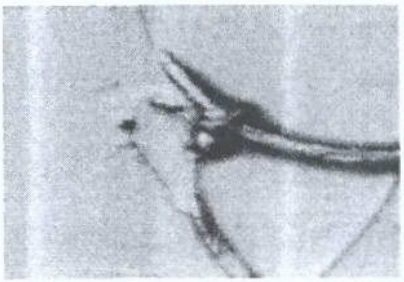


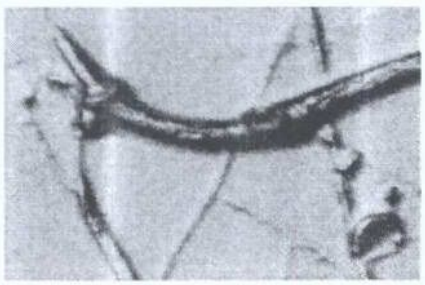


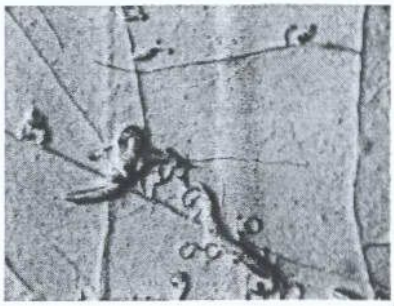


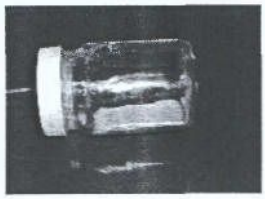


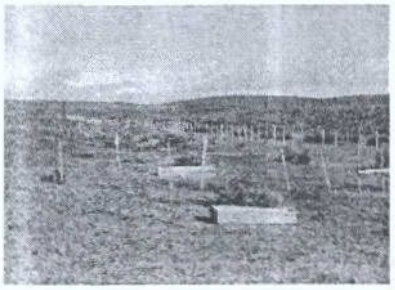


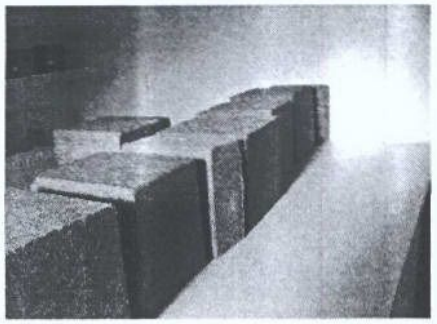


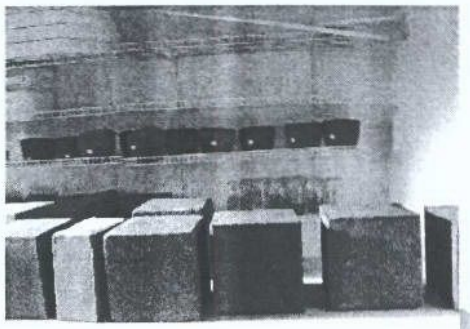


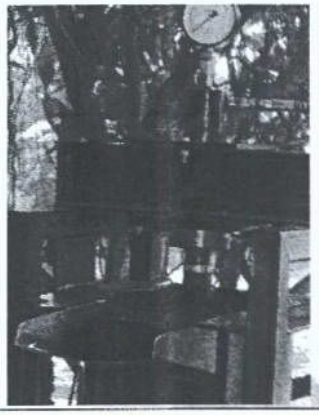


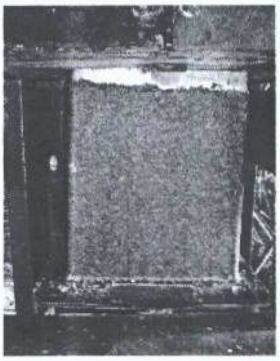


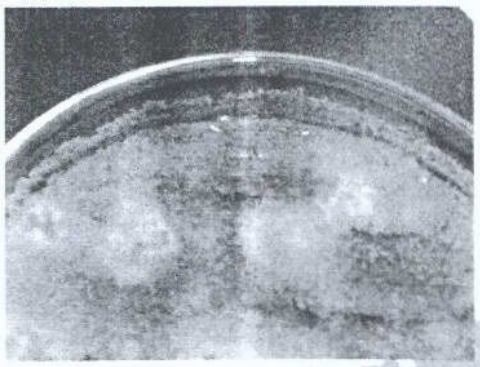


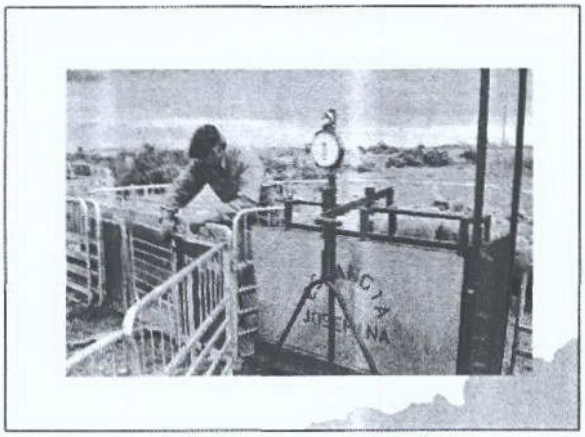


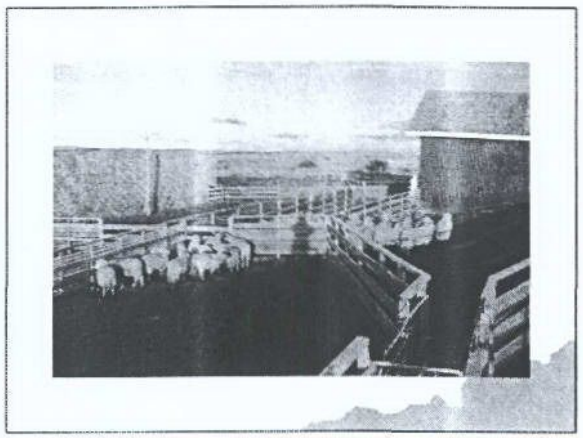


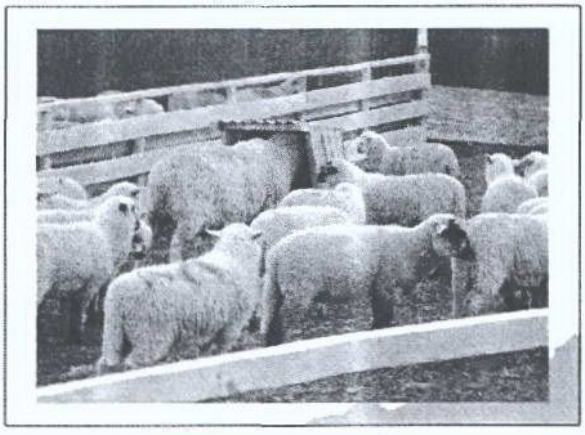


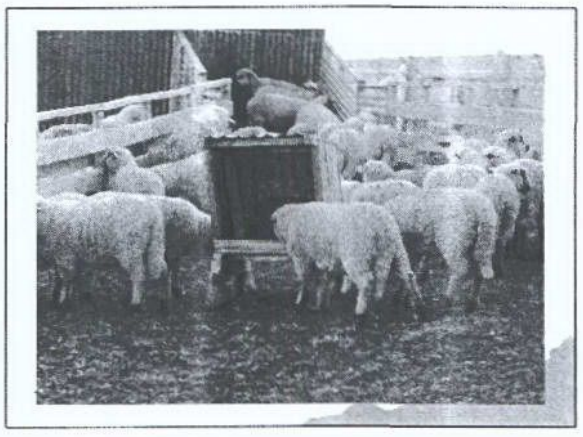


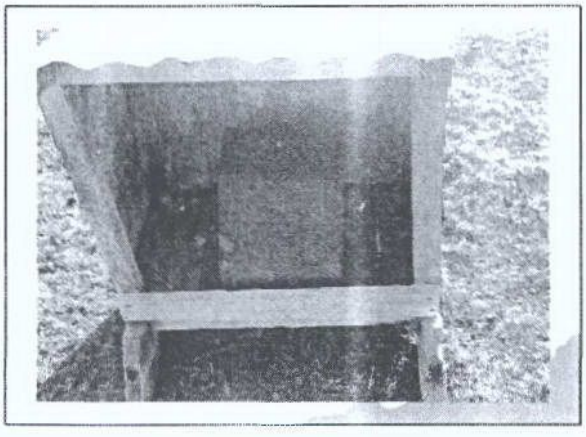


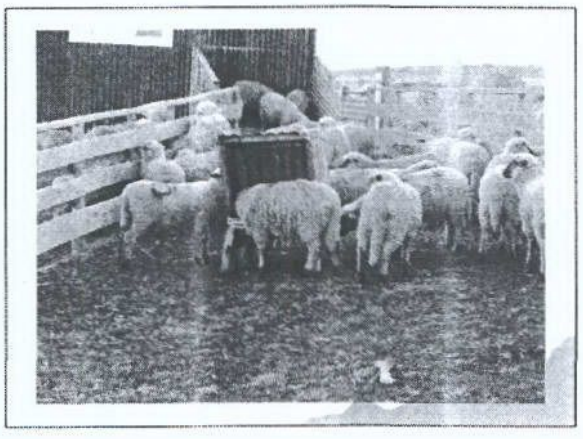












Grado de control de diferentes aislados de hongos nematófagos sobre 1000 larvas de nemàtodos

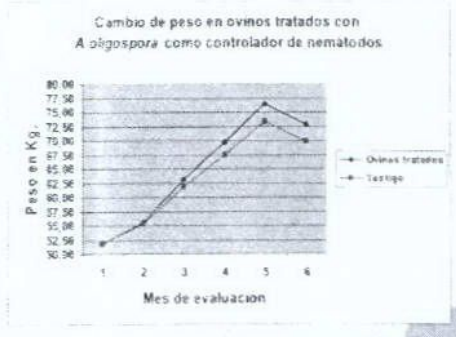
Aislados	Horas de evaluación	N° de nematodos vivos	Eficiencia %
A	48	0	100
B	48	5	99.5
C	48	132	86.8
	72	25	97.5
	96	2	99.8

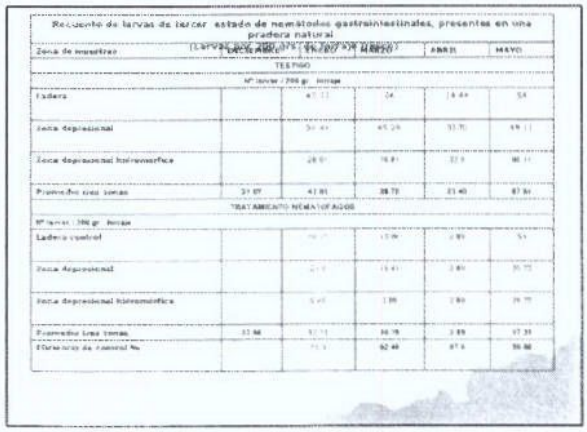
Administración de Biopreparado en base a *A. oligospora* a 15 ovinos en dosis de 10^{8} conidias por Kg. de p. v.

Peso animales	Animales tratados 51.08 ±3,1	Testigos 51.9±4,1
Avena grano	200 grs./ovino	200 grs./ovino
Sustrato deshidratado Por 8 semanas	17-22 grs./grupo/dia	0

Cambio de Peso (Kg.) en 15 ovinos tratados con *A. oligospora* en dosis de 2 gramos por animal. $2,5 * 10^{8}$ conidias por gramo de preparado.

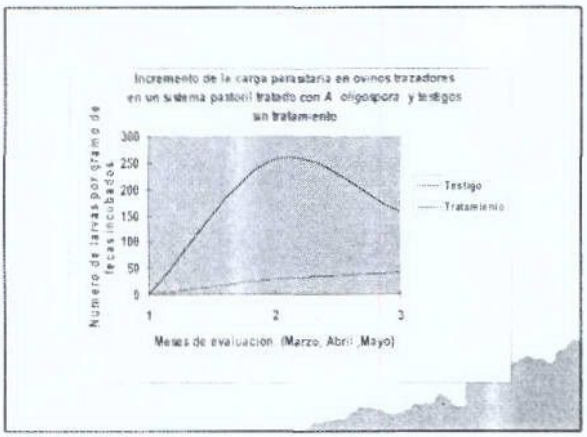
Tratamiento	DICIEMBRE	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL	MAYO
Ovinos tratados *A. Oligospora*	51.88±4.35	55.56±4.24	63.07±4.24	69.70±4.45	76.33±4.84	72.80±4.21
Grupo Testigos	51.87±3.46	55.13±3.52	61.66±3.86	67.43±4.23	73.20±4.66	69.80±4.83

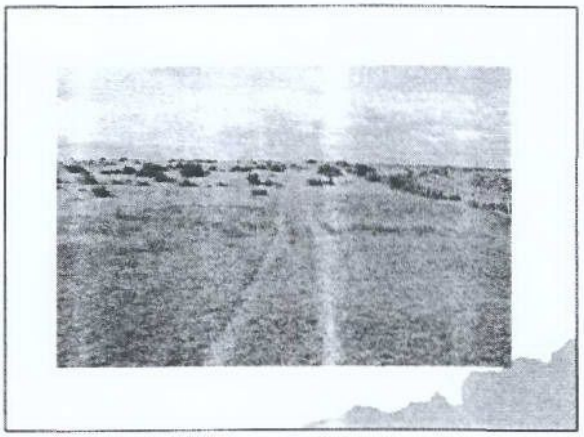




Evolución del numero de larvas infectivas en una pradera natural con ovinos tratados con *A. oligospora* como controlador.
Larvas L3 / 200 gr. de forraje fresco

	Diciembre	Enero	Marzo	Abril	Mayo
Testigo	31.67	42.85	28.72	23.43	67.61
Tratamiento	33.66	12.72	10.78	2.89	27.31


Incremento de la carga parasitaria en ovinos trazadores en un sistema pastoril tratado con A. oligospora y testigos sin tratamiento
Numero de larvas por gramo de heces incubadas
300
250
200
150
100
50
0
1
2
3
Testigo
Tratamiento
Meses de evaluacion (Marzo, Abril, Mayo)



"Aislamiento y evaluación de hongos nematófagos para el control de parásitos gastrointestinales en sistemas orgánicos de producción de carne ovina en Magallanes".

RAUL VERGARA V.
Medico Veterinario Msc. UMV

Hongos Nematófagos

Grupo de micro-hongos (Hyphomycetes) ubicuos, comúnmente encontrados en material vegetal en descomposición, fecas y suelo

HONGOS: ATRAPA-NEMATODOS
NEMATOFAGOS
PREDATORES

CARACTERISTICAS DE HONGOS NEMATOFAGOS

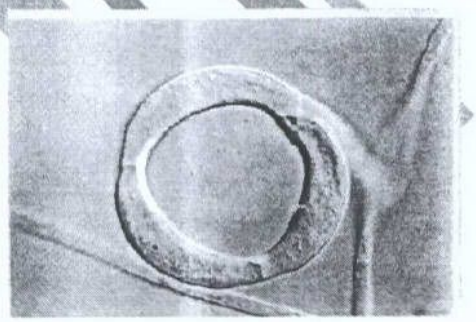
- Presentan crecimiento de hifas que se extienden en el suelo, alrededor del sustrato
- Desarrollan varios métodos de trampa basados en anillos contráctiles; hifas, prominencias o redes adhesivas
- Los órganos trampas pueden ser producidas continuamente o en respuesta a la presencia de nematodos

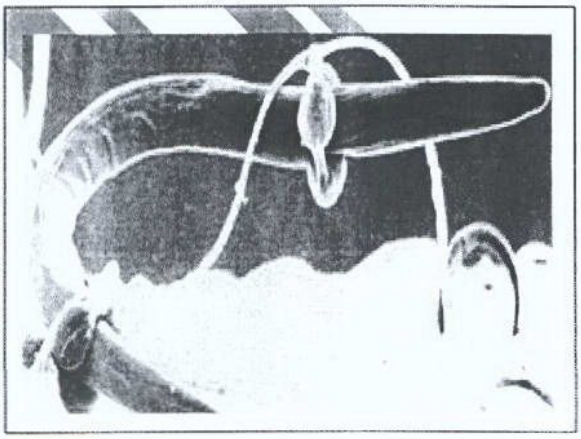
REDES ADHESIVAS

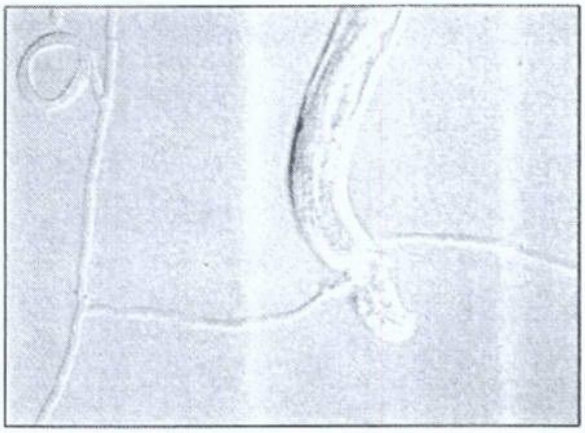
HIFAS ADHESIVAS

PROMINENCIAS ADHESIVAS

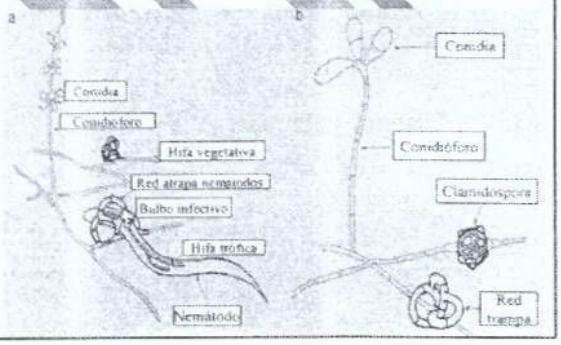
ANILLOS ADHESIVOS







HONGO ATRAPA NEMATODOS



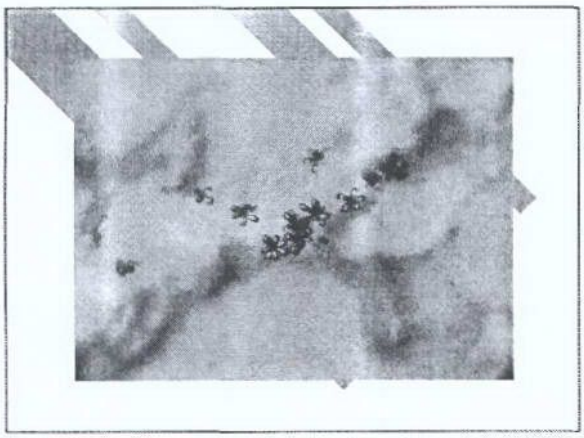
Hongos Nematófagos

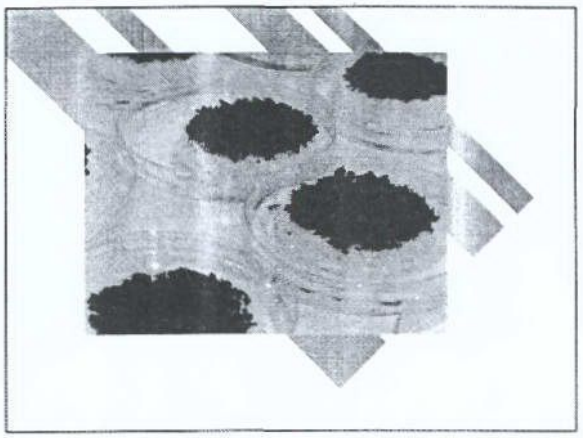
Duddingtonia flagrans, *Arthrobotrys oligospora*

