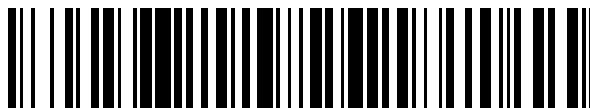


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 486 166**

21 Número de solicitud: 201330195

51 Int. Cl.:

C12N 1/14 (2006.01)

A01N 63/04 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

14.02.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

14.08.2014

Fecha de la concesión:

25.03.2015

45 Fecha de publicación de la concesión:

01.04.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (100.0%)
Edificio EMPRENDIA-Campus Vida
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES**

72 Inventor/es:

**SÁNCHEZ-ANDRADE FERNÁNDEZ, Rita;
ARIAS VÁZQUEZ, María Sol y
PAZ SILVA, Adolfo**

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

54 Título: **HONGOS COMO AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO**

57 Resumen:

Hongos como agentes de control biológico.

La invención versa sobre el uso de hongos o formas reproductivas de los mismos, preferentemente de las especies *Mucor circinelloides* y *Duddingtonia flagrans*, como agentes de control biológico sobre las diferentes formas viables de parásitos capaces de infectar a animales domésticos y ganado. El agente de control biológico descrito en la presente invención se puede administrar en forma de aditivo para alimentación animal y/o de composición parasitocida bien sobre el propio animal, y/o sobre sus heces, y/o sobre el entorno donde se encuentra. Otro objeto descrito en la invención hace referencia a un método de prevención de la transmisión de enfermedades parasitarias en animales domésticos y ganado, mediante el tratamiento de dichos animales, o de sus heces, o de su entorno, con los hongos o formas reproductivas de los mismos, o con el agente de control biológico descrito en la invención.

ES 2 486 166 B2

DESCRIPCIÓN

Hongos como agentes de control biológico

CAMPO DE LA INVENCION

5 La invención versa sobre el uso de hongos filamentosos, preferentemente del género *Mucor* y más preferentemente de la especie *M. circinelloides*, solos o en combinación con otras especies de hongos, preferentemente del género *Duddingtonia*, preferentemente *D. flagrans*, como parasitoides frente a organismos tales como cestodos, trematodos y nematodos, en animales de compañía y ganado.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA

Algunos parásitos que afectan tanto a animales como a personas tienen estadios de vida libre que se desarrollan en el suelo. En el ser humano, la infección se suele producir por la
15 ingesta de alimentos contaminados, o accidentalmente por la ingestión de tierra, arena, etc. que contiene huevos de parásitos, como por ejemplo, los ascáridos. Por el contrario, los animales se infectan con frecuencia durante el pastoreo, mediante la ingestión de huevos que contienen larvas en su interior (ascáridos, tricúridos), metacercarias (trematodos), quistes (cestodos) o larvas (nematodos gastrointestinales y pulmonares). Estas infecciones
20 pueden causar graves alteraciones, tales como diarrea, trastornos de la digestión, infertilidad, pérdida de peso, y muerte, a las que habría que añadir importantes pérdidas económicas. La administración a dichos animales infectados de tratamientos basados en bencimidazoles, lactonas macrocíclicas o sales de pirantel, sólo consigue reducir la carga de formas parasitarias que se encuentra en el hospedador definitivo, por lo que las
25 posibilidades de reinfección con fases infectivas que se encuentran en el suelo son elevadas. Otro de los inconvenientes que surgen de la utilización de fármacos antiparasitarios es el riesgo de aparición de residuos de productos químicos en alimentos de origen animal. Debido a su metabolización y eliminación a través de las heces, también pueden resultar perjudiciales para algunos insectos coprófagos, lo que afecta a la
30 degradación del estiércol y de este modo a la fertilización del suelo.

Por otro lado, en las explotaciones de ganado porcino no es frecuente el almacenamiento de las heces de los animales en un estercolero para su fermentación, por lo que no se produce la destrucción de los posibles agentes patógenos, especialmente no se lleva a cabo la
35 destrucción de los huevos de los mismos. En dichas explotaciones, la materia fecal es

almacenada temporalmente en balsas, y su contenido es vaciado conforme se van llenando. De este modo, se facilita el esparcimiento de estadios parasitarios viables, que contaminan el suelo, el agua, etc.. Una aplicación muy habitual de la materia fecal obtenida en las explotaciones de ganado porcino, es su utilización como abono o fertilizante para pastos, frutales, huertas, etc., constituyendo un vehículo idóneo para la diseminación de formas parasitarias (huevos) viables, suponiendo un riesgo para la seguridad de los propios cultivos, del ganado que pueda pastar en los pastos abonados con dicha materia fecal, así como del propio ser humano, por la facilidad que existe para entrar en contacto con los parásitos presentes en dichos suelos contaminados y que son responsables de zoonosis.

Entre las posibilidades más recientes para la desparasitación de ganado, sin necesidad de utilizar fármacos, se han utilizado diferentes pautas de control biológico. El control biológico comprende el uso de enemigos naturales de los parásitos, principalmente hongos o esporas de hongos denominados saprófitos o depredadores, los más conocidos son *Arthrobotrys*, *Oligospora* o *Duddingtonia*, también denominados *atrapa-nematodos* o nematófagos (Larsen, M. Parasitology.2000, 120: S121-S131; Gómez-Rincón, C., Uriarte, J., Valderrábano, J. Vet Parasitol. 2006, 141: 84-90). El concepto de control biológico va dirigido, por tanto, a la profilaxis o prevención de las infecciones parasitarias, y su aplicación se fundamenta en el uso de microorganismos que puedan actuar en las fases de vida libre de dichos parásitos. Dichos hongos se desarrollan en presencia de parásitos en el suelo y son capaces de destruirlos para asegurarse el aporte necesario de energía y nitrógeno. Estos hongos son microscópicos y no desarrollan cuerpos fructíferos, pero tienen una forma de crecimiento que se asemeja a un moho. Los hongos depredadores son especiales habiendo desarrollado órganos que son capaces de capturar y eliminar pequeños nematodos, incluyendo las larvas infectivas de los nematodos. Los hongos depredadores son originalmente hongos telúricos, pero se ha descubierto que también pueden crecer en boñigas de vaca. Es precisamente aquí donde su efecto beneficioso se debería utilizar para eliminar un gran número de larvas infectivas de gusanos intestinales parásitos. Aunque se ha asociado el desarrollo de hongos larvicidas a la presencia de un conjunto de sustancias (nemina) en el tegumento de las larvas de nematodos, no se han esclarecido los mecanismos que determinan su objetivo, de modo que para ello se realizan ensayos en los que se pone en contacto la especie fúngica y diferentes estadios parasitarios (ooquistes, huevos, larvas). Existe una sospecha con bastante fundamento de que algunos hongos larvicidas desarrollan una serie de estructuras como trampas (*Duddingtonia*), extremos adhesivos, anillos constrictores (*Arthrobotrys*)..., con los que atrapan las larvas. Además, dichos hongos están provistos de unas hifas denominadas apresoria cuyo extremo o