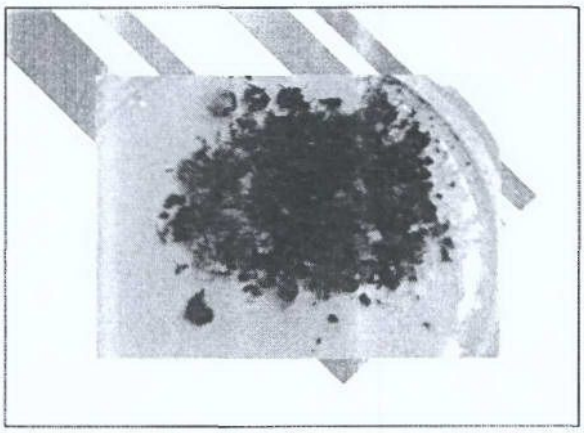
- Producen estructuras resistentes (clamidosporas) que le permiten sobrevivir el paso a través del tracto gastrointestinal (anaerobiosis, enzimas, temperatura)
- Reproducción en sustrato sólido

Hongo en sustrato sólido se mezcla con la dieta de los animales susceptibles al parasitismo:

Esporas en el alimento → atraviesa el tracto digestivo → el hongo cae junto con las fecas → germina, desarrolla estructuras trampa y reduce los estados infectivos







Resumen de parasitos y organos parasitados en ovinos y caprinos

Abomaso	Nematodos	*Haemonchus contortus* *Ostertagia circumcincta* *Ostertagia trifurcata*
Intestino delgado	Nematodos	*Toxocara vitulorum* *Cooperia spp.* *Trichostrongylus spp.* *Nematodirus spp.* *Strongyloides papillosus* *Capillaria spp.*
Ciego y colon	Nematodos	*Oesophagostomum spp.* *Chabertia ovina* *Trichuris ovis*

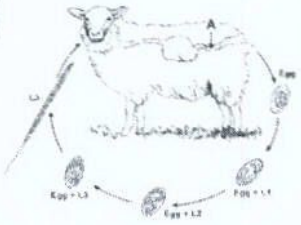
Terapéutica tradicional para parasitismo

- La terapeutica tradicional se ha basado en el control químico mediante el uso de antihelminticos.
- El desarrollo de estrategias de control de las helmintiasis abarca dos niveles:

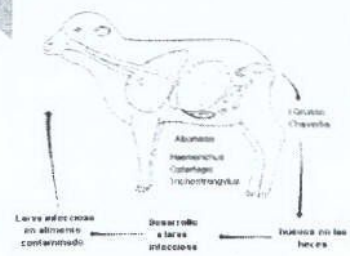
Terapéutica tradicional para parasitismo

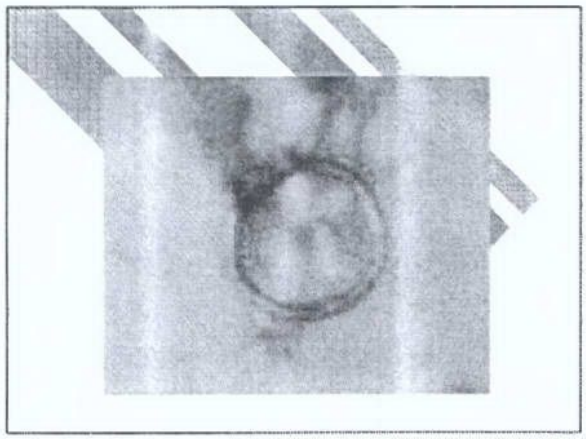
- *A nivel del hospedador:* mediante el empleo de antihelmínticos como vía para eliminar a los parásitos y de esta manera destruir la fuente de contaminación de los potreros
- *A nivel del medio ambiente:* para impedir el contacto entre las formas infestantes de los parásitos con los animales del rebaño.

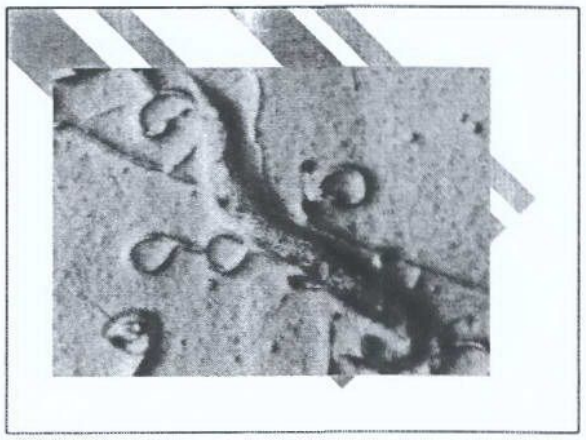
Nematodirus - Ciclo de vida

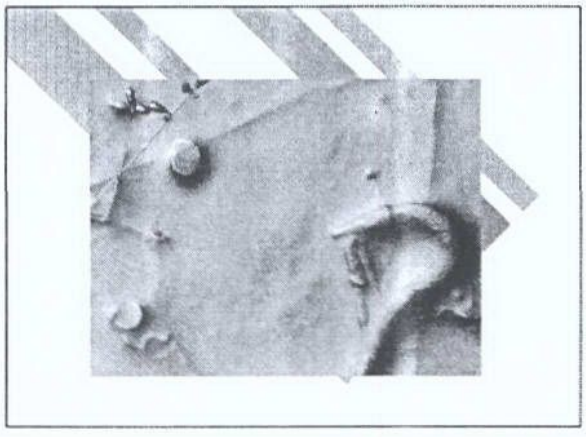


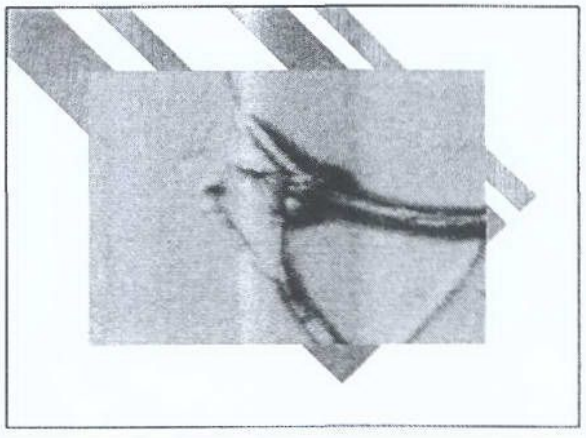
Parasitismo a pastoreo en ovinos

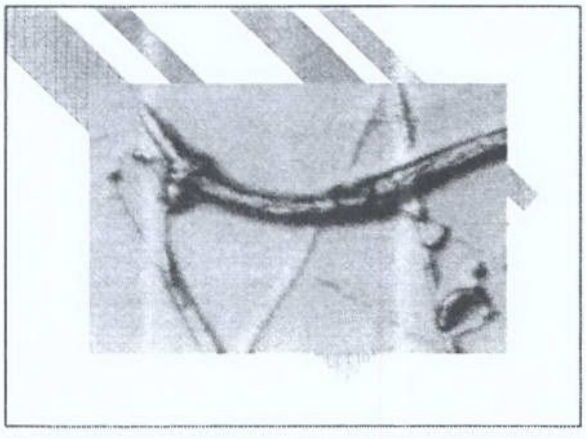


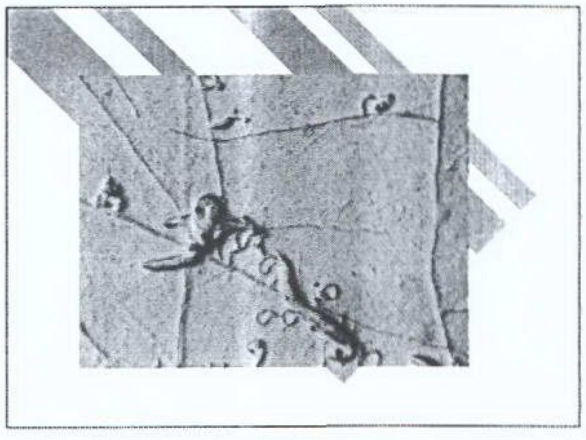


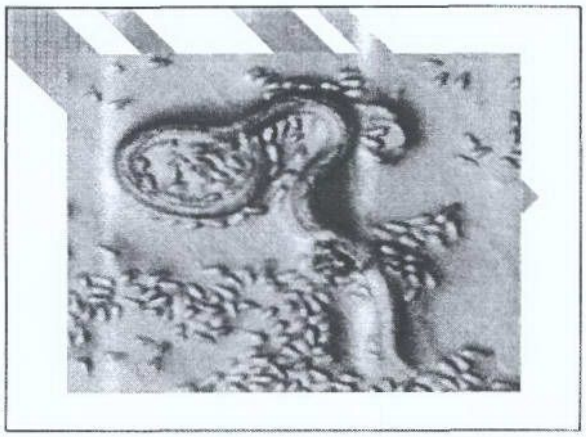


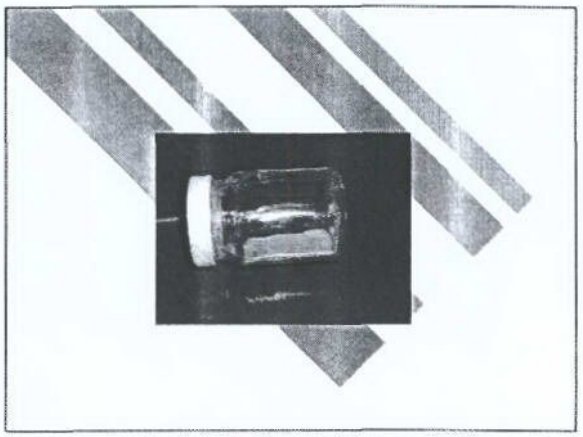


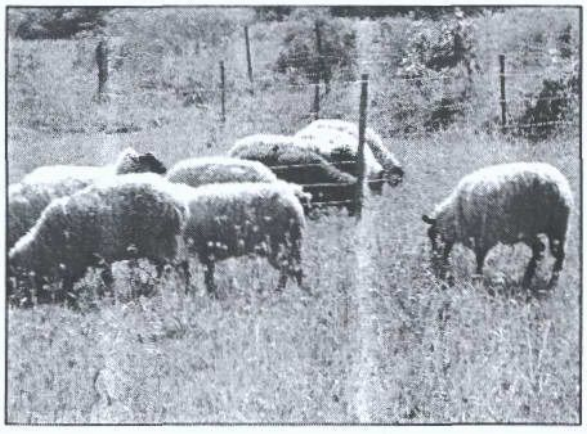


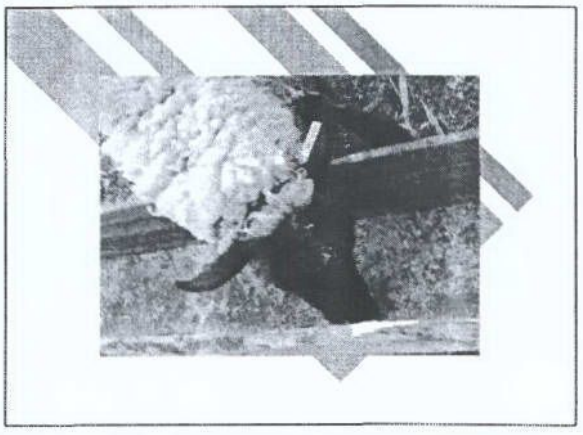


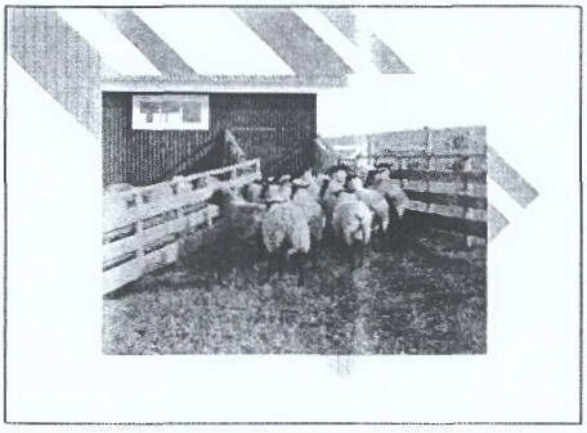


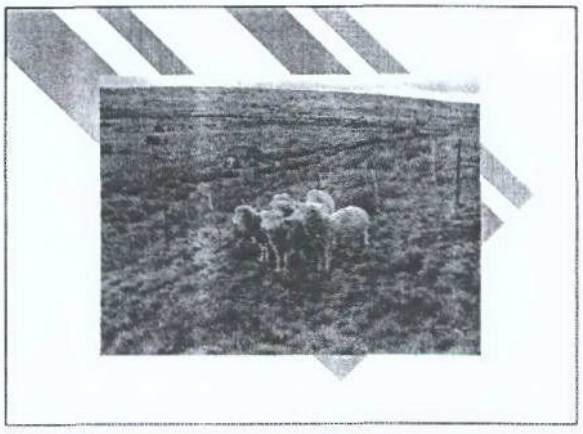


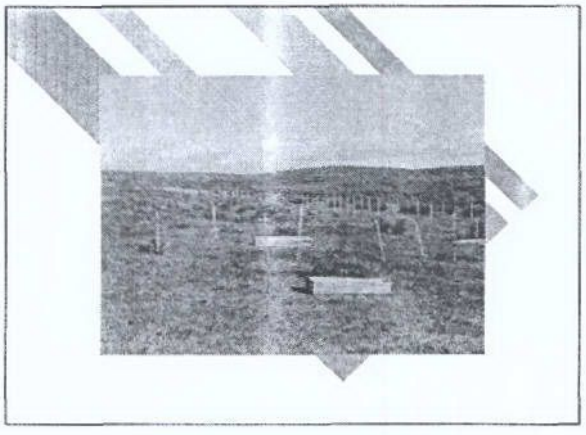


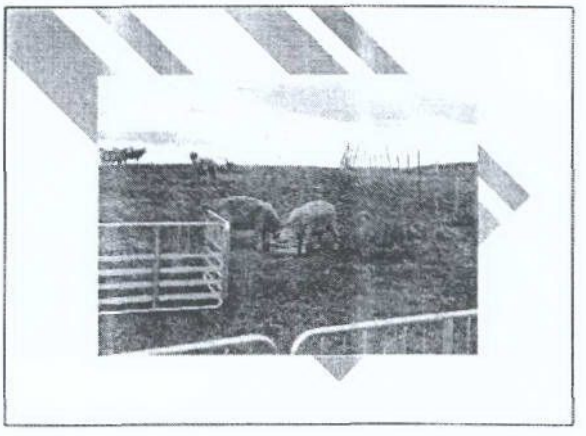












Grado de control de diferentes aislados de hongos nematófagos sobre 1000 larvas de nematodos

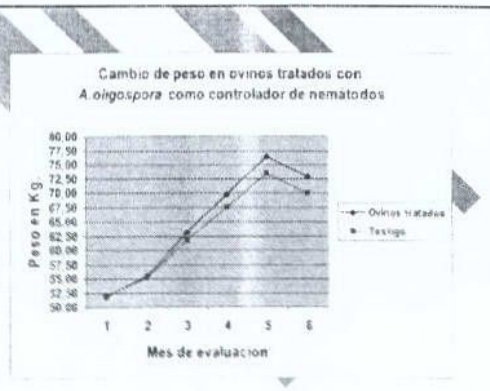
Aislados	Horas de evaluación	N° de nematodos vivos	Eficiencia %
A	48	0	100
B	48	5	99.5
C	48	132	86.8
	72	25	97.5
	96	2	99.8

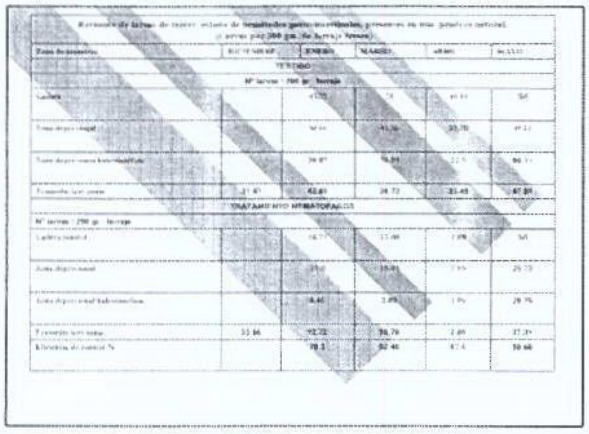
Administración de Biopreparado en base a *A. oligospora* a 15 ovinos en dosis de 10^8 conidias por Kg. de p. v.

Peso animales	Animales tratados 51.08 ±3.1	Testigos 51.9±4.1
Avena grano	200 grs./ovino	200 grs./ovino
Sustrato deshidratado Por 8 semanas	17-22 grs./grupo/día	0

Cambio de Peso (Kg.) en 15 ovinos tratados con *A. oligospora* en dosis de 2 gramos por animal.
$2,5 * 10^{3}$ conidias por gramo de preparado.

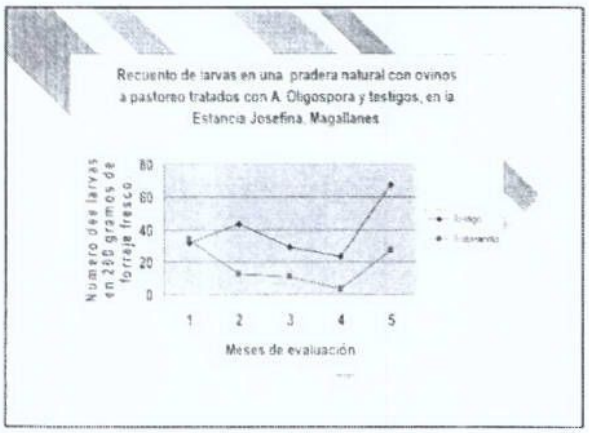
Tratamiento	DICIEMBRE	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL	MAYO
Ovinos tratados *A. Oligospora*	51,80±4,35	55,56±4,24	63,07±4,24	69,70±4,45	70,33±4,84	72,86±4,21
Grupo Testigos	51,87±3,48	55,13±3,82	61,66±3,86	67,43±4,23	73,20±4,65	69,80±4,85





Evolución del numero de larvas infectivas en una pradera natural con ovinos tratados con *A. oligospora* como controlador.
Larvas L3 / 200 gr. de forraje fresco

	Diciembre	Enero	Marzo	Abril	Mayo
Testigo	31,67	42,85	28,72	23,43	67,61
Tratamiento	33,66	12,72	10,78	2,89	27,31

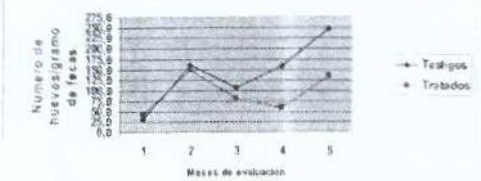


Presencia/ausencia del inoculo *de A. oligospora* en los animales bajo experimentación %.

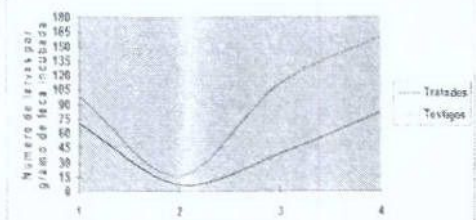
Mes de evaluación	Tratamiento	Testigo
Diciembre	84,6	23,07
Enero	93,33	13,33
Marzo	86,66	13,33
Abril	20	0
Mayo	0	0

Presencia de A. oligospora % en las fecas de dos grupos de 15 ovinos, tratados y testigos

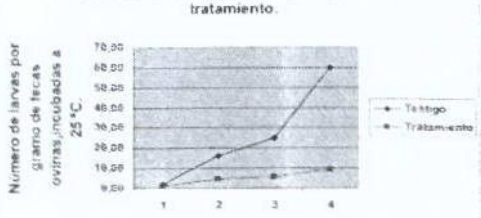
Huevos/gramo de fecas en ovinos tratados con *A. oligospora* como control biologico de parasitos gastrointestinales



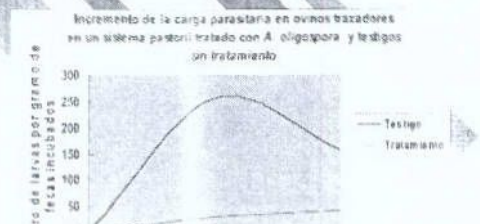
Larvas por gramo de fecas, incubadas a 25°C en ovinos tratados con *A.oligospora*



Incremento de la carga parasitaria en ovinos trazadores en un sistema pastoril, con ovinos tratados con A. oligospora y testigos sin tratamiento.