haustorio penetra en las larvas y se nutre a partir de ellas. Se desconoce cómo algunos hongos (*Pochonia*) son capaces de penetrar la cubierta de huevos de parásitos, que en particular en los ascáridos es muy fuerte debido a su composición trilaminar a base de quitina y mucopolisacáridos (Lýsek H, Stěrba J. Folia Parasitol (Praha). 1991;38(3):255-9).

- 5 Algunas de las hipótesis apuntan a la presencia de haustorio, junto a la liberación de algunos enzimas (Lýsek H, Krajčí D. Folia Parasitol (Praha). 1987;(34): 57-60).

Para utilizar los hongos depredadores en la práctica es necesario seleccionar especies fúngicas que puedan pasar a través del tracto intestinal del ganado vivo y de ese modo ser
10 también útiles en el control biológico. De todos los hongos aislados, el candidato ideal hasta ahora es el hongo de la especie *D. flagrans* que, aparte de ser un predador altamente eficiente basándose en la formación de redes tridimensionales, produce abundante cantidad de esporas de resistencia (clamidosporas) que soportan el paso a través del tracto gastrointestinal de los animales. Esto permite que el hongo pueda ser dosificado en forma
15 sencilla y ser administrado a los animales, para luego aparecer en las heces y allí ejercer su acción predatora sobre las larvas de los parásitos. En este sentido, la patente EP0603315 divulga el uso de hongos nematófagos, específicamente hongos de la especie *D. flagrans*, para el control de nematodos parásitos en ganado bovino, ovino, porcino y equino. Dicha patente divulga también un método para reducir la población de nematodos parásitos en las
20 heces de dichos animales mediante la administración del hongo *D. flagrans* bien en forma de aditivo en su alimentación o, bien directamente en forma de agente para el control biológico de los nematodos parásitos sobre las heces de dichos animales. Adicionalmente, dicha patente divulga un aditivo para alimentación animal y un agente de control biológico, comprendiendo ambos el hongo *D. flagrans*. Por lo tanto, queda demostrado que *D. flagrans*
25 es altamente eficaz para reducir el número de larvas en la materia fecal y, como consecuencia, en los pastos donde se alimentan los animales. También en la solicitud de patente WO88/06407 se divulga un método para reducir el número de nematodos parásitos en animales domésticos (cerdos, perros, gatos, caballos, ovejas, cabras, vacas, etc) y un método para reducir su transmisión mediante la administración a dichos animales de una
30 composición que comprende un hongo hematófago que pertenece a las especies *Arthrobotrys spp.* o *Dactylaria spp.* Dicha composición parasitocida es capaz de seguir ejerciendo su actividad nematófaga después de pasar por el tracto gastrointestinal de los animales infectados, siendo por tanto útil y, ejerciendo su capacidad nematófaga, incluso en las heces de dichos animales. Sin embargo, dichas especies fúngicas con actividad
35 parasitocida y capaces de atravesar el tracto intestinal de los animales poseen únicamente

actividad sobre las larvas de los nematodos, pero no sobre otras formas infectivas tales como los huevos de cestodos y trematodos.

Puesto que este tipo de parásitos helmintos (cestodos, trematodos y nematodos), en todas sus formas infectivas, quistes, larvas y huevos, ocasionan grandes pérdidas a los granjeros, es de gran interés para éstos controlar su crecimiento y expansión. Por ello, resulta necesario encontrar métodos alternativos para combatir las distintas formas infectivas de los diferentes parásitos que infectan a los animales domésticos y al ganado. Dichos métodos deben tener un amplio espectro de acción parasitocida que permita adaptarse a las condiciones naturales en las que tienen lugar las infecciones parasitarias mixtas, debiendo tener actividad tanto sobre los distintos tipos de parásitos que afectan al ganado como sobre las distintas formas infectivas de los mismos.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Breve descripción de la invención

La presente invención describe un agente de control biológico que comprende al menos un hongo o una forma reproductiva del mismo, de la especie *M. circinelloides*, siendo preferida la cepa *M. circinelloides* CECT 20824. Dicho agente de control biológico puede comprender además otras especies de hongos o formas reproductivas de los mismos y así potenciar su acción parasitocida, siendo preferidas las especies de hongos pertenecientes a *Duddingtonia flagrans*, también conocida como *Arthrobotrys flagrans*, preferentemente la cepa *D. flagrans* CECT 20823. Cabe destacar que también, el agente de control biológico que comprende los hongos o formas reproductivas de los mismos, mencionados previamente, solos o en combinación, puede combinarse con otras especies de hongos parasitocidas o formas reproductivas de los mismos, pertenecientes a los géneros seleccionados de entre cualquiera de los siguientes: *Trichoderma*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Arthrobotrys*, *Pochonia* y/o cualquiera de sus combinaciones. Cabe destacar que los hongos o las formas reproductivas de los mismos, que comprenden el agente de control biológico descrito en la presente invención se utilizan en forma de esporas vivas o viables.

El término "*Mucor*", tal y como se usa en la presente descripción, se refiere a un género de hongo zigomiceto identificado en la base de datos de NCBI por el Taxonomy ID: 4830. El término "*Mucor circinelloides*", tal y como se usa en la presente descripción, se refiere a una

especie de hongo zigomiceto identificado en la base de datos de NCBI por el Taxonomy ID: 36080.

5 El término “Duddingtonia flagrans”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a una especie de hongo ascomiceto identificado en la base de datos de NCBI por el Taxonomy ID: 47257 o 97331.

10 El término “Trichoderma”, tal y como se usa en la presente descripción, se refiere a un género de hongo zigomiceto identificado en la base de datos de NCBI por el Taxonomy ID: 5543.

El término “Fusarium”, tal y como se usa en la presente descripción, se refiere a una especie de hongo zigomiceto identificado en la base de datos de NCBI por el Taxonomy ID: 5506.

15 El término “Verticillium”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a un género de hongos ascomicetos identificado en la base de datos de NCBI por los Taxonomy ID: 5106, 264599 y 1036719.

20 El término “Arthrobotrys”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a un género de hongos ascomicetos identificado en la base de datos de NCBI por el Taxonomy ID: 13348.

25 El término “Pochonia”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a un género de hongo ascomiceto identificado en la base de datos de NCBI por el Taxonomy ID: 243023.

30 El término “agente de control biológico” se refiere a aquéllas composiciones que comprenden en su interior microorganismos, partes de los mismos, en particular, formas reproductivas de dichos microorganismos, sus metabolitos o sus subproductos, que presentan actividad natural o adquirida en reducir o eliminar los efectos dañinos o adversos de parásitos y/o patógenos, ya que pueden actuar sobre las fases de vida libre de los mismos. A efectos de la presente invención los agentes de control biológicos aquí descritos comprenden hongos y/o formas reproductivas de los mismos, como por ejemplo, esporas vivas o viables, de hongos denominados saprófitos o depredadores. Los hongos y/o formas reproductivas de los mismos, preferidas descritas en la presente invención pertenecen a las

35

especies *M. circinelloides* y *D. flagrans*, preferentemente, las cepas *M. circinelloides* CECT 20824 y *D. flagrans* CECT 20823, respectivamente.

El agente de control biológico descrito en la presente invención se caracteriza por que puede tomar la forma de aditivo para alimentación animal, tanto para aplicarlo junto con el pienso o incluso sobre agua, o la de composición parasitocida. Dicho agente de control biológico es capaz de disminuir la carga parasitaria presente en las heces de los animales y de evitar la propagación de las larvas incluidas en los huevos que son excretados junto con las heces, por tanto previniendo la infección de los animales. En una realización preferida, el agente de control biológico es un aditivo para alimentación animal. En una realización más preferida, el aditivo se añade a un pienso o concentrado alimenticio destinado a la alimentación animal, preferiblemente durante el propio proceso de fabricación industrial del concentrado o pienso, y más preferiblemente durante la fase de mezcla de las materias primas que constituyen la base del pienso o concentrado alimenticio. En otra realización preferida, el agente de control biológico es una composición parasitocida. El agente de control biológico, en forma de composición parasitocida, puede administrarse vía oral a los propios animales, y/o bien sobre las heces de los mismos y/o incluso sobre el propio pasto, prado o lugar donde viven. La composición parasitocida descrita en la invención, puede comprender además vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.

A efectos de la presente invención, el término "forma reproductiva" en relación a los hongos, hace referencia a cualquier elemento de propagación sexual o asexual del hongo, y preferentemente a las esporas. Las esporas se forman como diferenciación del micelio de los hongos y son estructuras rodeadas de una gruesa cubierta protectora que se producen para asegurar la supervivencia en su forma viable (vivas de los hongos). En la presente invención, el término esporas incluye clamidiosporas, esporangiosporas, conidiosporas, oosporas, zigosporas, ascosporas, basidiosporas, o cualquier otro tipo de espora conocido por el experto medio en la materia.

El término "aditivo alimentario", "aditivo alimenticio" o "aditivo para alimentación animal", a efectos de la presente invención, se refiere a una composición destinada a ser ingerida junto con la bebida y/o con la dieta normal del animal, en particular mezclado con el pienso o concentrado alimenticio que se administra al animal, y más preferiblemente mezclado durante el proceso de fabricación del mismo, y tiene como finalidad, aunque sin limitarse, una influencia positiva en las repercusiones medioambientales de la producción animal, en la producción, la actividad o el bienestar de los animales, o en las características de los

productos animales, entre otros. Más preferiblemente, el aditivo descrito en la presente invención tiene como finalidad la reducción de la carga parasitaria o cantidad de formas parasitarias viables en las heces del animal y la prevención de la transmisión de enfermedades parasitarias en animales. En una realización preferida, el aditivo para alimentación animal se añade durante la fase de mezcla de las materias primas que constituyen la base del pienso o concentrado alimenticio destinado a la alimentación animal, durante el propio proceso de fabricación industrial del concentrado o pienso. En la presente invención, una forma de añadir el aditivo al pienso o concentrado alimenticio del animal, es, por ejemplo, mediante la producción de esporas del hongo con actividad parasitocida en un medio de cultivo, preferiblemente líquido, y su posterior incorporación al pienso de elaboración industrial en cualquiera de sus posibles presentaciones, incluyendo harina, granulado y multipartículas, durante la fase de mezcla de las materias primas que constituyen la base del pienso o concentrado. Para ello, se prepara un medio de cultivo, preferentemente líquido, que comprenda una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y una o varias sales minerales, entre otros posibles componentes. Después de esterilización en autoclave y posterior enfriamiento, se añade un inóculo del hongo parasitocida que se desea hacer crecer y se mantiene en condiciones de luz y de temperatura adecuadas para el crecimiento del hongo y la producción de esporas, por ejemplo en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente (18-20°C) durante preferentemente 20 días. Transcurrido el periodo de incubación, se recogen muestras y se determina la concentración de esporas de cada preparado fúngico, por ejemplo en una cámara Neubauer, para calcular la concentración de esporas/L de medio de cultivo, y por tanto para calcular la concentración final de esporas/kg que contendrá el pienso. A continuación, los contenedores o bidones que contienen las esporas de hongos parasitocidas se añaden al concentrado alimentario o pienso durante la fase de mezcla de las diferentes materias primas. Para ello, se pueden emplear concentrados alimentarios tales como harina, granulado o multipartículas. Ejemplos de dichos concentrados son los productos DL Novillas 18® (harina y granulado), Pro-Horse Club® (granulado) y Pro-Horse Eco Mix® (multipartículas).

Por ello, en otro aspecto, la invención se refiere a un pienso o concentrado alimenticio para alimentación animal que comprende al aditivo previamente descrito.