Incremento de la carga parasitaria en ovinos trazadores en un sistema pastoril tratado con *A. oligospora* y testigos sin tratamiento

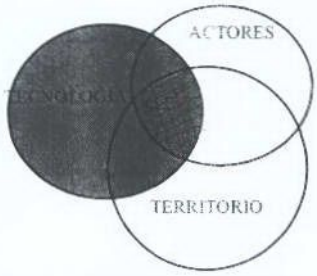


Ganadería Ecológica

CET

OCTUBRE-2003

GANADERIA ECOLOGICA.



- **Objetivos Del Desarrollo Y Difusión De Los Procesos De Producción Ganadera Ecológica En El Ámbito Mundial.**
  - Producir alimentos de **alta calidad sanitaria, nutritiva y organoleptica**
  - Manejar de manera **integrada** los agroecosistemas.
  - Mantener la **diversidad genética animal y** del ecosistema, protegiendo y desarrollando los hábitat naturales
  - Entregar a los animales **condiciones vitales** para desarrollar su comportamiento innato.
  - **Evitar todas las formas de contaminación** que puedan resultar de las técnicas agropecuarias.
  - Crear una relación sinergica entre **el productor y el consumidor**, que desencadenen efectos favorables en el plano ecológico y social.
  - **Conservar la salud publica y el medio ambiente.** en un marco de viabilidad economica de los sistemas

Beneficios Esperados Sistema de Ganaderia Ecológica.

Calidad: Obtención de un producto que cumpla con una serie de exigencias de calidad, que tienen relación con el proceso de producción y de transformación de los mismos

Producción: Lograr niveles de producción, como mínimo, equivalentes a los actualmente obtenidos bajo un sistema tradicional

Exportaciones: Destino principal los mercados externos.

Aumento en el Valor Agregado: Integración hacia delante, comercializando el producto final, con un aumento en el valor agregado

Impacto Ambiental: Utilización productiva de las especies y ecosistemas según su potencial productivo, para lo cual vincula las normas y procedimientos tecnológicos a dicho potencial (la tecnología es función del sitio ecológico)

Bases para el manejo que permiten el desarrollo de los sistemas de ganadería ecológica:

Vázquez (1999)

Establecimiento de sistemas de manejo en función del potencial de los ecosistemas y de la población animal en que los animales logren expresar su capacidad genética y conducta libremente

Los animales se alimentarán principalmente con recursos locales, pudiendo el pastoreo directo de praderas orgánicas en sus diversas formas, en sistemas en rotación hasta por el manejo del pastizal como para interrumpir los ciclos biológicos de diversos parasitos y patógenos

La salud animal se mantendrá en base a métodos sanitarios preventivos. Si hay riesgo de sobrevivencia de un animal se utilizarán productos farmacológicos, pero esos animales deben retirarse de la comercialización como producto ecológico

Control y registro confiables del proceso productivo ecológico. Certificación de la calidad del producto final y del proceso productivo

Normativa O Marco Legal Específico Que Define El Funcionamiento De La Ganadería Ecológica. (Matta 1999).

- **Los sistemas ganaderos ecológicos serán principalmente extensivos o semiextensivos. (nunca intensivos, no pueden cumplir con lo basico de la GE)**
- **Los alojamientos o refugios deben estar construidos de materiales no tóxicos y deben ser amplios ventilados e iluminados, con un área de reposo provista de camas y adecuados para manejar el ganado evitando el estres que contribuya a romper el equilibrio sanitario en que se encuentran los animales.**
- **Los alimentos que consuma el ganado deben obtenerse por procedimientos ecológicos. Si se compran alimentos fuera de la propiedad estos deben estar certificados.**

Periodo de Transición para el Establecimiento de un Manejo Ganadero Ecológico

- Transición: tendrá una duración variable dependiendo del estado inicial del sistema que se convierte.
- El aspecto de mayor peso en la transición es la conversión del suelo o de las praderas y pasturas.
- Estiércol aplicable no debe superar un aporte de 170 kilogramos de N por ha /año. O cargas animales que superen ese aporte de N por ha.
- Los ovinos deben tener un tiempo mínimo de conversión de 6 meses.
- Una vez realizado el proceso de transición del sistema agrícola hay un mínimo de tiempo que el ganado debe cumplir para considerarse ecológico son los siguientes:
- Bovinos de leche 90 días
- Bovinos de carne 60 días
- Los cerdos deben cumplir con la normativa ecológica desde los 35 días de su nacimiento; las aves de puesta deben estarlo desde los 30 días de su nacimiento; y los corderos cabritos, conejos y pollos, deben cumplir las normas desde su nacimiento.
- No se permitirá la cría convencional y ecológica de la misma especie por el mismo productor.

Tabla 1. Producción agropecuaria orgánica en América Latina

País	Superficie orgánica sobre el área agrícola total - porcentaje	Puesto mundial - porcentaje orgánico	Superficie orgánica (ha)	Puesto mundial - superficie orgánica
Uruguay	4.?	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Costa Rica	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Argentina	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Chile	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Belice	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Ecuador	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Rep. Dominicana	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Guatemala	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
El Salvador	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Surinam	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Perú	[illegible]	46	[illegible]	[illegible]
Paraguay	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Panamá	[illegible]	48	[illegible]	[illegible]
Colombia	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
México	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Cuba	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Nicaragua	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Brasil	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Honduras	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Bolivia	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Jamaica	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Guyana	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

E. Gudynas 2003 CLAES

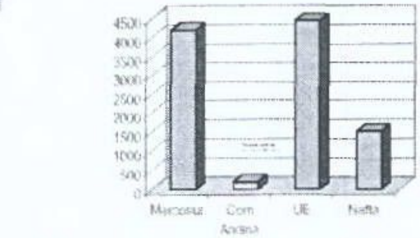


Figura 1. Superficies totales orgánicas de los grandes bloques comerciales

Em miles de has. MERCOSUR incluye únicamente los miembros plenos. UE de los 15

E. Gudynas 2003 CLAES

Profilaxis y Cuidados Veterinarios en un Sistema de Ganadería Orgánica

- Vacunas:
- Se utilizarán las que la autoridad sanitaria establezca como obligatorias y las que autorice el organismo de control.

- Medicamentos:
- Están prohibidos los fármacos de síntesis a los que podrá recurrirse cuando fracasen todas las otras medidas que utiliza la producción ecológica.

- Antiparasitarios.

  Se utilizarán antiparasitarios solo cuando las normas de manejo sean sobrepasadas y se aplicaran fuera de las etapas de lactación e inicio de la gestación.

Productos AUTORIZADOS PARA LA LIMPIEZA Y DESINFECCION DE LOCALES E INSTALACIONES.

- Jabón de potasa y sosa, agua y vapor, Lechada de cal, Cal, Cal viva, Hipoclorito de sodio., Soda caustica, Potasa cáustica, Peróxido de hidrógeno, Esencias naturales de plantas.
- Acido cítrico, Ac. paracético, Ac. fórmico, Ac láctico, Ac. Oxálico, y Acético, Alcohol, Acido Nítrico, Acido fosfórico, Formaldehido
- Productos de la desinfección de los pezones y de las instalaciones de ordeño.
- Carbonato de sodio.
- También está permitido el uso de compuestos cúpricos para el uso en pediluvios.

Restricciones de la Normativa Europea para la Alimentación Animal en un Sistema de Ganadería Ecológica.

- Está permitido que hasta un 30% de los componentes de la formula de los concentrados se origine fuera del sistema de producción y se podrá aumentar hasta un 60 % cuando provenga de la misma explotación.
- Esta permitido el uso de un máximo de 10 % de la materia seca que los rumiantes puedan consumir, provenga de otros orígenes que no sean ecológicas, con excepción de alimentos modificados genéticamente. Siendo el 10 % el máximo anual, este puede llegar a ser de un 25% al día sin superar el monto anual.
- Los sistemas de cría utilizarán un 60% de la materia seca consumir constituida por forrajes frescos, ensilados o desecados. Solo en el caso de la producción lechera este porcentaje se podrá reducir a un 50%.(CEE 2000).
- No está permitido el uso de sustitutos de leche. Las vitaminas inyectables solo se podrán utilizar en ausencia de vitaminas naturales. El uso de minerales se podrá realizar con las fuentes que están autorizadas por las diversas normativas. En ningún caso se podrán utilizar hormonas, promotores de crecimiento, antibióticos, colorantes o urea en el alimento.

Materias Primas De Origen Mineral Permitidas En La Agricultura Ecológica.

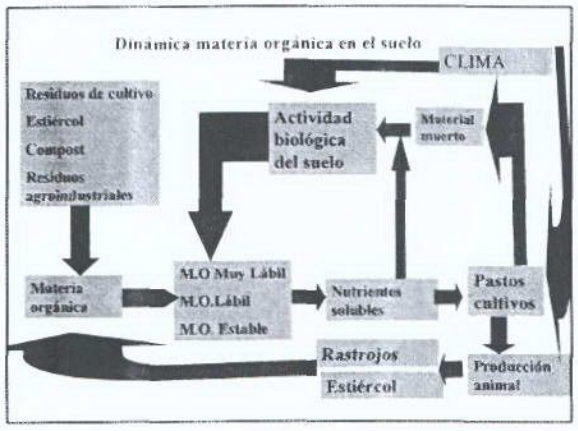
- Sodio:Sal marina sin refinar, sal gema bruta de mina, sulfato de sodio, Carbonato de sodio, Bicarbonato de sodio.
- Calcio: Conchas de animales acuáticos, carbonato de calcio, lactato de calcio, gluconato de calcio.
- Fosforo: Fosfatos bicalcicos, precipitados de huesos, fosfato bicalcico defluorado, fosfato monocálcico desfluorado.
- Magnesio:Magnesio anhidro, sulfato de magnesio, cloruro de magnesio, carbonato de magnesio.
- Azufre: Sulfato de sosa
- Aditivos para la alimentacion
- Hierro:Carbonato Ferroso, Sulfato ferroso, oxido ferrico.
- Yodo:Yodato de calcio anhidro, yodato de calcio hexahidratado, yoduro de potasio.
- Cobalto: Sulfato de cobalto, monohoidrato o sulfato de cobalto heptahidratado, carbonato basico de cobalto monohidrato.
- Cobre: Oxido cuprico, carbonato de cobre basico, monohidratado; sulfato de cobre pentahidratado.
- Manganeso: Carbonato manganoso, oxido manganoso, mono y/o tetrahidratado.
- Zinc: Carbonato de zinc, sulfato de zinc mono y/o heptahidratado,
- Molibdeno:Molibdato de amonio, molibdato de sodio.
- Selenio: Selenato de sodio, selenito de sodio.

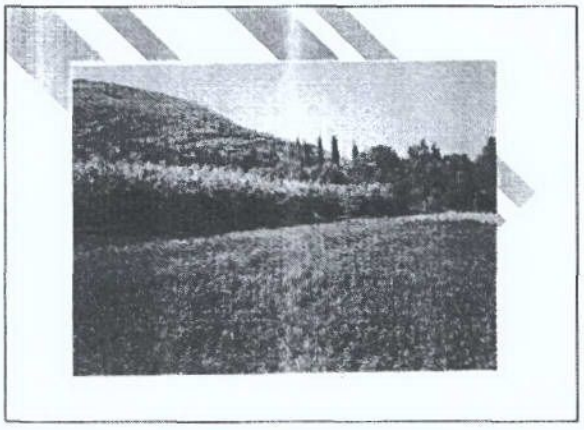
Bases para el diseño de sistemas orgánicos de producción

- Diversificación espacio temporal.
- Integración de agricultura y ganadería.
- Reciclaje de residuos agropecuarios y agroindustriales.
- Diseño y optimización del uso del espacio agrícola y natural.

Integración de agricultura y ganadería

- Diseño de sistema de rotación-praderas cultivos.
- Generación de ciclo de carga y descarga de nutrientes.
- Aceleración de ciclos de nutrientes.
- Ruptura de ciclos biológicos.
- Estabilización y flexibilización de ingresos.



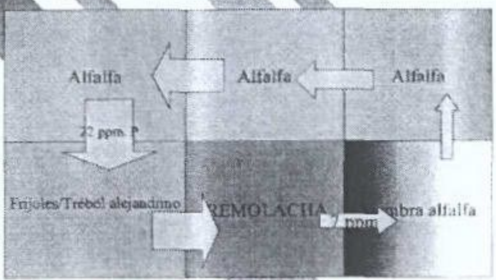


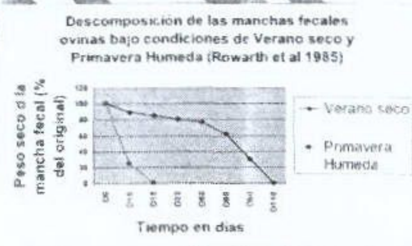
Pastoreo

Valores críticos requeridos de la altura del pastizal para mantener los niveles de ingesta de herbáceas y el rendimiento animal cercano al máximo. (Adaptado de Hodgson 1994)

	Altura pradera en cms.
Consumo continuo	
Ovejas hembras y corderos	
Primavera	4-5
Verano	7-8
Vacas y terneras en engorde	9-10
Terneras destetadas	9-10
Vacas lecheras	9-10
Consumo alternado	
Ovejas y corderos	6-7
Vacas y terneras	9-10
Terneras destetadas	11-12
Vacas lecheras	9-10

Diseño de sistema para producción orgánica de remolacha



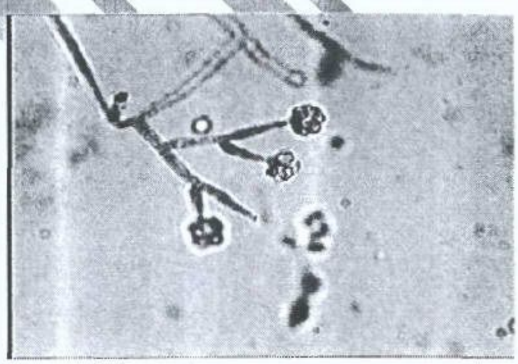


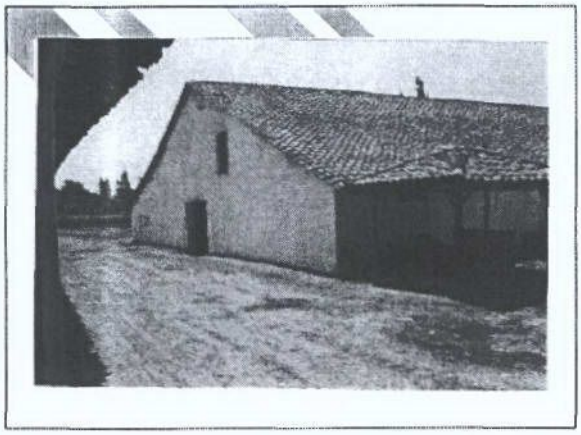
Cantidad de nutrientes (tasa de aplicación/ha) en las manchas fecales de bovinos y ovinos, y producción fecal anual por animal (Haynes Y Williams 1993)

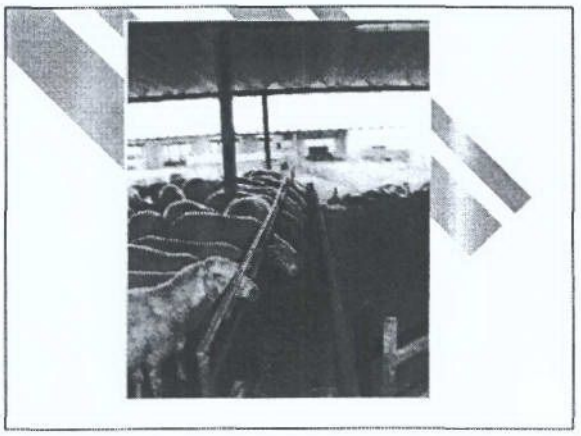
Parametro	Concentracion tipica %	Tasa de aplicacion en la mancha fecal Kg/ha Ovinos	Tasa de aplicación en la mancha fecal Kg/ha Bovinos	Salida anual Kg/animal/año	Salida anual Desde animales Kg/Ha (2.5 UA/ha)
Materia organica	80	4000	32000	499	1248
N	2.6	130	1040	23	57
P	0.70	35	280	6.1	15
S	0.25	13	100	2.1	5.3
K	1.0	50	400	8.8	22
Ca	2.0	100	800	17	43
Mg	0.66	33	264	5.8	15

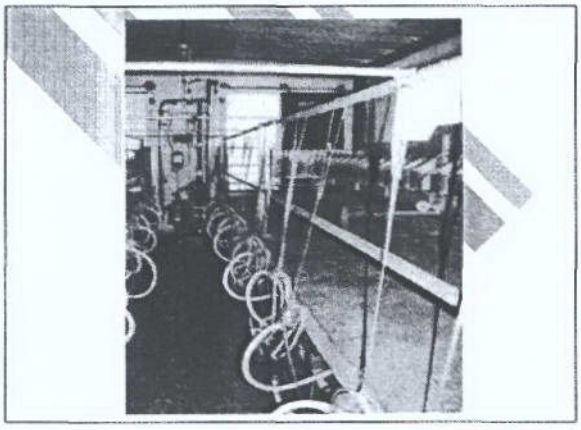
Composición compost agroindustriales

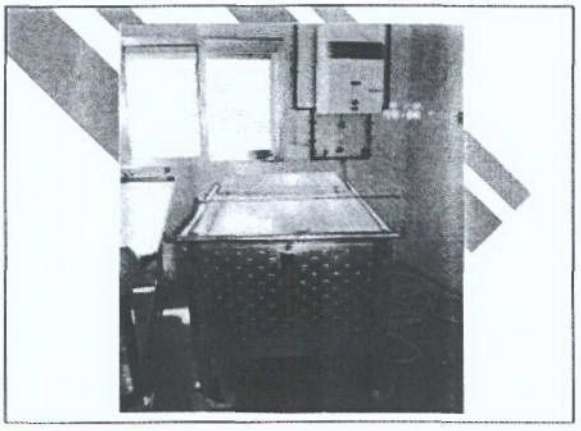
NUTRIENTE	EXPRESION	COMPOST CAMA ANIMAL	RESIDUO FORESTAL-FERIA	RESIDUOS FORESTAL-FERIA
pH		8.15	7.65	7.92
C eléctrica	Mmhos/cm	1.43	1.43	1.34
M orgánica	%	30.26	46.99	36.42
N total	%	1.41	1.65	1.53
P total	%	0.29	0.27	0.27
P2O5 total	%	0.66	0.62	0.62
K total	%	0.940	0.800	0.810
K2O total	%	1.13	0.96	0.98
C total	%	17.59	23.82	21.89
C/N		12.48	14.44	13.84
Materia seca	%	83.38	84.12	84.90
Humedad	%	16.63	15.88	15.10
N disponible	Ppm	172.70	242.79	158.71
P disponible	Ppm	366.92	371.23	342.38
K disponible	Ppm	9338.0	8678.00	7808.00