El término “composición parasitocida”, a efectos de la presente invención se refiere a una composición capaz de administrarse por vía oral a los propios animales y/o sobre sus heces y/o sobre el pasto, prado o lugar donde habitan o se encuentren. Dicha composición parasitocida tienen la finalidad, pero sin limitarse, de prevenir la transmisión de

enfermedades parasitarias y/o reducir la carga de parásitos presentes en heces y/o pastos, gracias a la reducción de la carga parasitaria o cantidad de formas parasitarias viables en las heces del animal y en el pasto, prado o lugar donde habitan dichos animales.

- 5 Debe entenderse que el agente de control biológico descrito en la presente invención, bien en forma de aditivo o en forma de composición parasiticida, se presentan en una forma aceptable farmacéuticamente para ser administrada a un individuo de forma directa, preferentemente mediante administración oral, o por cualquier otra vía, aunque la vía preferida de administración a un individuo es la vía oral. La composición parasiticida como
- 10 se ha mencionado previamente, también puede administrarse sobre las heces de los propios sujetos, preferentemente animales mamíferos, o sobre el suelo en el que pastan los animales.

- Un “vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable” se refiere a aquellas sustancias, o
- 15 combinación de sustancias, conocidas en el sector farmacéutico, utilizadas en la elaboración de formas farmacéuticas de administración e incluye, pero sin limitarse, sólidos, líquidos, disolventes o tensioactivos. Dichas sustancias deben estar aprobadas por una agencia reguladora del gobierno federal o un gobierno estatal o enumerado en la Farmacopea Estadounidense o la Farmacopea Europea, u otra farmacopea reconocida generalmente
- 20 para su uso en animales, y más concretamente en humanos. De la misma manera, los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados variarán dependiendo de la forma de dosificación particular seleccionada. Los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen los siguientes tipos de excipientes, sin excluir otros conocidos en el estado de la técnica: diluyentes, cargas, aglutinantes, disgregantes, lubricantes, deslizantes,
- 25 agentes de granulación, agentes de recubrimiento, agentes hidratantes, disolventes, co-disolventes, agentes de suspensión, emulsionantes, edulcorantes, aromatizantes, agentes para enmascarar el sabor, agentes colorantes, agentes contra la formación de tortas, humectantes, agentes quelantes, plastificantes, agentes para aumentar la viscosidad, antioxidantes, conservantes, estabilizantes, tensioactivos y agentes tamponantes. El
- 30 especialista en la técnica apreciará que ciertos excipientes farmacéuticamente aceptables pueden realizar más de una función y pueden realizar funciones alternativas dependiendo de la cantidad de excipiente que esté presente en la formulación y de qué otros ingredientes estén presentes en la formulación. Los especialistas tienen el conocimiento y habilidad en la técnica que les permite seleccionar excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados
- 35 en las cantidades apropiadas para uso en la invención. Además, hay varios recursos disponibles para el especialista en la técnica que describen excipientes farmacéuticamente

aceptables y pueden ser útiles en la selección de excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados. Los ejemplos incluyen Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company), The Handbook of Pharmaceutical Additives (Gower Publishing Limited), y The Handbook of Pharmaceutical Excipients (the American Pharmaceutical Association and the
5 Pharmaceutical Press).

En el contexto de la presente invención, la enfermedad parasitaria es preferentemente una enfermedad infecciosa causada por las formas viables, preferentemente huevos y larvas, de parásitos helmintos, preferentemente seleccionados de entre cualquiera de los siguientes:
10 cestodos, trematodos, nematodos y/o cualquiera de sus combinaciones. La acción parasitocida ejercida por el agente de control biológico descrito en la presente invención, que comprende el hongo *M. circinelloides* CECT 20824, sólo o en combinación con otros hongos parasitocidas, descritos anteriormente, ejerce su acción parasitocida sobre sujetos o individuos que son preferentemente animales mamíferos y más preferentemente, perros,
15 gatos, bóvidos, óvidos, suidos y équidos.

Tal como se utiliza en la invención, el término "perro" hace referencia a un mamífero carnívoro doméstico de la familia de los cánidos, y en particular a la subespecie *Canis lupus familiaris*. Tal como se utiliza en la invención, el término "gato" hace referencia a un pequeño
20 mamífero carnívoro de la familia Felidae, y en particular al gato doméstico (*Felis silvestris catus*). Tal como se utiliza en la invención, el término "bóvido" hace referencia a un animal de la familia Bovidae, compuesta por mamíferos rumiantes, con cuernos óseos cubiertos por estuche córneo, no caedizos, y que existen tanto en el macho como en la hembra. El término bóvido incluye los toros, las vacas, los antílopes, las ovejas, los carneros, las cabras
25 así como otros animales semejantes. La familia Bovidae incluye a su vez a la subfamilia Bovinae (también denominada de forma genérica "ganado bovino"), en la que se incluyen los bovinos con joroba como el cebú (*Bos indicus*) y sin joroba como el toro o la vaca (*Bos taurus*), así como el yak (*Poephagus grunniens*), el mithan (*Bibos frontalis*), el banteng (*Bibos banteng*), el búfalo (*Bos bubalus bubalis*) y el bisonte, tanto el americano (*Bison bison*) como el europeo (*Bison bonasus*). La familia Bovidae incluye a su vez a la subfamilia Caprinae (también denominada de forma genérica "ganado caprino u ovino"), en la que se incluyen las ovejas, los carneros y los muflones (género *Ovis*, en particular, *Ovis orientalis*), las cabras (géneros *Capra* y *Oreamnos*, entre otros), y los rebecos (género *Rupicapra*), entre otros. En una realización preferida, el bóvido es una vaca o un toro. El término "óvido"
30 hace referencia a mamíferos rumiantes de la familia de los bóvidos o Bovidae, muchos de ellos cubiertos de abundante lana, que presentan cuernos de sección triangular y retorcidos

en espiral o encorvados hacia atrás, como los carneros, las cabras y los muflones. Tal y como se utiliza en la presente invención, el término “suido” hace referencia a un animal del suborden Suina, que a su vez comprende a la familia Suidae, compuesta por mamíferos artiodáctilos con hocico acabado en un morro en forma de disco, cuatro dedos en cada pata y caninos fuertes y desarrollados. El suborden Suina incluye a los cerdos domésticos (*Sus scrofa domestica*), los jabalíes (*Sus scrofa*) y sus parientes más cercanos, tales como los pecaríes americanos (género *Tayassuidae*) y los hipopótamos (género *Hippopotamidae*). En una realización preferida, el suido es el cerdo doméstico. Tal y como se utiliza en la presente invención, el término “équido” hace referencia a la familia Equidae, compuesta por mamíferos placentarios del orden Perissodactyla, que comprende al género *Equus*, y en la que se incluyen los caballos (*Equus ferus caballus*), las cebras (cebra común (*Equus quagga*), cebra de Grévy (*Equus grevyi*), cebra de montaña (*Equus zebra*), etc.) y los asnos (*Equus asinus*, *Equus africanus*, *Equus hemionus*). En una realización preferida, el équido es un caballo.

Otro objeto descrito en la presente invención se refiere al uso de al menos un hongo o a una forma reproductiva del mismo, de la especie *Mucor circinelloides* para la elaboración de un agente de control biológico, siendo preferida la cepa *M. circinelloides* CECT 20824. Alternativamente, la presente invención describe el hongo *M. circinelloides*, o a una forma reproductiva del mismo, preferentemente la cepa *M. circinelloides* CECT 20824, para su uso como agente de control biológico.

Como se ha descrito previamente, dicha cepa fúngica o la forma reproductiva de la misma, puede ser utilizada sola o en combinación con otras cepas de hongos parasitoides o sus formas reproductivas, siendo preferidas las cepas de los hongos: *D. flagrans*, preferentemente la cepa CECT 20823, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Arthrobotrys*, *Pochonia* y/o cualquiera de sus combinaciones. Dichos hongos se utilizan en forma de formas reproductivas, preferentemente esporas vivas o viables

Otro de los objetos descritos en la presente invención se refiere a una cepa fúngica cultivable denominada CECT 20824 perteneciente a la especie *M. circinelloides*.

Otro de los objetos descritos en la presente invención se refiere a una cepa fúngica cultivable denominada CECT 20823 perteneciente a la especie *D. flagrans*.

Otro de los objetos descritos en la presente invención se refiere a un cultivo biológicamente puro de los hongos *M. circinelloides* CECT 20824 o *D. flagrans* CECT 20823.

Otro de los objetos descritos en la presente invención se refiere a un método de reducción de la carga parasitaria presente en las heces de animales y en los lugares donde éstos habitan, como por ejemplo prados, pastos, etc., mediante la administración, bien a las propias heces y/o al lugar donde habitan, de una cantidad eficaz de al menos un hongo o una forma reproductiva del mismo, de la especie *M. circinelloides*, preferentemente la cepa *M. circinelloides* CECT 20824, sola o en combinación con cualquiera de las cepas o formas reproductivas de dichas cepas, descritas previamente a lo largo de la invención, o del agente de control biológico descrito previamente, bien en forma de aditivo para alimentación animal o de composición parasitocida, según se ha definido a lo largo de la presente invención.

Otro de los objetos descritos en la presente invención se refiere a un método de prevención de la transmisión de enfermedades parasitarias caracterizado por la administración a un sujeto susceptible de padecer una enfermedad parasitaria y/o a sus heces y/o al lugar en el que los animales o sujetos habitan, de una cantidad eficaz de al menos un hongo o una forma reproductiva del mismo, de la especie *M. circinelloides*, preferentemente la cepa *M. circinelloides* CECT 20824 sola o en combinación con cualquiera de las cepas o formas reproductivas de los hongos descritos previamente a lo largo de la invención, o del agente de control biológico descrito previamente, bien en forma de aditivo para alimentación animal o de composición parasitocida, según se ha definido a lo largo de la presente invención.

En una realización preferida, el método de prevención de la transmisión de enfermedades parasitarias o el método de reducción de la carga parasitaria en las heces y/o pastos, se caracteriza por que las enfermedades parasitarias son provocadas por las formas viables, preferentemente huevos y larvas, de parásitos, preferiblemente de parásitos helmintos, y más preferiblemente de parásitos helmintos seleccionados de entre cualquiera de los siguientes: cestodos, trematodos, nematodos y/o cualquiera de sus combinaciones y los sujetos son animales, preferentemente mamíferos, que se seleccionan de entre cualquiera de la lista: perros, gatos, bóvidos, óvidos, suidos y équidos.

La dosificación del propio hongo o del agente de control biológico que lo comprende, descritos en la presente invención, para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo, tolerancia,

etc, del mamífero. La administración también dependerá del tratamiento simultáneo con otros fármacos y la tolerancia de cada sujeto al fármaco administrado. Las personas expertas en la materia podrán establecer la dosis apropiada usando procedimientos estándares. Se entiende que la dosis deberá ser la cantidad efectiva del hongo o combinaciones de hongos capaces de disminuir la carga parasitaria en las heces de los animales.

El término "sujeto" o "individuo", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a animales, preferiblemente mamíferos, y más preferiblemente, perros, gatos, bóvidos, óvidos, suidos y équidos. El término "sujeto" o "individuo" no pretende ser limitativo en ningún aspecto, pudiendo ser éste de cualquier edad, sexo y condición física.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos aquí usados tienen el mismo significado a los habitualmente entendidos por una persona experta en el campo de la invención. Métodos y materiales similares o equivalentes a los aquí descritos pueden ser usados en la práctica de la presente invención. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes, no tienen carácter limitativo y por lo tanto no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Por el contrario, la palabra "consiste" y sus variantes, sí que presentan carácter limitativo, refiriéndose exclusivamente a las características técnicas, aditivos, componentes o pasos que la acompañan. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención.

Es importante destacar que especies fúngicas de los géneros *Fusarium* y *Trichoderma* ya se han sugerido como potenciales agentes de control biológico, en especial de nematodos de plantas (Radwan N.A. 2012. Applied Soil Ecology, 56: 58-62; Van Dessel, P. Nematropica 41(2): 154-160) pero también recientemente en el caso de *Trichoderma* como potencial agente de control de parásitos que afectan a animales (Soto-Barrientos N., 2011. Revista de Biología Tropical, 59(1): 37-52). Sin embargo, en los ejemplos de la presente invención se demuestra que estas y otras especies fúngicas (tales como especies pertenecientes a los géneros *Gliocladium*, *Penicillium*, *Sordaria* y *Verticillium*), que *a priori* parecían buenas candidatas como agentes de control biológico de helmintos, presentan una actividad ovicida mucho menor que la demostrada para la especie *Mucor circinelloides*. Además, a pesar de que evidencias anteriores indicaban 30°C como el límite para observar desarrollo de este hongo (de Hoog *et al.*, 2000. Atlas of Clinical Fungi, 2nd ed, vol. 1. Centraalbureau voor

Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands), la presente invención demuestra por primera vez la resistencia de las esporas de esta especie a las elevadas temperaturas que se producen durante el proceso de fabricación de los piensos, así como su capacidad para atravesar el tracto digestivo de los animales manteniendo su viabilidad y actividad parasitocida. Todo ello demuestra por primera vez la posibilidad de la adición a nivel industrial de esporas de *M. circinelloides* a piensos comerciales y su idoneidad como aditivo para alimentación animal, entre otras posibles aplicaciones.