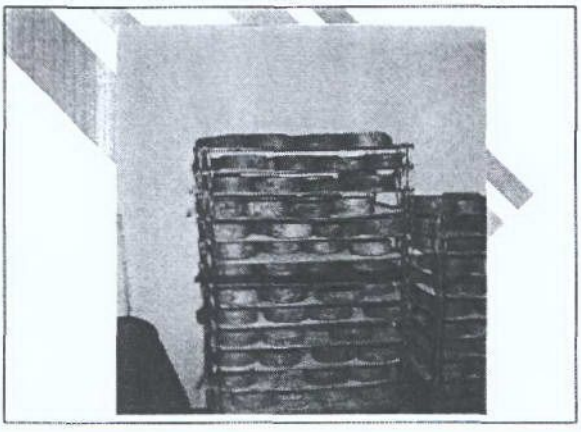


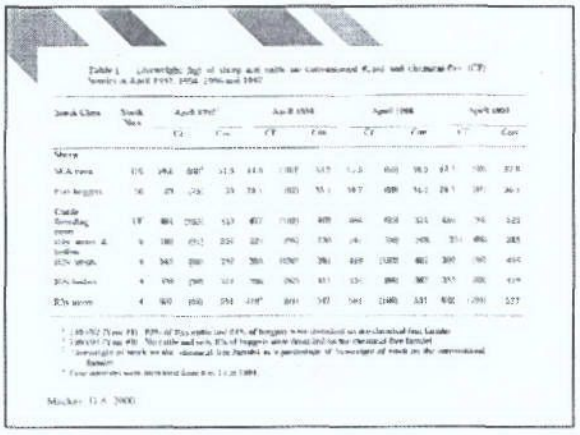












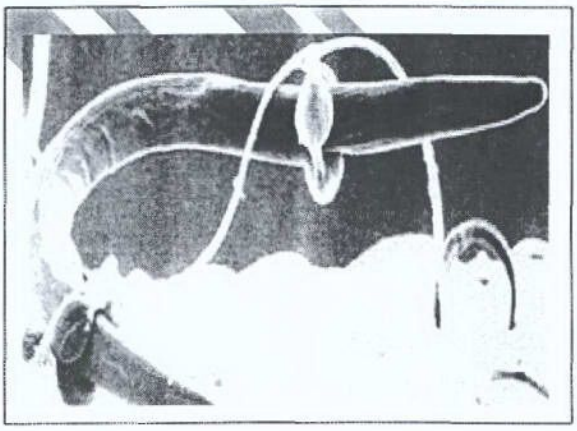
Demanda Europea de productos orgánicos

	Tamaño del mercado Orgánico-2000	Mercado pecuario 2002
Mercado Europeo	11,7 Bill US$	1,42 bill US$

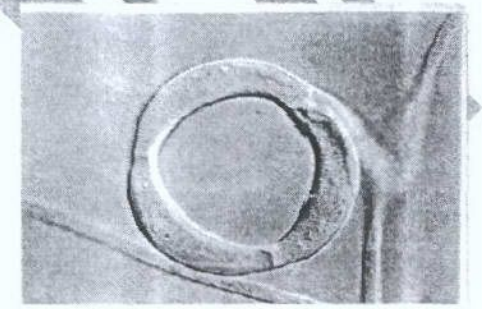
AGENTES DE CONTROL BIOLOGICO

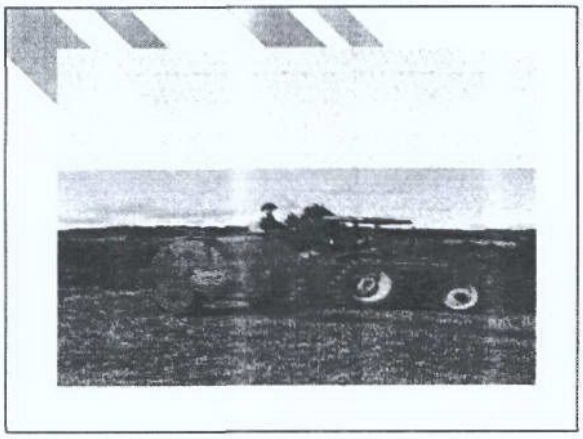
Grupo de micro-hongos (Hyphomycetes) ubicuos, comúnmente encontrados en material vegetal en descomposición, fecas y suelo

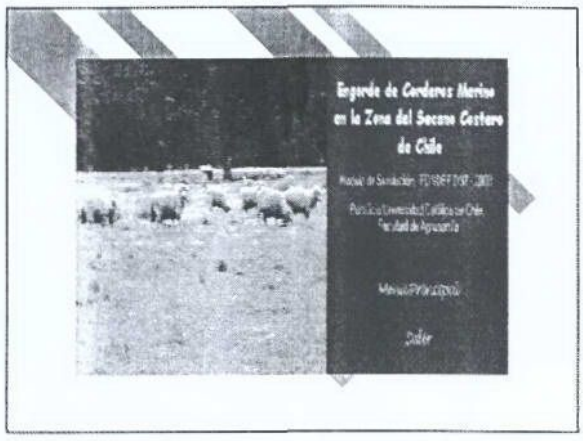
HONGOS: ATRAPA-NEMATODOS
NEMATOFAGOS
PREDATORES

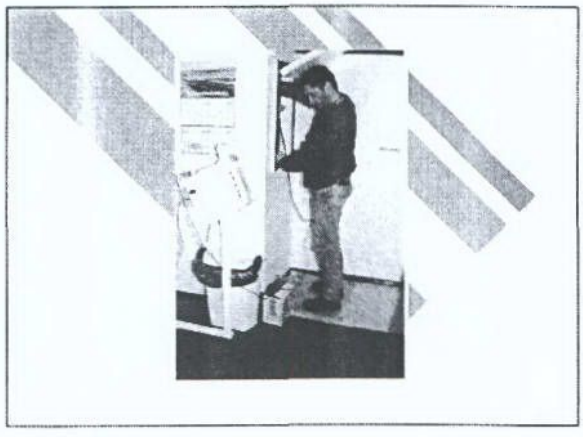


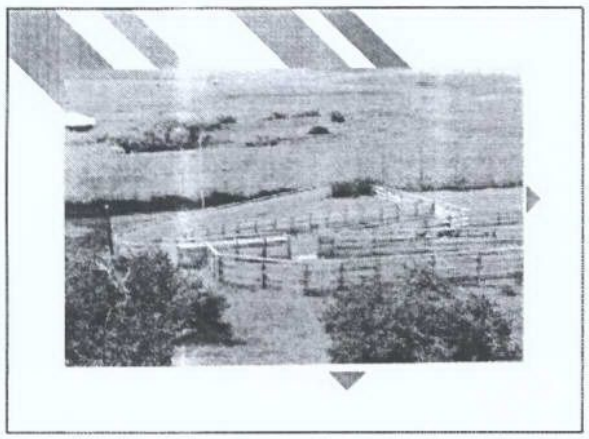
ANILLOS ADHESIVOS

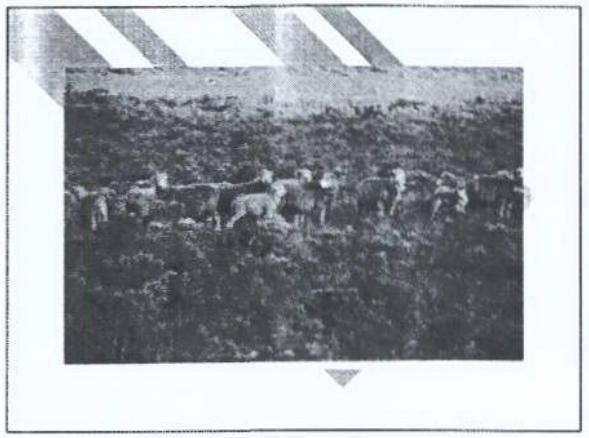


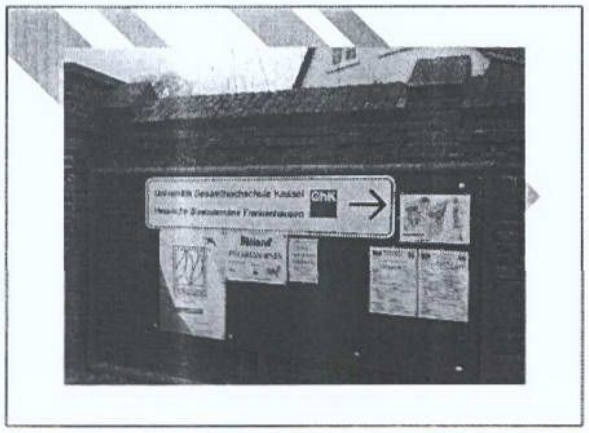


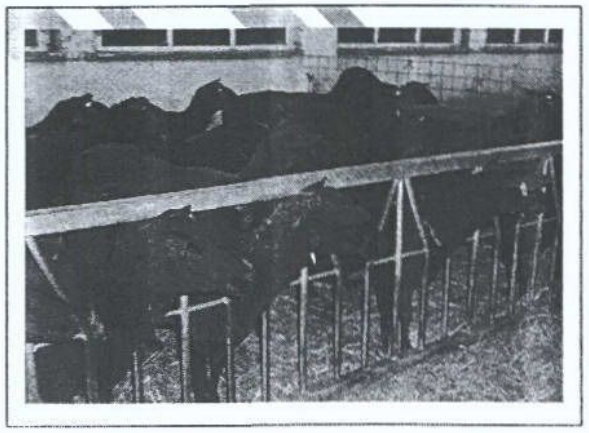

Engorde de Corderos Merino
en la Zona del Secano Costero
de Chile







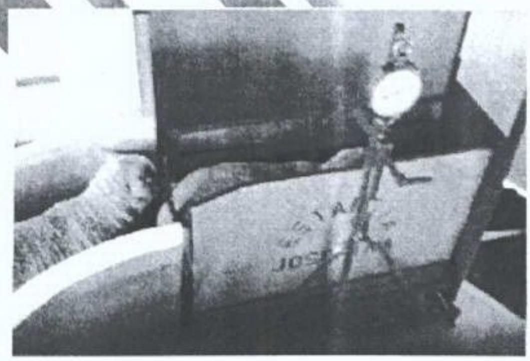

Universität Gesamthochschule Kassel
GhK

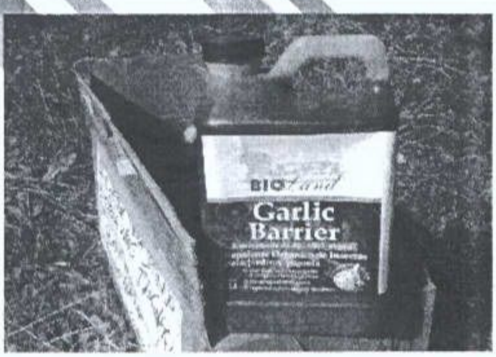


GRUPO	TRATAMIENTO	DOSIS ml/kg	VIA	NUMERO DE ANIMALES
1	ACIDO GARLICO	0.5	ORAL	15
2	ACIDO GARLICO	1.0	ORAL	15
3	ACIDO GARLICO	2.0	ORAL	15
4	NINGUNO (CONTROL)	-	-	15

Evaluación del cambio de peso en cuatro grupos de corderos suplementados con sales minerales, tratados con tres niveles de Garlic barrier® como Vermífugo, y pastoreando una pradera bajo manejo orgánico.

Tratamientos (Un testigo absoluto y un grupo sin aplicación de Garlic barrier ®)	Peso al destete Kg (28/9/02)	Peso finalizando Kg (22/09/02)	Diferencia de peso por animal Kg
Testigo manejo convencional	31	31.91	1.9
Sales minerales sin ácido gárlico	35.64	35.66	2.[illegible]
Sales minerales +0.5cc de ácido gárlico por k de peso	33.2[illegible]	36.7	3.[illegible]
Sales minerales 1.0 cc de ácido gárlico por k de peso	32.6	34.8	2.2
Sales minerales 2.0 cc de ácido gárlico por k de peso	30.8	35.[illegible]	3.5

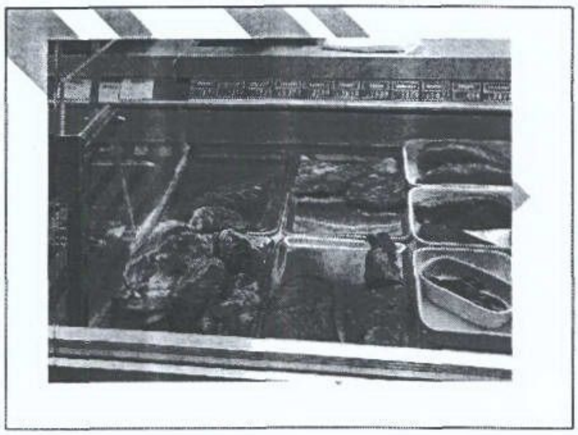


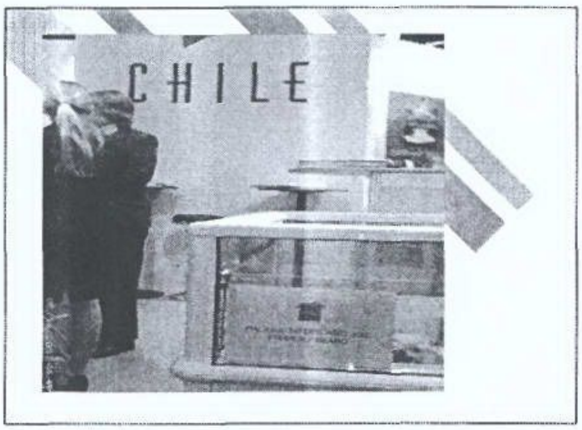


GRUPO	TRATAMIENTO	DOSIS ml/kg	VIA	NUMERO DE ANIMALES
1	ACIDO GARLICO	0.5	ORAL	15
2	ACIDO GARLICO	1.0	ORAL	15
3	ACIDO GARLICO	2.0	ORAL	15
4	NINGUNO (CONTROL)	-	-	15

Evaluación del cambio de peso en cuatro grupos de corderos suplementados con sales minerales, tratados con tres niveles de Garlic barrier® como Vermífugo y pastoreando una pradera bajo manejo orgánico

Tratamientos (Un testigo absoluto y un grupo sin aplicación de Garlic barrier ®)	Peso al destete Kg. (28/10/02)	Peso terminación Kg. (22/12/02)	Diferencia de peso por animal Kg.
Testigo manejo convencional	21	22.90	1.9
Sales minerales sin ácido gárlico	33.64	35.86	2.2
Sales minerales +0.5 c.c. de ácido gárlico por k de peso	31.71	33.7	1.9
Sales minerales 1.0 c.c. de ácido gárlico por k de peso	32.6	34.8	2.2
Sales minerales 2.0 c.c. de ácido gárlico por k de peso	30.8	33.1	2.9



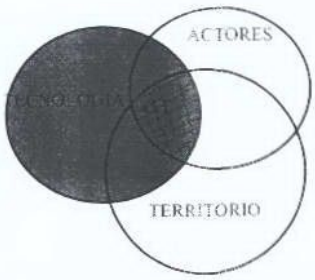


Ganadería Ecológica

CET

JULIO 2003

GANADERIA ECOLOGICA.



Objetivos Del Desarrollo Y Difusión De Los Procesos De Producción Ganadera Ecológica En El Ámbito Mundial.

- Producir alimentos de **alta calidad sanitaria, nutritiva y organoléptica**
- Manejar de manera **integrada** los agroecosistemas.
- Mantener la **diversidad genetica animal y** del ecosistema, protegiendo y desarrollando los habitat naturales
- Entregar a los animales **condiciones vitales** para desarrollar su comportamiento innato.
- **Evitar todas las formas de contaminacion** que puedan resultar de las tecnicas agropecuarias.
- Crear una relacion sinergica entre **el productor y el consumidor**, que desencadenen efectos favorables en el plano ecológico y social
- **Conservar la salud publica y el medio ambiente**, en un marco de viabilidad economica de los sistemas.

Beneficios Esperados Sistema de Ganadería Ecológica.

Calidad: Obtención de un producto que cumpla con una serie de exigencias de calidad, que tienen relación con el proceso de producción y de transformacion de los mismos.

Producción: Lograr niveles de producción, como mínimo, equivalentes a los actualmente obtenidos bajo un sistema tradicional

Exportaciones: Destino principal los mercados externos,

Aumento en el Valor Agregado: Integración hacia delante, comercializando el producto final, con un aumento en el valor agregado.

Impacto Ambiental: Utilización productiva de las especies y ecosistemas segun su potencial productivo, para lo cual vincula las normas y procedimientos tecnológicos a dicho potencial (la tecnología es función del sitio ecológico)

Bases para el manejo que permiten el desarrollo de los sistemas de ganadería ecológica. Venegas (1996).

Establecimiento de sistemas de manejo en función del potencial de los ecosistemas y de la población animal, en que los animales logren expresar su capacidad genética y conducta libremente.

Los animales se abastecerán principalmente con recursos locales, utilizando el pastoreo directo de praderas orgánicas en sus diversas formas, en sistemas en rotación tanto por el manejo del pastizal como para interrumpir los ciclos biológicos de diversos parasitos y patógenos.

La salud animal se mantendrá en base a medidas sanitarias preventivas. Si hay riesgo de sobrevivencia de un animal se utilizarán productos farmacológicos, pero esos animales deben retirarse de la comercialización como producto ecológico.

Control y registro cuidadoso del proceso productivo ecológico. Certificación de la calidad del producto final y del proceso productivo.

Normativa O Marco Legal Especifico Que Define El Funcionamiento De La Ganadería Ecológica. (Matta 1999).

- Los sistemas ganaderos ecológicos seran principalmente extensivos o semiextensivos. (nunca intensivos, no pueden cumplir con lo basico de la GE)
- Los alojamientos o refugios deben estar construidos de materiales no toxicos y deben ser amplios ventilados e iluminados, con un área de reposo provista de camas y adecuados para manejar el ganado evitando el estres que contribuya a romper el equilibrio sanitario en que se encuentran los animales.
- Los alimentos que consuma el ganado deben obtenerse por procedimientos ecologicos. Si se compran alimentos fuera de la propiedad estos deben estar certificados.

Periodo de Transición para el Establecimiento de un Manejo Ganadero Ecológico

- Transicion: tendrá una duración variable dependiendo del estado inicial del sistema que se convierte.
- El aspecto de mayor peso en la transición es la conversión del suelo o de las praderas y pasturas.
- Estiercol aplicable no debe superar un aporte de 170 kilogramos de N por ha /año. O cargas animales que superen ese aporte de N por ha.
- Los ovinos deben tener un tiempo mínimo de conversión de 6 meses.
- Una vez realizado el proceso de transicion del sistema agricola hay un mínimo de tiempo que el ganado debe cumplir para considerarse ecológico son los siguientes:
- Bovinos de leche 90 días
- Bovinos de carne 60 días
- Los cerdos deben cumplir con la normativa ecológica desde los 35 días de su nacimiento; las aves de puesta deben estarlo desde los 30 días de su nacimiento; y los corderos cabritos, conejos y pollos, deben cumplir las normas desde su nacimiento.
- No se permitirá la cria convencional y ecológica de la misma especie por el mismo productor.

Profilaxis y Cuidados Veterinarios en un Sistema de Ganadería Orgánica

- Vacunas:
- Se utilizarán las que la autoridad sanitaria establezca como obligatorias y las que autorice el organismo de control.
- Medicamentos:
- Están prohibidos los farmacos de síntesis a los que podrá recurrirse cuando fracasen todas las otras medidas que utiliza la producción ecológica.
- Antiparasitarios.

Se utilizarán antiparasitarios solo cuando las normas de manejo sean sobrepasadas y se aplicaran fuera de las etapas de lactación e inicio de la gestación.

Productos AUTORIZADOS PARA LA LIMPIEZA Y DESINFECCION DE LOCALES E INSTALACIONES.

- Jabon de potasa y sosa, agua y vapor, Lechada de cal, Cal, Cal viva, Hipoclorito de sodio., Soda cáustica, Potasa cáustica, Peróxido de hidrogeno, Esencias naturales de plantas.
- Acido citrico, Ac. paracetico, Ac. fórmico, Ac láctico, Ac. Oxálico, y Acetico, Alcohol, Acido Nitrico, Acido fosforico, Formaldehido
- Productos de la desinfección de los pezones y de las instalaciones de ordeño.
- Carbonato de sodio.
- También está permitido el uso de compuestos cúpricos para el uso en pediluvios.