Adicionalmente, es conocido que algunas cepas de hongos nematófagos, como por ejemplo cepas de *Trichoderma* inhiben el crecimiento de otras cepas nematófagas, como por ejemplo *Fusarium* (Hernández Mansilla AA, Sierra Peña A, Carr Pérez A. Fitosanidad (Cuba) 10: 105-108). En la presente invención se demuestra por primera vez que cepas de *M. circinelloides* CECT 20824 y *D. flagrans* CECT 20823 pueden crecer juntas, manteniendo ambas tanto su viabilidad como su actividad parasitocida sobre diferentes estadios parasitarios que se pueden encontrar en el suelo.

Descripción de las figuras.

Figura 1. Fotografía que muestra la actividad parasitocida de diferentes hongos nematófagos (*Mucor*, *Gliocladium*, *Trichoderma* y *Duddingtonia*) sobre diferentes formas viables parasitarias (ooquistes, huevos y larvas).

Figura 2. Actividad parasitocida-ovicida de diferentes concentraciones de esporas de los hongos *Mucor* (barras gris claro) y *Trichoderma* (barras gris oscuro) sobre huevos del nematodo parásito *Parascaris equorum*. Las concentraciones de hongos utilizadas son D1: 0.025×10^6 , D2: 0.05×10^6 , D3: 0.1×10^6 , D4: 0.2×10^6 y D5: 0.4×10^6 / 5 g heces. En el eje X se muestra la concentración de esporas de cada hongo y en el eje Y el porcentaje de reducción de la viabilidad de los huevos del nematodo parásito *Parascaris equorum*.

Figura 3. Actividad parasitocida-ovicida de diferentes concentraciones de esporas de los hongos *Mucor* (barras gris claro) y *Trichoderma* (barras gris oscuro) sobre huevos del parásito *Trichuris spp.* Las concentraciones de hongos utilizadas son D1: 0.025×10^6 , D2: 0.05×10^6 , D3: 0.1×10^6 , D4: 0.2×10^6 y D5: 0.4×10^6 / 5 g heces. En el eje X se muestra la concentración de esporas de cada hongo y en el eje Y el porcentaje de reducción de la viabilidad de los huevos del parásito *Trichuris spp.*

Figura 4. Actividad parasitocida-ovicida después de la adición de diferentes concentraciones de esporas de *Mucor* sobre huevos del parásito *Calicophoron daubneyi*. Las concentraciones de hongos utilizadas son D1: 0.025×10^6 (línea con rombos), D2: 0.05×10^6

(línea con cuadrados), D3: 0.1×10^6 (línea con triángulos), D4: 0.2×10^6 (línea con cruces) y D5: 0.4×10^6 (línea con asteriscos) / 5 g. heces. En el eje X se muestran el número de días post-adición de las esporas y en el eje Y el porcentaje de reducción de la viabilidad de los huevos del parásito *Calicophoron daubneyi*.

- 5 **Figura 5.** Actividad parasitocida sobre huevos de parásitos estrongilados/gramo de heces, de esporas de *D. flagrans*. La gráfica muestra un grupo de animales tratado con ivermectina (línea discontinua), un grupo de animales tratado con ivermectina y mantenidos en pastoreo en el área donde se han vertido las esporas de *D. flagrans* (línea continua con cuadrados) y un tercer grupo control (Testigo) que no fue tratado (línea continua). En el eje X se muestran el número de semanas transcurridas desde el vertido de las esporas al área de pastoreo y en el eje Y los huevos estrongilados/gramo de heces.

Figura 6. Fotografía de microscopía electrónica en la que se muestra la resistencia de las esporas de *Duddingtonia* a tratamiento térmico elevado (72°C) durante diferentes periodos de tiempo.

- 15 **Figura 7.** Actividad parasitocida sobre huevos de parásitos estrongilados de esporas de *D. flagrans* (2×10^6 esporas/animal) mezcladas con concentrado alimenticio (pienso) frente a la prevención de la reinfección de las especies equinas: cebra (línea continua con triángulos), burro doméstico (línea continua) y burro africano (línea discontinua con círculos). En el eje X se muestra el tiempo expresado en meses y en el eje Y los huevos estrongilados/gramo de heces.

Figura 8. Fotografía dónde se observa que las especies de hongos *Mucor* y *Duddingtonia* pueden crecer juntas.

- Figura 9.** Actividad parasitocida de la combinación de *Mucor* + *Duddingtonia* administrada junto con el pienso en una cabaña equina. A dichos animales se les administró también un antihelmíntico (ivermectina). La línea continua representa el grupo de animales tratado con 2,5 Kg de pienso con esporas/caballo/día y la línea discontinua representa el grupo de animales control que fue tratado con 2,5 Kg de pienso sin esporas/caballo/día (Testigo). En el eje X se muestra el tiempo expresado en días y en el eje Y se muestra los huevos de estrongilados/gramo de heces.

Descripción detallada de la invención

El primer objeto de la presente invención se refiere a un agente de control biológico que comprende al menos un hongo o a una forma reproductiva del mismo, perteneciente a la especie *M. circinelloides*, siendo preferida la cepa *M. circinelloides* CECT 20824.

En una realización preferida, el agente de control biológico se caracteriza por que además comprende al menos otro hongo o una forma reproductiva del mismo, perteneciente a la especie *D. flagrans*, siendo preferida la cepa *D. flagrans* CECET 20823.

- 5 En otra realización preferida, el agente de control biológico se caracteriza por que además comprende al menos otro hongo o una forma reproductiva del mismo, perteneciente a un género seleccionado de entre cualquiera de los siguientes: *Trichoderma*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Arthrobotrys*, *Pochonia* y/o cualquiera de sus combinaciones.
- 10 En otra realización preferida, el agente de control biológico se caracteriza por que puede comprender o se administra junto con otros componentes tales como excipientes y aditivos como vitaminas, aminoácidos, olíoelementos, ligantes, etc.