Restricciones de la Normativa Europea para la Alimentación Animal en un Sistema de Ganaderia Ecologica.

- Esta permitido que hasta un 30% de los componentes de la formula de los concentrados se origine fuera del sistema de produccion y se podrá aumentar hasta un 60 % cuando provenga de la misma explotación.
- Esta permitido el uso de un máximo de 10 % de la materia seca que los rumiantes puedan consumir, provenga de otros origenes que no sean ecológicas, con excepción de alimentos modificados geneticamente. Siendo el 10 % el máximo anual, este puede llegar a ser de un 25% al dia sin superar el monto anual.
- Los sistemas de cria utilizarán un 60% de la materia seca consumir constituida por forrajes frescos, ensilados o desecados. Solo en el caso de la producción lechera este porcentaje se podrá reducir a un 50%.(CEE 2000).
- No está permitido el uso de sustitutos de leche. Las vitaminas inyectables solo se podrán utilizar en ausencia de vitaminas naturales. El uso de minerales se podra realizar con las fuentes que están autorizadas por las diversas normativas. En ningún caso se podrán utilizar hormonas, promotores de crecimiento, antibióticos, colorantes o urea en el alimento.

Materias Primas De Origen Mineral Permitidas En La Agricultura Ecológica.

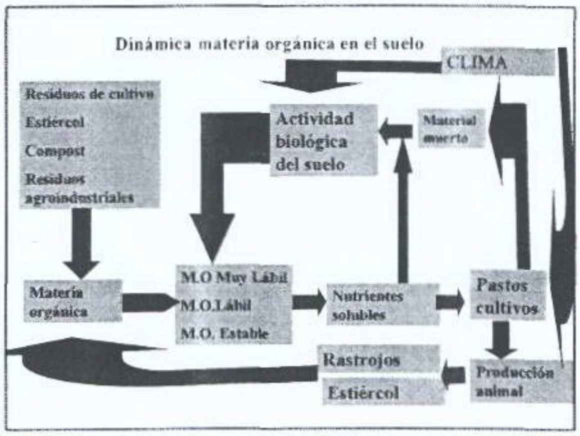
- Sodio:Sal marina sin refinar, sal gema bruta de mina, sulfato de sodio, Carbonato de sodio, Bicarbonato de sodio.
- Calcio: Conchas de animales acuáticos, carbonato de calcio, lactato de calcio, gluconato de calcio.
- Fósforo: Fosfatos bicálcicos, precipitados de huesos, fosfato bicálcico defluorado, fosfato monocalcico desfluorado.
- Magnesio:Magnesio anhidro, sulfato de magnesio, cloruro de magnesio, carbonato de magnesio.
- Azufre: Sulfato de sosa
- Aditivos para la alimentación
- Hierro:Carbonato Ferroso, Sulfato ferroso, oxido ferrico.
- Yodo:Yodato de calcio anhidro, yodato de calcio hexahidratado, yoduro de potasio.
- Cobalto: Sulfato de cobalto, monohodrato o sulfato de cobalto heptahidratado, carbonato basico de cobalto monohidrato.
- Cobre: Oxido cuprico, carbonato de cobre basico, monohidratado, sulfato de cobre pentahidratado.
- Manganeso: Carbonato manganoso, óxido manganoso, mono y/o tetrahidratado.
- Zinc: Carbonato de zinc, sulfato de zinc mono y/o heptahidratado.
- Molibdeno:Molibdato de amonio, molibdato de sodio.
- Selenio: Selenato de sodio, selenito de sodio.

Bases para el diseño de sistemas orgánicos de producción

- Diversificación espacio temporal.
- Integración de agricultura y ganaderia.
- Reciclaje de residuos agropecuarios y agroindustriales.
- Diseño y optimización del uso del espacio agricola y natural.

Integración de agricultura y ganadería

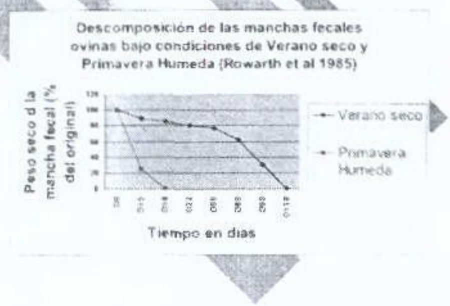
- Diseño de sistema de rotación-praderas cultivos.
- Generación de ciclo de carga y descarga de nutrientes.
- Aceleración de ciclos de nutrientes.
- Ruptura de ciclos biológicos.
- Estabilización y flexibilización de ingresos.



Pastoreo

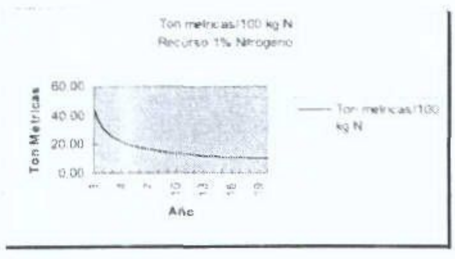
Valores críticos requeridos de la altura del pastizal para mantener los niveles de ingesta de herbáceas y el rendimiento animal cercano al máximo. (Adaptado de Hodgson 1994)

	Altura pradera en cms.
Consumo continuo	
Ovejas hembras y corderos	
Primavera	4-5
Verano	7-8
Vacas y terneras en engorda	9-10
Terneras destetadas	9-10
Vacas lecheras	9-10
Consumo alternado	
Ovejas y corderos	6-7
Vacas y terneras	9-10
Terneras destetadas	11-12
Vacas lecheras	9-10



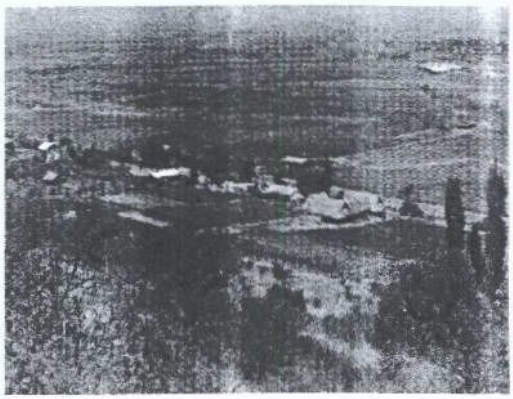
Cantidad de nutrientes(tasa de aplicación/ha) en las manchas fecales de bovinos y ovinos, y producción fecal anual por animal(Haynes Y Williams 1993)

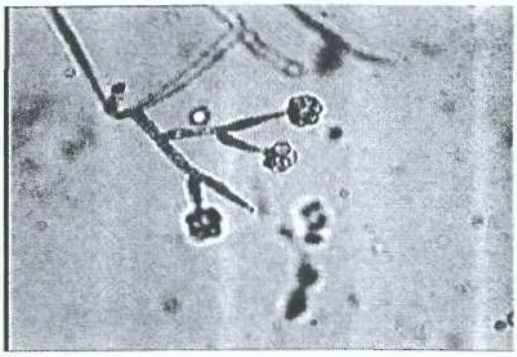
Parametro	Concentración típica %	Tasa de aplicación en la mancha fecal Kg/ha Ovinos	Tasa de aplicación en la mancha fecal Kg/ha Bovinos	Salida anual Kg/anima l/año	Salida anual Desde animales Kg/Ha
Materia orgánica	80	4000	32000	699	1748
N	2.6	130	1040	23	57
P	0.70	35	280	6.1	15
S	0.25	13	100	2.3	5.3
K	1.0	50	400	8.8	22
Ca	2.0	100	800	17	43
Mg	0.66	33	264	5.8	15

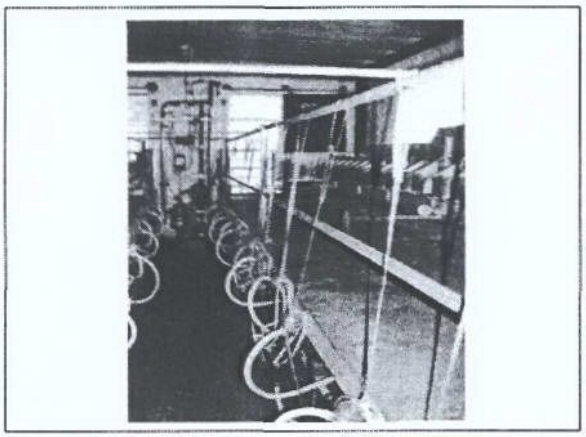


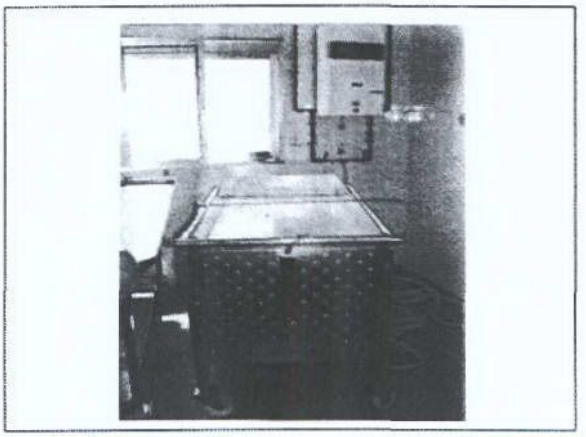
Composición compost agroindustriales

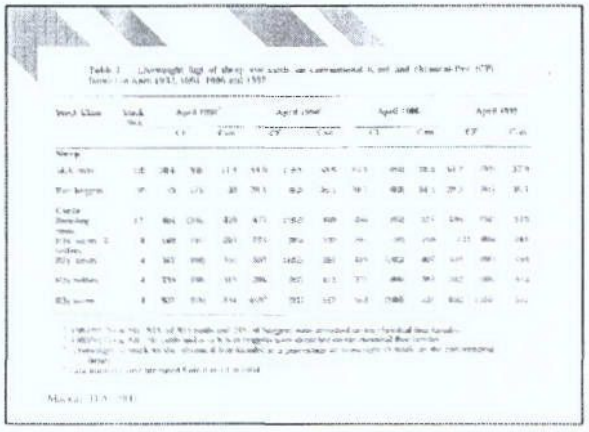
NUTRIENTE	EXPRESION	COMPOST CAMA ANIMAL	RESIDUO FORESTAL-FERIA	RESIDUOS FORESTAL-FERIA
pH		8.15	7.65	7.93
Conductividad	Mmhos/cm	1.43	1.43	1.34
Materia orgánica	%	35.28	40.98	36.42
N total	%	1.41	1.65	1.53
P total	%	0.29	0.25	0.27
P2O5 total	%	0.66	0.62	0.62
K total	%	0.940	0.800	0.810
K2O total	%	1.13	0.96	0.98
C total	%	17.59	23.82	21.18
C/N		12.48	14.44	13.84
Materia seca	%	83.38	84.12	84.90
Humedad	%	16.63	15.88	15.10
N disponible	Ppm	172.70	242.70	158.70
P disponible	Ppm	366.92	371.25	342.38
K disponible	Ppm	9338.0	8078.00	7868.06











Demanda Europea de productos orgánicos

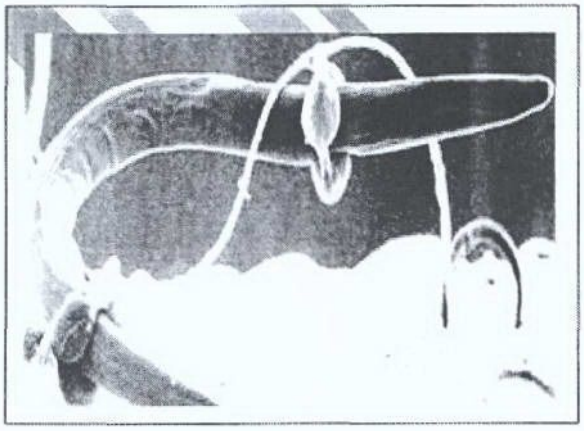
	Tamaño del mercado Orgánico-2000	Mercado pecuario 2002
Mercado Europeo	11,7 Bill US$	1,42 bill US$

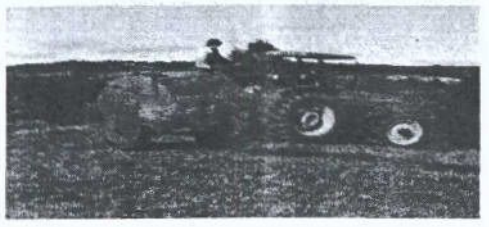
AGENTES DE CONTROL BIOLOGICO

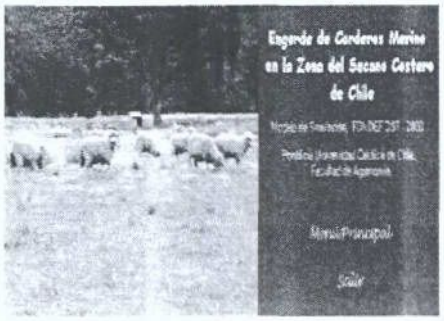
Grupo de micro-hongos (Hyphomycetes) ubicuos, comúnmente encontrados en material vegetal en descomposición, fecas y suelo

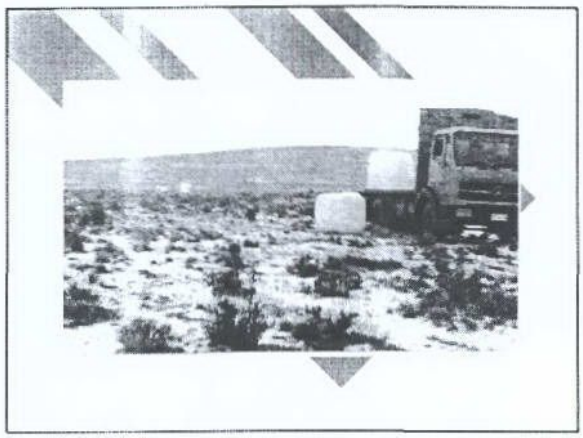
HONGOS: ATRAPA-NEMATODOS
NEMATOFAGOS
PREDATORES

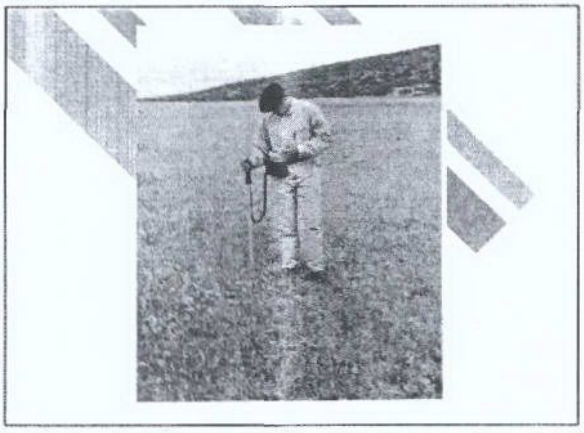
ANILLOS ADHESIVOS

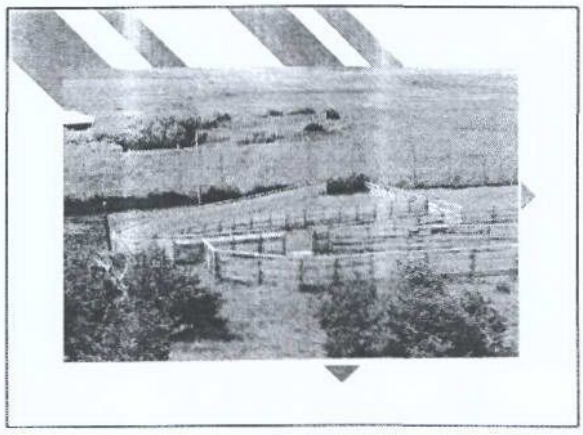


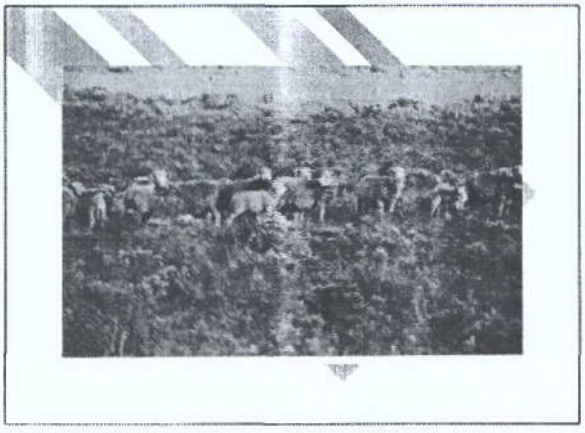


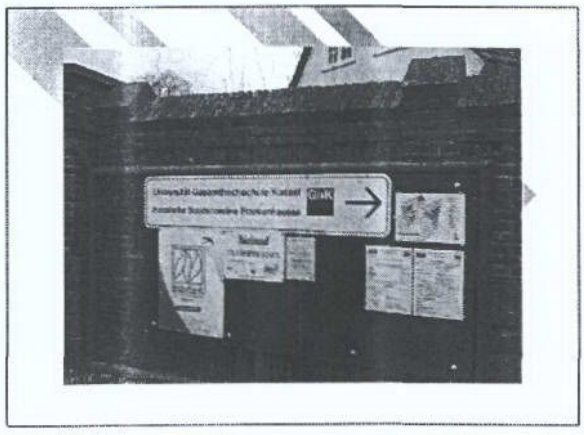


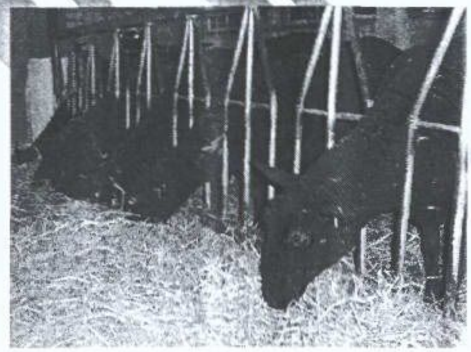


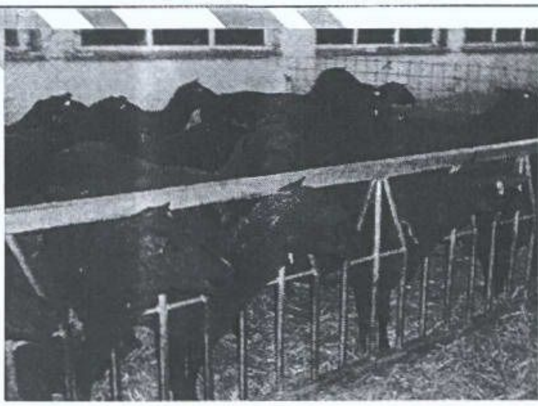








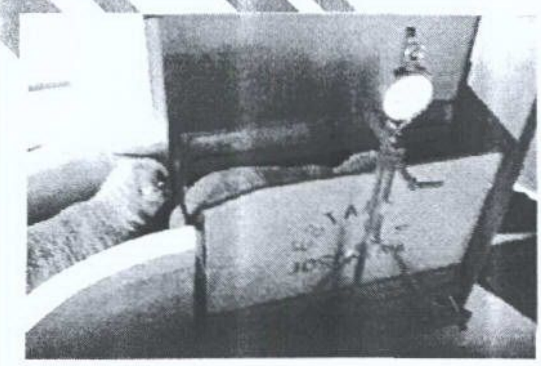


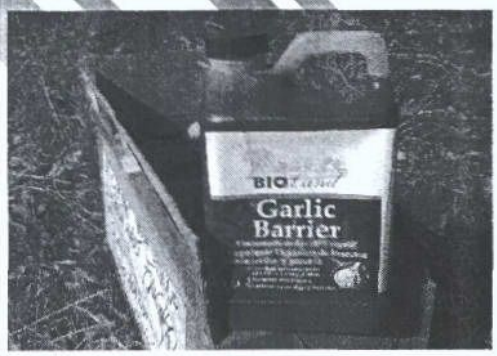


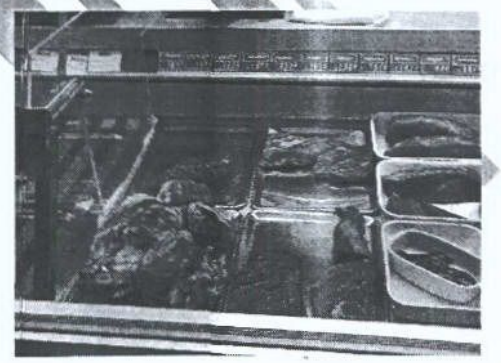
GRUPO	TRATAMIENTO	DOSIS ml/kg	VIA	NUMERO DE ANIMALES
1	ACIDO GARLICO	0.5	ORAL	15
2	ACIDO GARLICO	[illegible]	ORAL	15
3	ACIDO GARLICO	[illegible]	ORAL	15
4	NINGUNO (CONTROL)	—	—	15

Evaluación del cambio de peso en cuatro grupos de corderos suplementados con sales minerales, tratados con tres niveles de Garlic barrier® como vermífugo y pastoreando una pradera bajo manejo orgánico

Tratamientos (un testigo absoluto y un grupo sin aplicación de Garlic barrier ®)	Peso al destete Kg ([illegible])	Peso [illegible] Kg ([illegible])	Incremento de peso por animal Kg
Testigo (manejo convencional)	31	32.91	1.9
Sales minerales sin ácido gárlico	33.84	[illegible]	[illegible]
Sales minerales [illegible] de ácido gárlico por k de peso	[illegible]	33.7	[illegible]
Sales minerales [illegible] de ácido gárlico por k de peso	33.8	34.8	[illegible]
Sales minerales [illegible] de ácido gárlico por k de peso	30.8	[illegible]	[illegible]







Caracterización general del predio.
Caracterización vegetacional de la Estancia Josefina mediante el método de las Unidades de Paisaje Homogéneas (UPH) En esta caracterización vegetacional se ha utilizado información del proyecto realizado por Pérez C. (2000). Esta define un conjunto de 17 UHP. Ella emplea la metodología de Clasificación de Ecorregiones y Determinación de Sitio y Condición desarrollada por Gasto, Costa y Parsalo (1994). Esta metodología es utilizada por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) en el programa de Protección y Remuneración de Pastizales en la XII Región.