- En otra realización preferida, el agente de control biológico se caracteriza por que puede
- 15 tomar la forma de aditivo para alimentación animal o de composición parasitocida. En una realización preferida, el agente de control biológico es un aditivo para alimentación animal.

- En una realización más preferida, el aditivo para alimentación animal se añade a un pienso o concentrado alimenticio destinado a la alimentación animal, preferiblemente durante el
- 20 propio proceso de fabricación industrial del concentrado o pienso, y más preferiblemente durante la fase de mezcla de las materias primas que constituyen la base del pienso o concentrado alimenticio. En otra realización preferida, el agente de control biológico, ya sea en forma de aditivo o de composición parasitocida, se caracteriza por que se administra oralmente.

- 25 En otra realización preferida, el agente de control biológico es una composición parasitocida. En otra realización preferida, la composición parasitocida se administra, adicional o alternativamente a la administración oral, sobre las heces de los animales y/o sobre el suelo donde habitan o se localizan dichos animales.

- 30 En otra realización preferida, el agente de control biológico se caracteriza por que la forma reproductiva que se utiliza son esporas, las cuales se encuentran viables (vivas).

- En otra realización preferida, el agente de control biológico se caracteriza por que el hongo
- 35 es capaz de atravesar el tracto digestivo del animal al que se administra, sobrevivir en las

heces del animal, y ejercer su acción en las mismas reduciendo la cantidad de parásitos en las heces.

5 En otra realización preferida, el agente de control biológico se caracteriza por que la reducción de la cantidad de parásitos en las heces es de al menos un 50%, preferentemente es de al menos un 60%, más preferentemente es de al menos un 66% y de forma más preferida, es de al menos un 75%.

10 En otra realización preferida, el agente de control biológico se caracteriza por que el control biológico es ejercido frente a las formas viables de parásitos, preferentemente de parásitos helmintos, y más preferentemente de parásitos helmintos seleccionados de entre cualquiera de los siguientes: nematodos, trematodos, cestodos y/o cualquiera de sus combinaciones.

15 En otra realización preferida, el agente de control biológico se caracteriza por que el control biológico es ejercido en animales seleccionados en entre cualquiera de la lista: perros, gatos, bóvidos, óvidos, suidos y équidos.

20 El segundo objeto descrito en la presente invención se refiere al uso de al menos un hongo o una forma reproductiva del mismo perteneciente a la especie *Mucor circinelloides* para la elaboración de un agente de control biológico, siendo preferida la cepa *M. circinelloides* CECT 20824. Alternativamente, la presente invención también se refiere a un hongo o una forma reproductiva del mismo perteneciente a la especie *Mucor circinelloides* para su uso como agente de control biológico.

25 En una realización preferida del primer uso de la invención, éste se caracteriza por que además comprende el uso de al menos otro hongo o una forma reproductiva del mismo perteneciente a la especie *Duddingtonia flagrans*, siendo preferida la cepa *D. flagrans* CECT 20823.

30 En otra realización preferida del primer uso de la invención, éste se caracteriza por que además comprende al menos otro hongo o una forma reproductiva del mismo perteneciente a un género seleccionado de entre cualquiera de los siguientes: *Trichoderma*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Arthrobotrys*, *Pochonia* y/o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización preferida del primer uso de la invención, éste se caracteriza por que el agente de control biológico puede comprender o se administra junto con otros componentes tales como excipientes y aditivos como vitaminas, aminoácidos, oligoelementos, ligantes, etc.

5 En otra realización preferida del primer uso de la invención, éste se caracteriza por que el agente de control biológico es un aditivo para alimentación animal. En otra realización preferida del primer uso de la invención, éste se caracteriza por que el agente de control biológico es una composición parasitocida.

10 En otra realización preferida del primer uso de la invención, éste se caracteriza por que el agente de control biológico, ya sea en forma de aditivo para alimentación animal o en forma de composición parasitocida, se administra oralmente.

En otra realización preferida del primer uso de la invención, éste se caracteriza por que el
15 agente de control biológico en forma de composición parasitocida se administra adicional o alternativamente a la administración oral, sobre las heces de los animales y/o sobre el suelo del lugar donde habitan o donde se encuentran los animales.

En otra realización preferida del primer uso de la invención, éste se caracteriza por que la
20 forma reproductiva de los hongos utilizada son esporas, estando dichas esporas vivas.

En otra realización preferida del primer uso de la invención, éste se caracteriza por que el hongo, o una forma reproductiva del mismo, es capaz de atravesar el tracto digestivo del animal al que se administra, sobrevivir en las heces del animal, y ejercer su acción en las
25 mismas reduciendo la cantidad de parásitos en las heces.

En otra realización preferida del primer uso de la invención, éste se caracteriza por que la reducción de la cantidad de parásitos en las heces es de al menos un 50%, preferentemente es de al menos un 60%, más preferentemente es de al menos un 66% y de forma más
30 preferida, es de al menos un 75%.

En otra realización preferida del primer uso de la invención, éste se caracteriza por que el control biológico es ejercido frente a las formas viables de parásitos, preferiblemente de parásitos helmintos, y más preferiblemente de parásitos helmintos seleccionados de entre
35 cualquiera de los siguientes: nematodos, trematodos, cestodos y/o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización preferida del primer uso de la invención, éste se caracteriza por que el control biológico es ejercido en animales seleccionados en entre cualquiera de la lista: perros, gatos, bóvidos, óvidos, suidos y équidos.

- 5 El tercer objeto descrito en la presente invención se refiere a una cepa fúngica CECT 20824 cultivable caracterizada por que pertenece a la especie *M. circinelloides*.

El cuarto objeto descrito en la presente invención se refiere a un cultivo biológicamente puro de la cepa fúngica *M. circinelloides* CECT 20824.

10

El quinto objeto descrito en la presente invención se refiere a una cepa fúngica CECT 20823 cultivable caracterizada por que pertenece a la especie *D. flagrans*.

15

El sexto objeto descrito en la presente invención se refiere a un cultivo biológicamente puro de la cepa fúngica *D. flagrans* CECT 20823.