Las características cualitativas y cuantitativas de las UPH incluyen las siguientes mediciones.

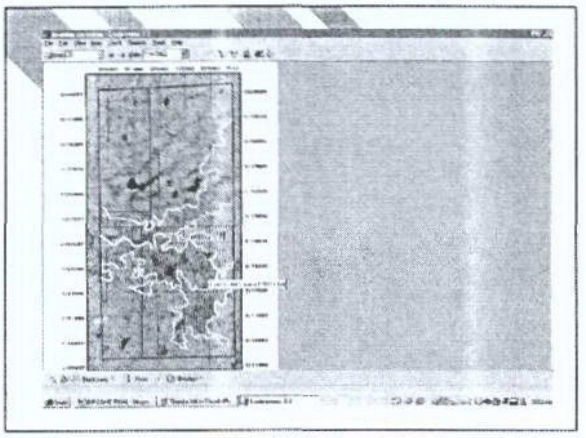
a. **Pendiente:** depresionales, planos, ondulados, montanos o serranos.
b. **Exposición:** Definida para aquellas unidades con pendientes mayores a 10.4% de pendiente.

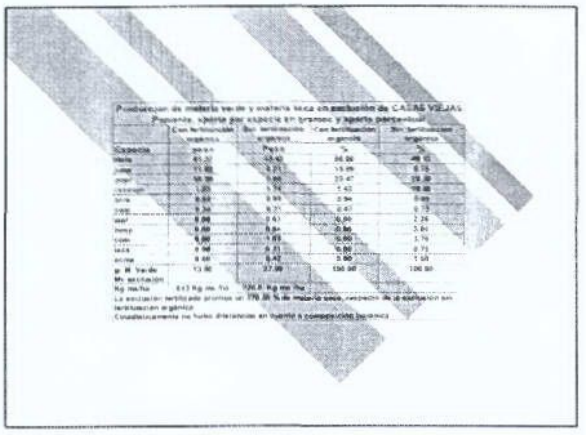
Características del Suelo:

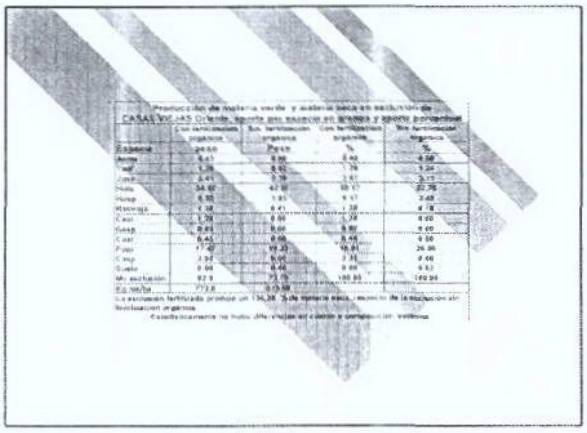
a.- **Profundidad del suelo.**
b.- **Textura.**
c.- **Análisis químico.**
d.- **Pedregosidad en superficie y afloramientos rocosos:** presencia de surcos de erosión.

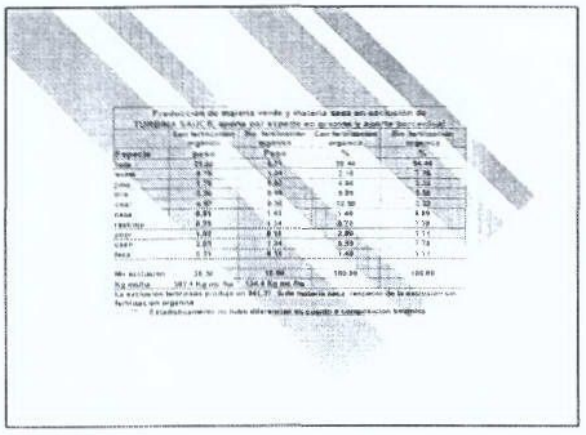
Mediciones de la Vegetación:

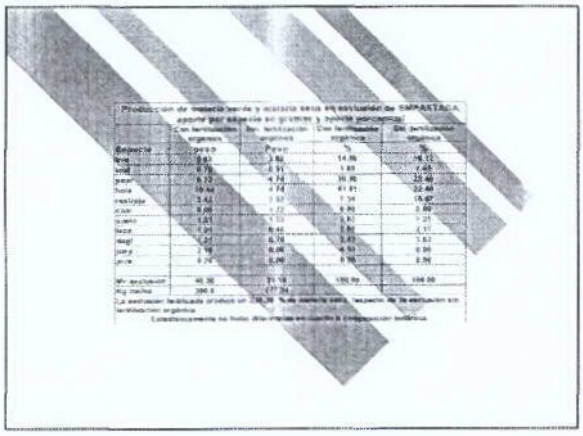
Composición de la pradera. Se realizan una o varias transectas distanciadas a una misma longitud, usando el método de transecta de paseo, que consiste en caminar sobre la pradera con un vástago que en su extremo lleva una argolla de ¾ de pulgada de diámetro y se anotan las especies cuyos puntos de crecimiento quedan dentro de la argolla. El número de transectas y la longitud de éstas va a depender de la cobertura vegetal y homogeneidad de la UPH. Además se debe registrar el suelo desnudo, piedras, rastrojo, leñas, y otras coberturas cuando queden incluidas en el área cubierta por la argolla. Las características consideradas en la transecta son:
Cobertura de las especies, dada por la presencia de cada especie del total de puntos muestreados en la(s) transectas.

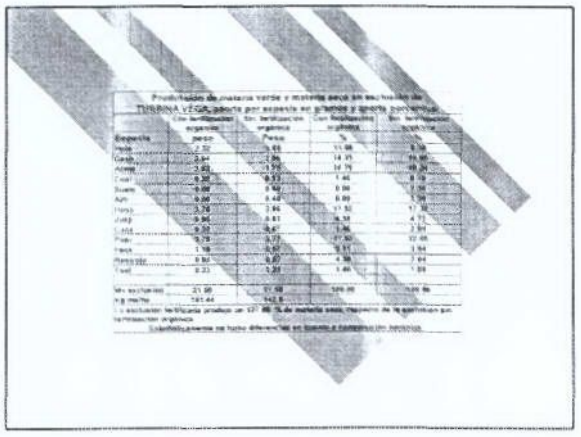


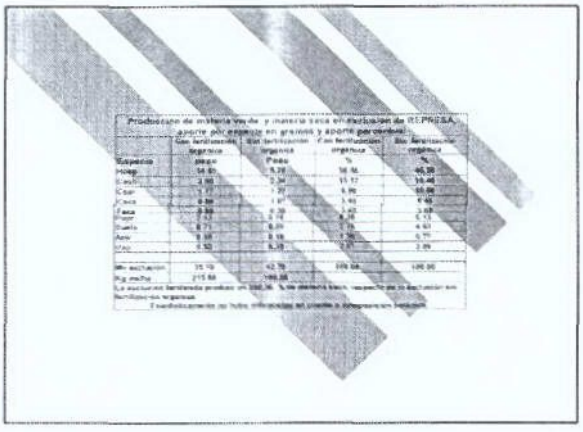


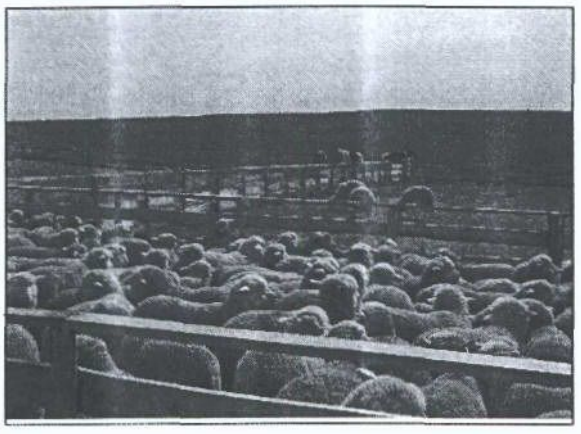


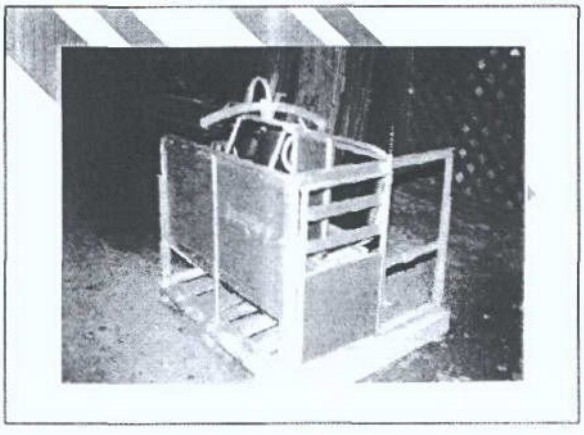


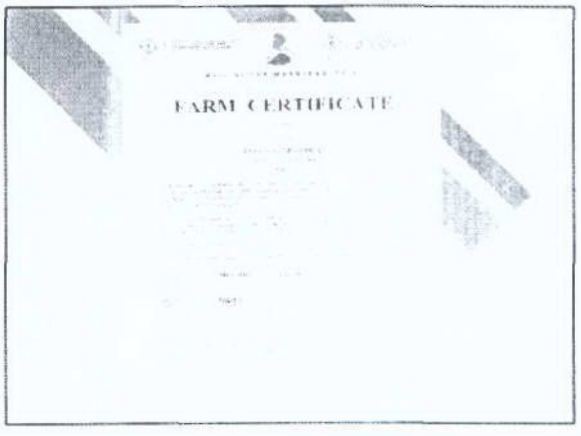








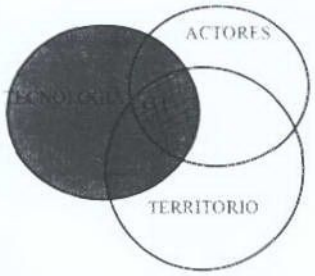



FARM CERTIFICATE

Ganadería Ecológica

Raúl Venegas V.

GANADERIA ECOLOGICA.



Objetivos Del Desarrollo Y Difusión De Los Procesos De Producción Ganadera Ecológica En El Ámbito Mundial.

- Producir alimentos de **alta calidad sanitaria, nutritiva y organoléptica**.
- Manejar de manera **integrada** los agroecosistemas.
- Mantener la **diversidad genética animal y** del ecosistema, protegiendo y desarrollando los habitat naturales.
- Entregar a los animales **condiciones vitales** para desarrollar su comportamiento innato.
- **Evitar todas las formas de contaminación** que puedan resultar de las técnicas agropecuarias.
- Crear una relación sinérgica entre ***el productor y el consumidor***, que desencadenen efectos favorables en el plano ecológico y social.
- **Conservar la salud publica y el medio ambiente**, en un marco de viabilidad económica de los sistemas.

Beneficios Esperados Sistema de Ganadería Ecológica.

Calidad: Obtencion de un producto que cumpla con una serie de exigencias de calidad, que tienen relación con el proceso de producción y de transformacion de los mismos.

Producción: Lograr niveles de producción, como mínimo, equivalentes a los actualmente obtenidos bajo un sistema tradicional.

Exportaciones: Destino principal los mercados externos.

Aumento en el Valor Agregado: Integración hacia delante, comercializando el producto final, con un aumento en el valor agregado.

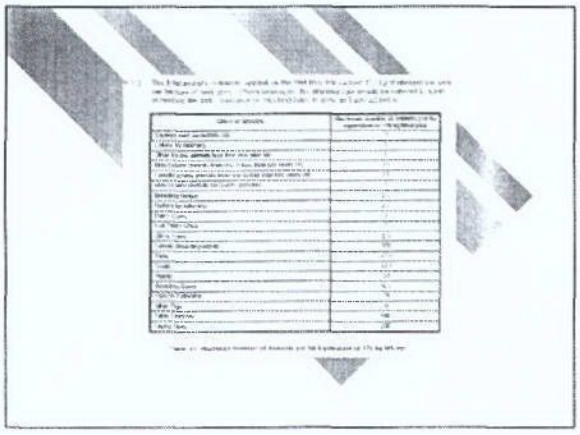
Impacto Ambiental: Utilización productiva de las especies y ecosistemas según su potencial productivo, para lo cual vincula las normas y procedimientos tecnologicos a dicho potencial (la tecnología es funcion del sitio ecologico)

Normativa O Marco Legal Especifico Que Define El Funcionamiento De La Ganaderia Ecológica. (Matta 1999).

- Los sistemas ganaderos ecológicos serán principalmente extensivos o semiextensivos. (nunca intensivos, no pueden cumplir con lo basico de la GE)
- Los alojamientos o refugios deben estar construidos de materiales no tóxicos y deben ser amplios ventilados e iluminados, con un area de reposo provista de camas y adecuados para manejar el ganado evitando el estrés que contribuya a romper el equilibrio sanitario en que se encuentran los animales.
- Los alimentos que consuma el ganado deben obtenerse por procedimientos ecologicos. Si se compran alimentos fuera de la propiedad estos deben estar certificados.

Periodo de Transición para el Establecimiento de un Manejo Ganadero Ecológico

- Transicion: tendrá una duración variable dependiendo del estado inicial del sistema que se convierte.
- El aspecto de mayor peso en la transición es la conversión del suelo o de las praderas y pasturas.
- Estiercol aplicable no debe superar un aporte de 170 kilogramos de N por ha /año. O cargas animales que superen ese aporte de N por ha.
- Los ovinos deben tener un tiempo mínimo de conversion de 6 meses.
- Una vez realizado el proceso de transición del sistema agrícola hay un mínimo de tiempo que el ganado debe cumplir para considerarse ecológico son los siguientes:
- Bovinos de leche 90 dias
- Bovinos de carne 60 dias
- Los cerdos deben cumplir con la normativa ecológica desde los 35 dias de su nacimiento; las aves de puesta deben estarlo desde los 38 dias de su nacimiento; y los corderos cabritos, conejos y pollos, deben cumplir las normas desde su nacimiento.
- No se permitirá la cria convencional y ecológica de la misma especie por el mismo productor.



Profilaxis y Cuidados Veterinarios en un Sistema de Ganadería Orgánica

- Vacunas:
- Se utilizarán las que la autoridad sanitaria establezca como obligatorias y las que autorice el organismo de control.

- Medicamentos:
- Están prohibidos los farmacos de síntesis a los que podrá recurrirse cuando fracasen todas las otras medidas que utiliza la producción ecológica.

- Antiparasitarios.

  Se utilizarán antiparasitarios solo cuando las normas de manejo sean sobrepasadas y se aplicaran fuera de las etapas de lactacion e inicio de la gestacion

Productos AUTORIZADOS PARA LA LIMPIEZA Y DESINFECCION DE LOCALES E INSTALACIONES.

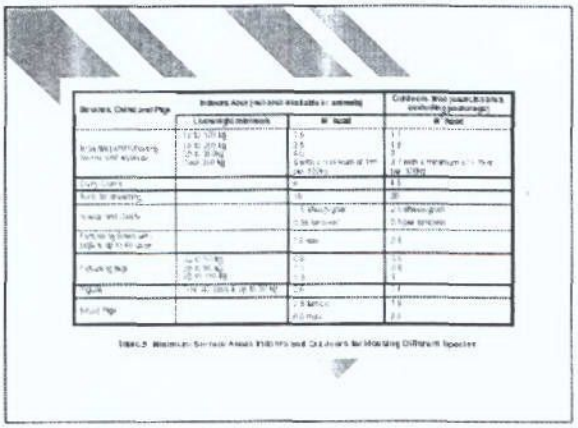
- Jabón de potasa y sosa, agua y vapor, Lechada de cal, Cal, Cal viva, Hipoclorito de sodio., Soda caustica, Potasa caustica, Peróxido de hidrogeno, Esencias naturales de plantas.
- Acido citrico, Ac. paracetico, Ac. formico, Ac láctico, Ac. Oxálico, y Acetico, Alcohol, Acido Nitrico, Acido fosfórico, Formaldehido
- Productos de la desinfeccion de los pezones y de las instalaciones de ordeño.
- Carbonato de sodio.
- Tambien está permitido el uso de compuestos cúpricos para el uso en pediluvios.

Restricciones de la Normativa Europea para la Alimentación Animal en un Sistema de Ganadería Ecológica.

- Está permitido que hasta un 30% de los componentes de la formula de los concentrados se origine fuera del sistema de producción.
- Esta permitido el uso de un máximo de 10 % de la materia seca que los rumiantes puedan consumir, provenga de otros orígenes que no sean ecologicas, con excepción de alimentos modificados genéticamente. Siendo el 10 % el máximo anual, este puede llegar a ser de un 25% al dia sin superar el monto anual.
- Los sistemas de cria utilizaran un 60% de la materia seca consumir constituida por forrajes frescos, ensilados o desecados. Solo en el caso de la producción lechera este porcentaje se podrá reducir a un 50% (CEE 2000).
- No está permitido el uso de sustitutos de leche. Las vitaminas inyectables solo se podrán utilizar en ausencia de vitaminas naturales. El uso de minerales se podrá realizar con las fuentes que están autorizadas por las diversas normativas. En ningun caso se podrán utilizar hormonas, promotores de crecimiento, antibioticos, colorantes o urea en el alimento.

Materias Primas De Origen Mineral Permitidas En La Agricultura Ecológica.

- Sodio:Sal marina sin refinar, sal gema bruta de mina, sulfato de sodio, Carbonato de sodio, Bicarbonato de sodio.
- Calcio: Conchas de animales acuáticos, carbonato de calcio, lactato de calcio, gluconato de calcio
- Fosforo: Fosfatos bicálcicos, precipitados de huesos, fosfato bicalcico defluorado, fosfato monocalcico defluorado.
- Magnesio:Magnesio anhidro, sulfato de magnesio, cloruro de magnesio, carbonato de magnesio.
- Azufre: Sulfato de sosa
- Aditivos para la alimentacion
- Hierro:Carbonato Ferroso, Sulfato ferroso, oxido ferrico.
- Yodo:Yodato de calcio anhidro, yodato de calcio hexahidratado, yoduro de potasio.
- Cobalto: Sulfato de cobalto, monohidrato o sulfato de cobalto heptahidratado, carbonato basico de cobalto monohidrato.
- Cobre: Oxido cuprico, carbonato de cobre básico, monohidratado, sulfato de cobre pentahidratado.
- Manganeso: Carbonato manganoso, oxido manganoso, mono y/o tetrahidratado.
- Zinc: Carbonato de zinc, sulfato de zinc mono y/o heptahidratado,
- Molibdeno: Molibdato de amonio, molibdato de sodio
- Selenio: Selenato de sodio, selenito de sodio.



Bases para el diseño de sistemas orgánicos de producción

- Diversificación espacio temporal.
- Integración de agricultura y ganadería.
- Reciclaje de residuos agropecuarios y agroindustriales.
- Diseño y optimización del uso del espacio agrícola y natural.

Integración de agricultura y ganadería

- Diseño de sistema de rotación-praderas cultivos.
- Generación de ciclo de carga y descarga de nutrientes.
- Aceleración de ciclos de nutrientes.
- Ruptura de ciclos biológicos.
- Estabilización y flexibilización de ingresos.

Bases para el manejo que permiten el desarrollo de los sistemas de ganadería ecológica Vencgas (1996).

Establecimiento de sistemas de manejo en función del potencial de los ecosistemas y de la población animal en que los animales logren expresar su capacidad genética reproductiva.

Los animales se alimentarán principalmente con recursos locales, utilizando el pastoreo directo de praderas orgánicas en sus diversas formas en sistemas en rotación tanto por el manejo del pastoral como para interrumpir los ciclos biológicos de diversos parásitos y patógenos.

La salud animal se mantendrá en base a medidas sanitarias preventivas. Si hay riesgo de sobrevivencia de un animal se utilizarán productos farmacológicos, pero esos animales deben retirarse de la comercialización como producto ecológico.

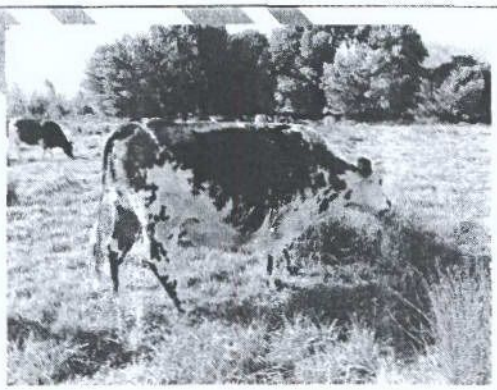
Control y registro continuo del proceso productivo ecológico. Certificación de la calidad del producto final y del proceso productivo.

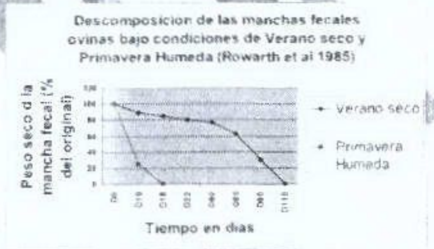
Dinámica materia orgánica en el suelo

Pastoreo

Valores críticos requeridos de la altura del pastizal para mantener los niveles de ingesta de herbáceas y el rendimiento animal cercano al máximo (Adaptado de Hodgson 1994)

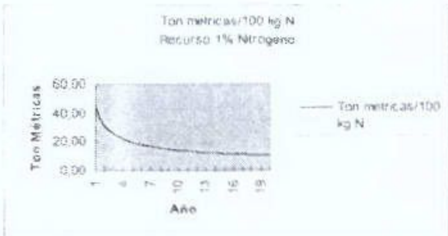
	Altura pradera en cm.
Consumo continuo	
Ovejas hembras y corderos	
Primavera	4 -5
Verano	7 -8
Vacas y terneras en engorde	9 -10
Terneras destetadas	9 -10
Vacas lecheras	9 -10
Consumo alternado	
Ovejas y corderos	6-7
Vacas y terneras	9-10
Terneras destetadas	11-12
Vacas lecheras	9-10





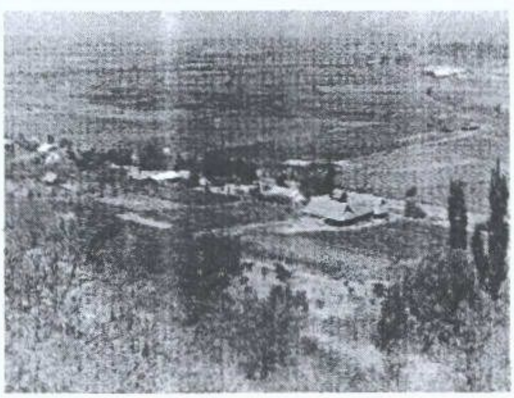
Cantidad de nutrientes (tasa de aplicación/ha) en las manchas fecales de bovinos y ovinos, y producción fecal anual por animal (Haynes y Williams 1993)

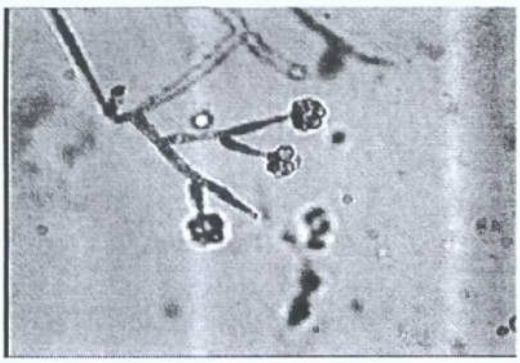
Parametro	Concentración típica %	Tasa de aplicación en la mancha fecal Kg/ha Ovinos	Tasa de aplicación en la mancha fecal Kg/ha Bovinos	Salida anual Kg/animal/año	Salida anual Desde animales Kg/Ha, (2.5 UA/ha)
Materia organica	80	4000	32000	699	1748
N	2.6	130	1040	23	57
P	0.70	35	280	6.1	15
S	0.25	13	100	2.1	5.3
K	1.0	50	400	8.8	22
Ca	2.0	100	800	17	43
Mg	0.66	33	264	5.8	15

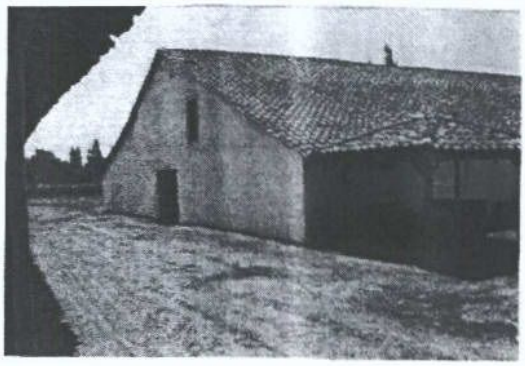


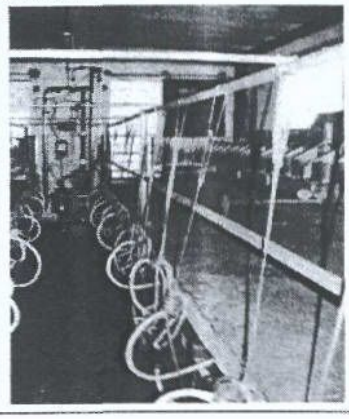
Composición compost agroindustriales

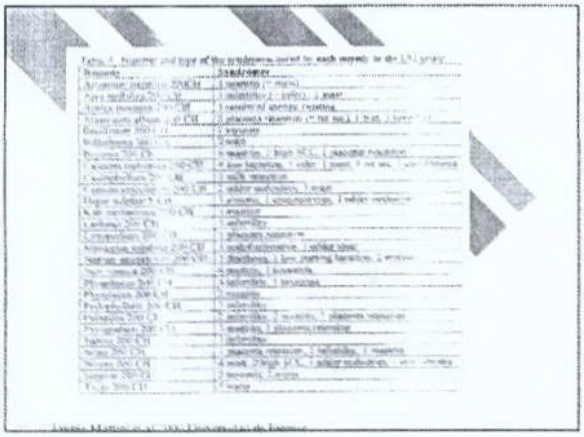
NUTRIENTE	EXPRESION	COMPOST CAMA ANIMAL	RESIDUO FORESTAL-FERIA	RESIDUOS FORESTAL-FERIA
pH		8.15	7.65	7.92
C. eléctrica	Mmhos/cm	1.15	1.43	1.34
M. orgánica	%	30.36	40.98	36.42
N total	%	1.41	1.65	1.57
P total	%	0.29	0.27	0.27
P2O5 total	%	0.66	0.62	0.62
K total	%	0.940	0.806	0.819
K2O total	%	1.13	0.96	0.98
C total	%	17.59	23.82	21.18
C/N		12.48	14.44	13.84
Materia seca	%	83.38	84.12	84.96
Humedad	%	16.63	15.88	15.10
N disponible	Ppm	172.70	242.70	158.70
P disponible	Ppm	366.92	371.25	342.38
K disponible	Ppm	9736.8	8078.00	7888.00

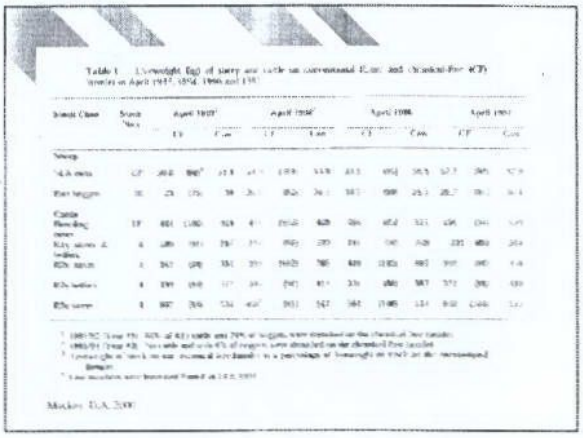












Demanda Europea de productos orgánicos

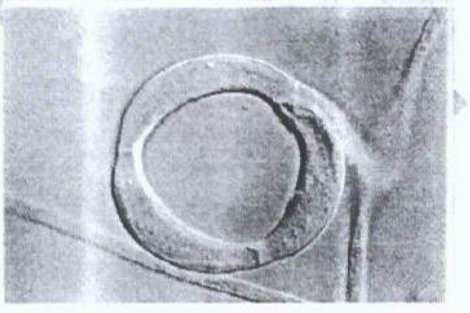
	Tamaño del mercado Orgánico-2000	Mercado pecuario 2002
Mercado Europeo	11,7 Bill US$	1,42 bill US$

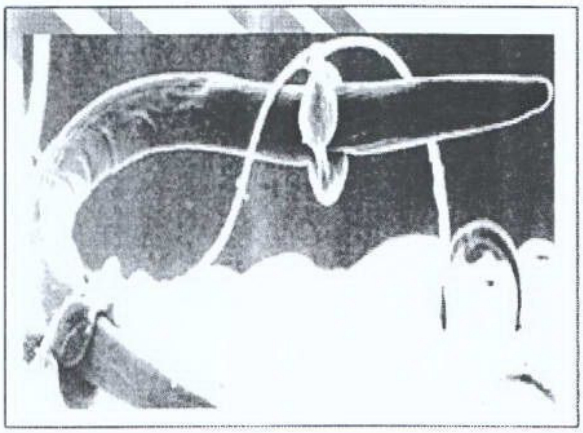
AGENTES DE CONTROL BIOLOGICO

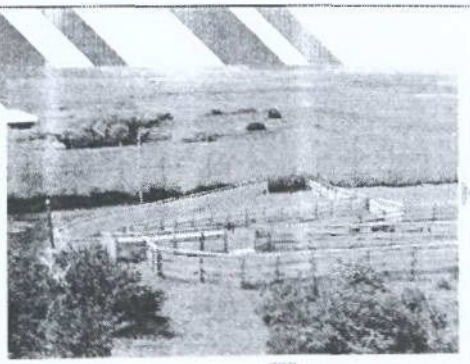
Grupo de micro-hongos (Hyphomycetes) ubicuos, comunmente encontrados en material vegetal en descomposición, fecas y suelo

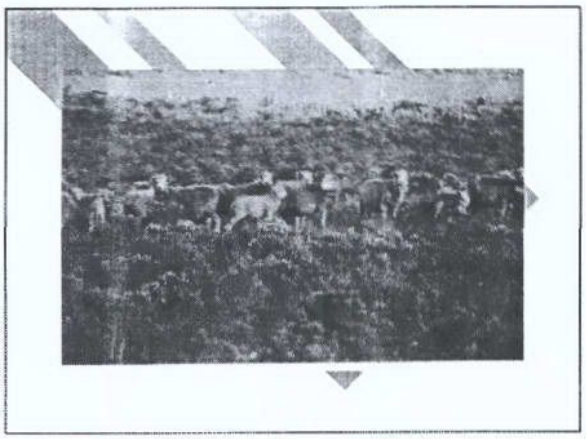
HONGOS: ATRAPA-NEMATODOS
NEMATOFAGOS
PREDATORES

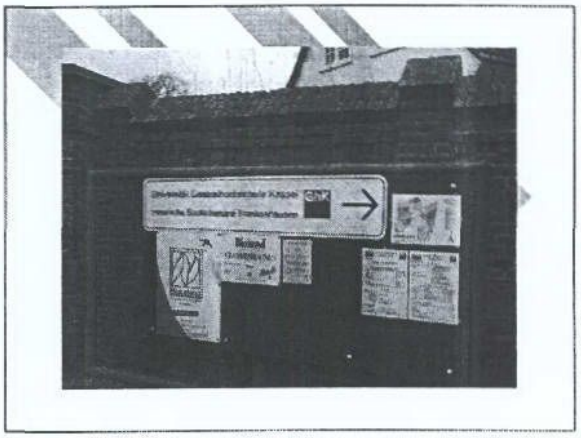
ANILLOS ADHESIVOS

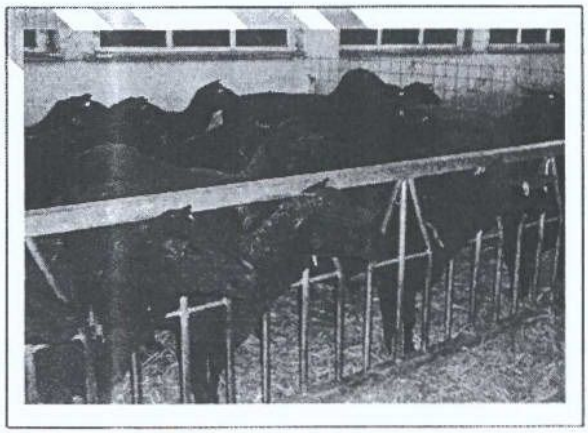


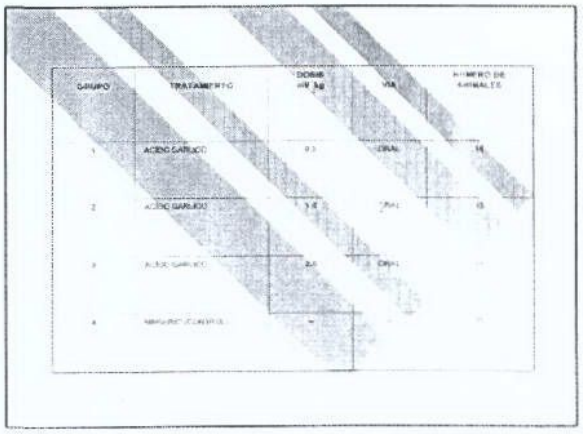


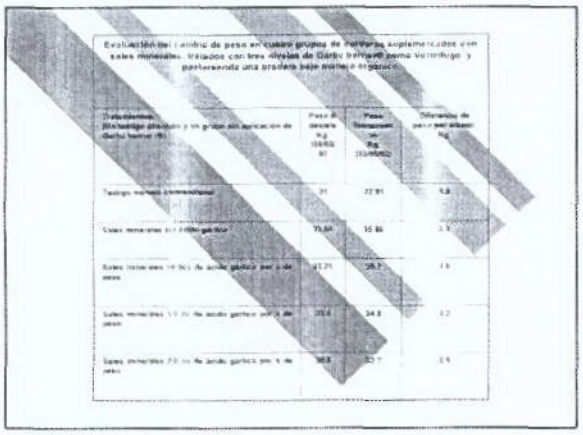


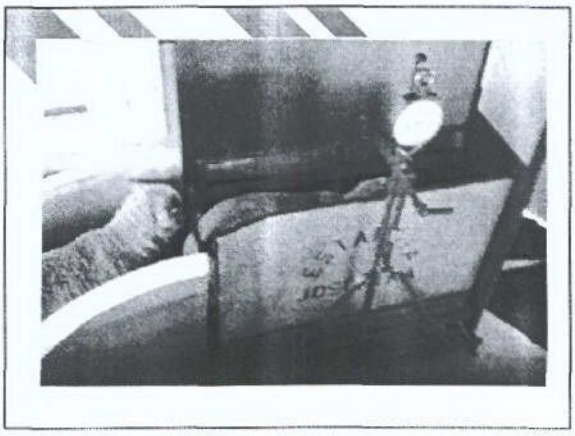


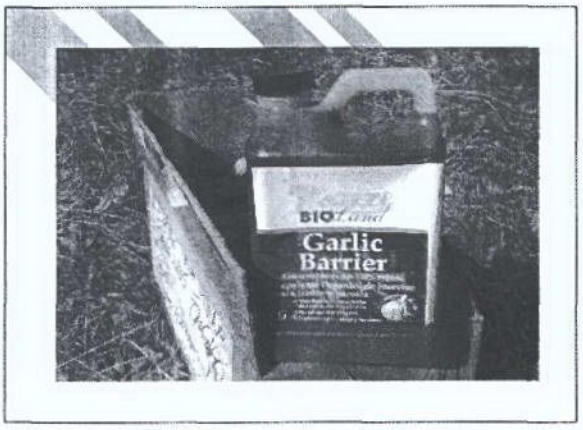


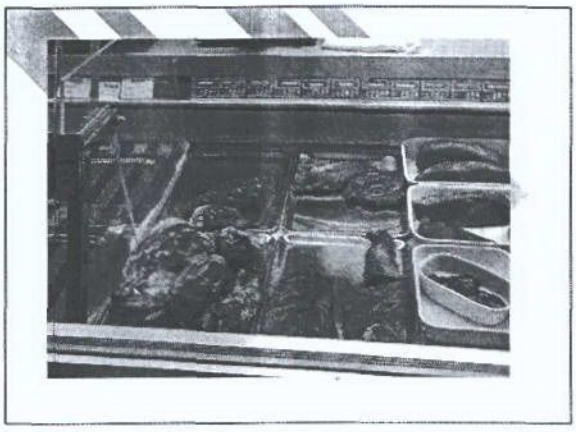



GRUPO
TRATAMIENTO
DOSIS
VIA
NUMERO DE ANIMALES
ACEITE GARLICO
ORAL

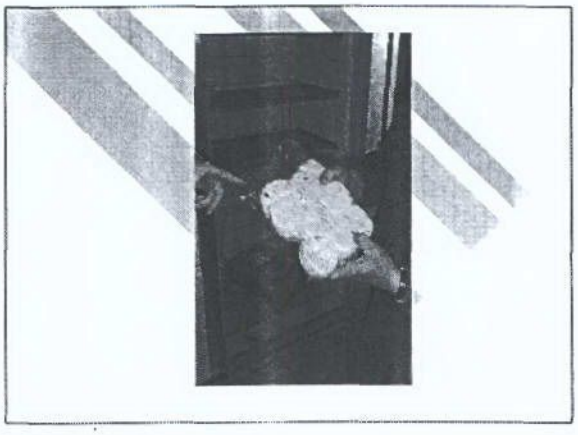





BIOLand
Garlic
Barrier



CHILE



Caracterización general del predio
Caracterización vegetacional de la Estancia Josefina mediante el método de las Unidades de Paisaje Homogéneas (UPH). En esta caracterización vegetacional se ha utilizado información del proyecto realizado por Pérez C. (2000). Este define un conjunto de 17 UHP. Ella emplea la metodología de Clasificación de Ecorregiones y Determinación de Sitio y Condición desarrollada por Gastó, Cosio y Panario (1994). Esta metodología es utilizada por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) en el programa de Protección y Recuperación de Pastizales en la XII Región.

Las características cualitativas y cuantitativas de las UPH incluyen las siguientes mediciones.

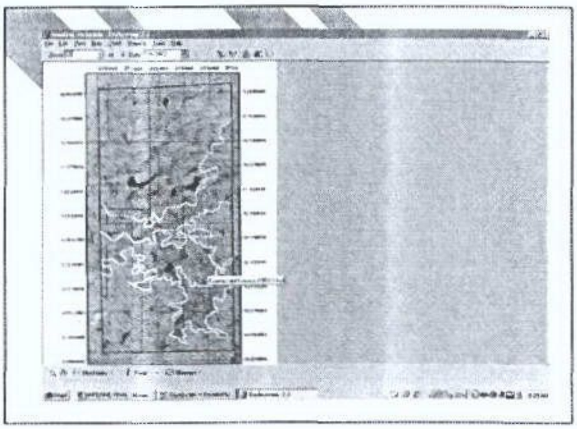
a. Pendiente: [illegible] planos, ondulados, montañosos o serranos.
b. Exposición: Definida para aquellas unidades con pendientes mayores a 10 % de pendiente.

Características del Suelo

a. Profundidad del suelo
b. Textura
c. Análisis químico
d. Pedregrosidad en superficie y afloramientos rocosos, presencia de surcos de erosión.

Mediciones de la Vegetación

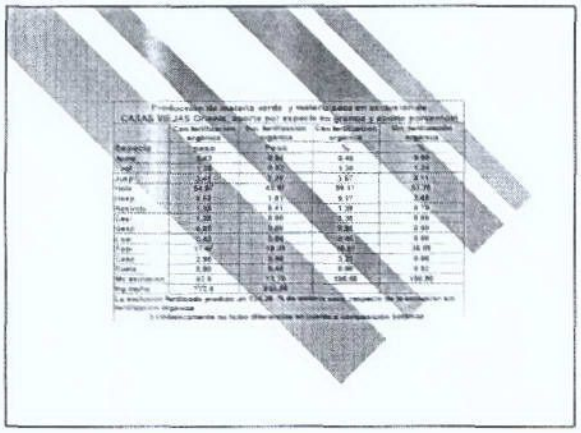
Composición de la pradera: Se realizan una o varias transectas distanciadas a una misma longitud, usando el método de transecto de paso [illegible] que consiste en caminar sobre la pradera con un vástago que en su extremo lleva una argolla de [illegible] pulgada de diámetro y se anotan las especies cuyos puntos de [illegible] quedan dentro de la argolla. El número de transectas y la longitud de estas va a depender de la cobertura vegetal y homogeneidad de la UPH. Además se debe registrar el suelo desnudo, [illegible] fecas y otras coberturas cuando queden incluidas en el área cubierta por la argolla. Las características consideradas en la transecta son:
Cobertura de las especies: dada por la presencia de cada especie del total de puntos muestreados en la(s) transecta(s).

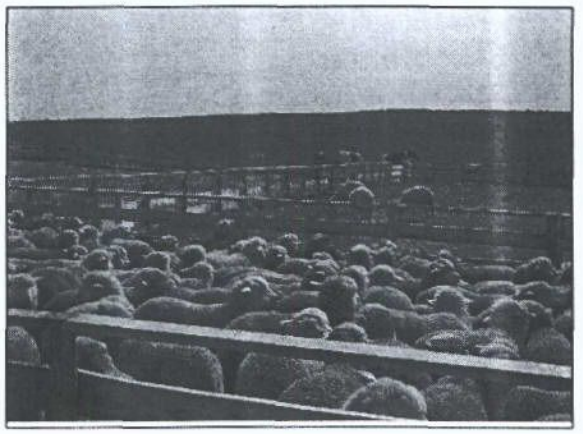


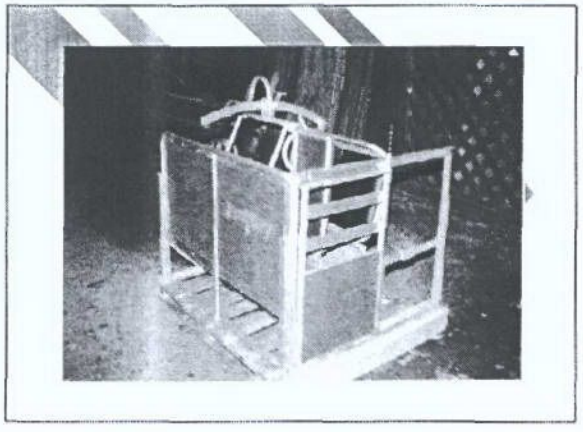
Producción de materia verde y materia seca en exclusión de CASAS VIEJAS
Parcela, aporte por especie en gramos y aporte porcentual

	Con fertilización orgánica	Sin fertilización orgánica	Con fertilización orgánica	Sin fertilización orgánica
Especie	peso	Peso	%	%
[illegible]	46.32	11.40	54.58	40.12
[illegible]	[illegible]	[illegible]	15.99	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	1.42	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	0.94	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	0.47	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	0.00	[illegible]
[illegible]	0.00	[illegible]	0.00	[illegible]
[illegible]	0.00	[illegible]	0.00	[illegible]
[illegible]	0.00	[illegible]	0.00	[illegible]
[illegible]	0.00	[illegible]	0.00	[illegible]
g. M. Verde	73.00	27.00	100.00	100.00
[illegible]				
Kg. ha/ha	613 Kg ms /ha	[illegible] Kg ms /ha		

La exclusión fertilizada produce un [illegible] % de materia seca, respecto de la exclusión sin fertilización orgánica.
Estadísticamente no hubo diferencias en cuanto a composición botánica







FARM CERTIFICATE

12. **Bibliografía Consultada**

Araújo, J. Stephano, M. Sampaaio. W. 1999. Pasage of nematode trapping fungi through the gastrointestinal tract of calves. Veterinarski Arhiv. 69(2) 69-78.

Araújo, J. 1998. Predacious activity of *Arthrobotrys* spp isolates on infective *Cooperia punctata* larvae. Braz.J. vet. Pes. Anim. Sci. 35(1) 9-11

Barger, I. 1997. Control by management. Vet. Parasitol 72:493-506

Barnes,E. Dobson, R. Barger. I. Wormo control and anthelmintic resistance: Adventures with a model. In. Larsen, M. 1999. Biological Control of helminthes. International Journal for Parasitology 29 139-146.

Barron, G.L. 1975. The nematode-destroying fungi. Guelph, Canada: Can Biol. Publ.140pp

Barron, G.L. 1977. The nematode-destroying fungi. Canadian Biological Publications Ltd. Ontario Canada. 140pp.

Baudena, M. Chapman, M. Larsen, and Klei, T. 2000. Efficacy of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in reducing equine cyathostome larve on pasture in south Louisiana. Vet. Parasitol. 89.:219-230

Bird, J. and Herd, R. 1995. In vitro assessment of two species of nematophagous fungi (*Arthobrotys oligosporaa and Arthobotrys flagrans*) to control the development of infective cyathostome larvae from naturally infected horses. Vet. Parasitol. 56:1811-1187.

Bone, L. Bottjer, W, Gill. S. 1985 *Trichostrongylus colubriformis* eggs lethality due to *Bacillus thuringiensis* crystal toxin Exp. Parasitol 60:314-322

Bone, L. Bottjer, W, Gill. S. 1987 *Trichostrongylus colubriformis* eggs and juveniles caused by *Bacillus thuringiensis israelensis*. J. Nematol 19:282-286.

Castro, A; Oliveira, C; et al. 2003. Potencial dos fungos nematófagos *Arthrobotrys* sp. e *Monacrosporium thaumasium* para o controle de larvas de ciatostomineos de equinos (nematodo: cyathostominae) Rev. Bras. Parasitol. Vet. 12(2)53-57.

Charles, T. Roque, M. Santos, C. 1996. Reduction of *Haenmonchus contortus* infective larvae by *Harposporium anguillulae* in sheep faecal cultures. International Journal Parasitology 25(5):509-510.

Cooke, R. 1968. Relationship between nematode destroying fungi and soil-borne phytonematodes. Phtopathology. 58,904-913

Cooke, R. and Godfrey, B. 1964. A key to the nematode destroying fungi. British Mycological Society, 47, 1, 61-74.

Faedo, M. Barnes, E. Dobson,H. Waller, J. 1998. The potential of nematophagous fungi to control the free living stages of nematode parasites of sheep pasture plot study with *Duddingtonia flagrans*. Vet. Parasitol. 76:1/2,129-1135.

Fernandez AS. Larsen, M. Nansen, P, Gronvold, J. Henriksen SA. Bjorn.H. and Wolstrup, J.1999 The efficacy of two isolates of nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against *Dictyocaulus viviparus* larve in faeces. Veterinary Parasitology 8(4) 289-304

Fernandez AS. Larsen, M. Nansen, P, Gronvold, J. Henriksen SA. Wolstrup, J. 1997. Effects of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* on the free living stage of horse parasitic nematodes a plot study. Vet Parasitol. 73:257-266.

Githigia, S. Thamsborg, M. Larsen, M. Kyvsgaard, M. Nansen, N. 1997. The preventive effect of the fungus *Duddingtonia flagrans* on trichostrongyle infections of lambs on pasture. International Journal for Parasitology 27:8, 931-939.

Graminha, E. Costa, A. Oliveira, P et al. 2005. Biological control sheep parasite nematodes by nematode-trapping fungi: in vitro activity and alter passage through the gastrointestinal tract. World Journal of Microbiology & Biotechnology 21: 717-722.

Gray, N. 1985. Ecology of nematophagous fungi: effect of soil moisture, organic matter, pH and nematode density on distribution. Soil Biology and Biochemistry. 17:499-507.

Gronvold J. Korsholm H. Wolstrup J. Nansen P. Henriksen SA 1985: Laboratry experiments to evaluate the ability of Arthobrotys oligospora (Hyphomycetales) to destroy infective larve of Cooperia species, and to investigate the effect og physical factors on the growth of the fungus. Journal Helminthology.59:119 126.

Gronvold, B.,Wolstrup,J. Larsen, M. Nansen,P. and Bjorn, H. 2000. Absence of obvious short term impact of the nematode trapping fungus Duddingtonia flagrans on survival and growth of earthworm *Aporrectodea longa*. Act. Vet Scand. 41,147-1151.

Gronvold, J. Wolstrup.J. Nansen.P. and Henriksen,SA. 1993. Nematode-trapping fungi against parasitic cattle nematodes. Parasitology Today 9(4). 137-140

Gronvold. J, Henriksen,S.A. Nansen, P. Wolstrup, J. & Thylin, J. 1989. Attempts to control infection with *Ostertagia ostertagi* (Trichostrongylidae) in

grazing calves by adding mycelium of the nematode.trapping fungus *Arthobrotys oligospora* to cow pats. Journal of helmintology 63, 115-126.

Henriksen,SA. Larsen, M. Gronvold, J. Nansen,P. Wolstrup, J. 1997. Nematode trapping fungi in biological control of *Dictyocaulus viviparous*. Act Vet. Scand. 38,175-179.

Jackson, F. 1993. Anthelmintic resistance – the state of play. British Veterinary Journal 149, 123-138.

Jaffee, B. Ferris, H, and Scow, K. 1998. Nematode-trapping fungi in organic and conventional cropping systems. Phytopathology 88(4) 344-350.

Jaffee, B. Strong, D. Muldoon, A. 1996. Nematode-trapping of natural shrubland: Test for food chain involvement. Mycology 88(4), 554-556.

Jaffee, B.2004. Do organic amendments enhance the nematode-trapping fungi *Dactylellina haptoyla* and *Arthrobotrys oligospora*. Journal Nematology 36(3) 267-275

Kerry, B.R. 1980. Biocontrol: fungal parasites of female cysst nematodes. Journal of Nematology 12, 253-259.

Klei, TH. And Baudena, A. 1999- Nematode-trapping fungi provide a new approach to control equine nematodes. Equine Vet. Research. Program. University Louisiana. 7(1) 1-5.

Koppenhöfer, A. Jaffee, B. Muldoon, A. And Strong, D. 1997. Suppression of an entomophatogenic nematode by the nematode traping fungi *Geniculifera paucispora* and *Monacrosporium cudermatum* as affected by the fungus *Arthobotrys oligospora*. Mycology 89(2) 220-227.

Larsen, M. 1999. Biological Control of helminthes. International Journal for Parasitology 29: 139-146.

Larsen, M. Faedo, M. Waller, J. Hennessy, D. 1994. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: survey for presence of fungi in fresh faeces of grazing livestock in Australia. 53: 275-281.

Larsen, M. Faedo, M. aller, J. Hennessy, D. 1998. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep:Studie with *Duddingtonia flagrans*. Vet. Parasitol. 76:1/2:121-128.

Larsen, M. Faedo. M. Waller, P.J. 1994 The potential of nematophagous fungi to control the free living stages of nematodes parasites of sheep: survey for the presence of fungi in fresh faeces of grazing livestock in Australia. Vet Parasitol:53:275-281.

Larsen, M. Nansen, P. 1990. Effects of the oyster mushroom Pleurotus pulmonariuss on preparasitic larvae of bovine trichostrongyles. Acta Vet Scand. 31:509-5110

Larsen, M. Nansen, P. 1991. The ability of the fungus Plurorus pulmonarius to inmobilize preparasitic larvae Res vet Sci 51: 246-249

Larsen, M. Nansen, P. Grondahl. C. Thamsborg, S. Gronvold, J. Wolstrup, J. Henriksen, S.A. and Monrad. J. 1996. The capacity of the fungus *Daddingtonia flagrans* to prevent strongyle infections in foals on pasture. Parasitology 113, 1-6.

Larsen, M. Nansen, P. Gronvold, J. Wolstrop, J Henriksen, S.A. 1992. In vivo passage of nematophagous fungi selected for biocontrol of parasitic nematodes in ruminaaants. J. Helminthol. 66:137-141.

Larsen, M. Nansen, P. Wolstrop, J. Gronvold, J. Henriksen, S.A & Zorn, A. 1995. Biological Control of trichostrongyles in calves by the fungus *Duddingtonia flagrans* fed to animals under natural grazing conditions. Veterinary Parasitology 60, 321-330.

Liou, G.Y. and Tzean,S. 1997. Phylogeny of the genus Arthrobotrys and allied nematode-trapping fungi based on rDNA sequences. Mycologia 89(6) 876-884.

Llerandi, J and Mendoza de G. 1997. Resistance of nemathofagous fungi chlamysospores to the digestive processes of sheep in Mexico. In Mendoza de G. Mendoza de G. 1998. Perspectives in the use of nematophagous fungi in the control of gastro-intestinal nematodes in the livestock industry in Mexico. FAO. Animal Producction and Halth. Paper: 141: 83-85

Mankau, R. 1980. Biological Control of nematode pests by natural enemies. Ann Rev, Phytopathology 18: 415-40

Manueli, P. 1998. Livestock production, effects of helminth parasites and prospects for their biological control in Fiji. FAO. Animal Producction and Halth. Paper: 141, 47-53

Mendoza de G. 1998. Perspectives in the use of nematophagous fungi in the control of gastro-intestinal nematodes in the livestock industry in Mexico. FAO. Animal Producction and Halth. Paper: 141: 83-85

Morgan, M., Behnke, M., Lucas, J and Peberdy, J. 1997. in vitro assessment of the influence of nutrition, temperature and larval density on trapping of the infective larve of *Heligmosomoides polygyrrus* by *Arthorobotrys oligospora*, *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium megalosporum*. Parasitology, 115, 303-310

Nansen, P. Larsen, M. Gronvold, J. Wolstrup. J. Zorn, A. Henriksen, SA. 1995. Prevention of clinical trichostrongylidosis in claves by strategic feeding with the predacious fungus *Duddingtonia flagrans*. Parasitol. Res. 81, 371-374.

Nansen, P. Larsen, M. Roepstorff, A. Gronvold, J. Wolstrup, J. Henriksen, S.A. 1996. Control of *Oesophagostomum dentatum* and *Hyostrongylus rubidus* in outdoor-reared pig by daily feeding with the microfungus *Duddingtonia flagrans*. Parasitology Research. 82(7) 580-584.

Knox, M and Fardo, M. 2001. Biological control of field infections of nematode parasites of young sheep with *Duddingtonia flagrans* and effects of spore intake on efficacy. Vet. Parasitology 101; 155-160.

Niezen, J. Charleston, W. Hodgson, J. Mackay, A. Leathwick, D. 1996. Controlling internal parasite in grazing ruminants without the recourse to anthelmintics: approaches experience and prospects. Int J. Parasitol 26:983-992.

Padilha, T. 1998 Studies on nematophagous fungi to reduce pasture infectivity with free living stage of trichostrongylid nematodes. FAO Animal Production and Health Paper:141:43 6.

Padilha,T. 1999. Biological Control. International Journal for Parasitology 29:153-155.

Peña, M. Miller, j. Fontenot, M. Gillespie, A. and Larsen, M. 2002. Evaluation of *Duddingtonia flagrans* in reducing infective larvae of *Haemonchus contortus* in feces of sheep. Veterinary Parasitology 103; 259-265.

Persmark, L. Banck, A, Andersson,S and Jansson, H. 1992 Evaluation of methods for extraction of nematodes and endoparasitic fungi from soil. Nematologica 338; 520-530

Persmark, L. Banck, A. and Jansson, H. 1996. Population dynamics off nematophagous fungi and nematodes in an arable soil: vertical and seasonal fluctuations. Soil biology Biochemistry. 28,1005-1014.

Roel, A. Carmello, A. And Moraes, G. 1977. Influencia da cor do sostrato na oviposicao. Ecosistema 2(2):28-30

Rubner, A. 1996. Revision of predacious hyphomycetes in the *Dactylella-Monacrosporium* complex. Studies in Mycology, No.39, 41-104pp.

Waller, J. and Faedo, M. 1996. The prevalence of nematode parasites of livestock. Int. J. Parasitol. 26:915-925

Waller, P.J. 1990. Resisstance in nematode parasites of livestock to the benzimidazole anthelmintics. Parasitology Today 6, 127-1129.

Waller, P.J. 1993. Nematophagous fungi: prospective biological control aagents of animal parasitic nematodes Parasitology Today 9, 429-431.

Waller, Pj. 1997. Anthelmintic Resistance. Vet. Parasitol. 72:391-412

Waller, P.J. 1998 Parasite epidemiology resistence and the prospect for implementation of alternative control programs. FAO Animal Production and Health Paper :141:1 10

Waller, P. Larsen, M. Faedo, M. and Hennessy, D. 1994. The potential of nematophagous fungi to control the free living stages of nematode parasites of sheep : in vitro and in vivo studies . Vet. Parasitol. 51: 289-299.

Waller, P. Faedo, M. and Ellis, K. 2001. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: towards the development of a fungal controlled release device. Vet. Parasitol. 102: 299-308.

Waller, P. Knox, M and Faedo, M. 2001. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: feeding and block studies with *Duddingtonia flagrans*. Vet. Parasitol. 102: 321-330.

Williams,J. 1997. Anthelmintic treatment strategies: current status and future. Vet. Parasitol 72:461-477

Wolstrup, J. Nansen, P. Gronvold. J. Henriksen, SA. And Larsen, M. 1996. **Toward practical biological control of parasitic nematodes in domestic animals. 28(2):129-132.**

Yeates, G. 2000. Progress in the application of nematophagous fungi. Australasian Association of Nematologists. 6 pp.