20

El séptimo objeto descrito en la presente invención se refiere a un método de prevención de la transmisión de enfermedades parasitarias caracterizado por la administración a un animal susceptible de padecer una enfermedad parasitaria y/o a sus heces y/o al entorno donde se encuentra, de una cantidad eficaz de al menos un hongo o una forma reproductiva del mismo perteneciente a la especie *M. circinelloides*, preferiblemente la cepa *M. circinelloides* CECT 20824, sólo o en combinación con al menos otro hongo o una forma reproductiva del mismo, perteneciente a una de las cepas o géneros seleccionados de entre cualquiera de los siguientes: *D. flagrans*, preferentemente la cepa *D. flagrans* CECT 20823, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Arthrobotrys*, *Pochonia* y/o cualquiera de sus combinaciones; o de un agente de control biológico según se ha definido previamente.

25

30

En una realización preferida el método de prevención descrito en la invención se caracteriza por que es capaz de reducir la carga parasitaria en las heces y/o en el entorno en el que habitan o se encuentran los animales.

35

En otra realización preferida el método de prevención descrito en la invención se caracteriza por que la reducción de la cantidad de parásitos es de al menos un 50%, preferentemente es de al menos un 60%, más preferentemente es de al menos un 66% y de forma más preferida, es de al menos un 75%.

En otra realización preferida, el método de prevención descrito en la invención se caracteriza por que la prevención se lleva a cabo sobre las formas viables de parásitos, más preferiblemente de parásitos helmintos, y aún más preferiblemente de parásitos helmintos seleccionados de entre cualquiera de los siguientes: nematodos, trematodos, cestodos y/o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización preferida, el método de prevención descrito en la invención se caracteriza por que los animales se seleccionan de entre cualquiera de la lista: perros, gatos, bóvidos, óvidos, suidos y équidos.

Otro objeto descrito en la presente invención se refiere a un método de reducción de la carga parasitaria presente en las heces de animales y en el entorno en el que se encuentran, mediante la administración, bien a las heces y/o al entorno, de una cantidad eficaz de al menos un hongo o una forma reproductiva del mismo perteneciente a la especie *M. circinelloides*, preferiblemente la cepa *M. circinelloides* CECT 20824, sólo o en combinación con al menos otro hongo o una forma reproductiva del mismo perteneciente a una de las cepas o géneros seleccionados de entre cualquiera de los siguientes: *D. flagrans*, preferentemente la cepa CECT 20823, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Verticillum*, *Arthrobotrys*, *Pochonia* y/o cualquiera de sus combinaciones; o de un agente de control biológico según se ha definido a lo largo de la presente invención.

En una realización preferida, el método de reducción de la carga parasitaria descrito en la invención se caracteriza por que la reducción de la cantidad de parásitos es de al menos un 50%, preferentemente es de al menos un 60%, más preferentemente es de al menos un 66% y de forma más preferida, es de al menos un 75%.

En otra realización preferida el método de reducción de la carga parasitaria descrito en la invención se caracteriza por que la reducción de la carga parasitaria se lleva a cabo sobre las formas viables de parásitos, preferiblemente de parásitos helmintos, y más preferiblemente de parásitos helmintos seleccionados de entre cualquiera de los siguientes: nematodos, trematodos, cestodos y/o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización preferida, el método de reducción de la carga parasitaria descrito en la invención se caracteriza por que los animales se seleccionan de entre cualquiera de la lista: perros, gatos, bóvidos, óvidos, suidos y équidos.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un pienso o concentrado alimenticio para alimentación animal que comprende al aditivo para alimentación animal previamente descrito. En una realización preferida, el pienso o concentrado alimenticio se caracteriza por que puede comprender además otros componentes tales como excipientes y aditivos como

5 vitaminas, aminoácidos, oligoelementos, ligantes, etc.

En una realización preferida, el aditivo para alimentación animal descrito en la presente invención se adicional al pienso o concentrado alimenticio preferentemente durante la fase de mezclado de las materias primas que se produce durante el proceso de fabricación del mismo, y tiene como finalidad, aunque sin limitarse, una influencia positiva en las

10 repercusiones medioambientales de la producción animal, en la producción, la actividad o el bienestar de los animales, o en las características de los productos animales, entre otros. Más preferiblemente, el pienso o concentrado alimenticio descrito en la presente invención, al comprender el aditivo para alimentación animal descrito en la invención, tiene como

15 finalidad la reducción de la carga parasitaria o cantidad de formas parasitarias viables en las heces del animal y la prevención de la transmisión de enfermedades parasitarias en animales. En la presente invención, una forma de añadir el aditivo al pienso o concentrado alimenticio del animal, es, por ejemplo, mediante la producción de esporas del hongo con actividad parasitocida en un medio de cultivo, preferiblemente líquido, y su posterior

20 incorporación al pienso de elaboración industrial en cualquiera de sus posibles presentaciones, incluyendo harina, granulado y multipartículas, durante la fase de mezcla de las materias primas que constituyen la base del pienso o concentrado. Para ello, se prepara un medio de cultivo, preferentemente líquido, que comprenda una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y una o varias sales minerales, entre otros posibles componentes.

25 Después de esterilización en autoclave y posterior enfriamiento, se añade un inóculo del hongo parasitocida que se desea hacer crecer y se mantiene en condiciones de luz y de temperatura adecuadas para el crecimiento del hongo y la producción de esporas, por ejemplo en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente (18-20°C) durante 20 días. Transcurrido el periodo de incubación, se recogen muestras y se determina la concentración

30 de esporas de cada preparado fúngico, por ejemplo en una cámara Neubauer, para calcular la concentración de esporas/L de medio de cultivo, y por tanto para calcular la concentración final de esporas/kg que contendrá el pienso. A continuación, los contenedores o bidones que contienen las esporas de hongos parasitocidas se añaden al concentrado alimentario o pienso durante la fase de mezcla de las diferentes materias primas. Para ello, se pueden

35 emplear concentrados alimentarios tales como harina, granulado o multipartículas. Ejemplos

de dichos concentrados son los productos DL Novillas 18® (harina y granulado), Pro-Horse Club® (granulado) y Pro-Horse Eco Mix® (multipartículas).

Depósito de microorganismos según el tratado de Budapest

5

Los microorganismos utilizados en la presente invención fueron depositados en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) sita en el Edificio 3 CUE- Parc Científic Universitat de Valencia, Catedrático Agustín Escardino 9, 46980 Paterna (Valencia, España), con nº de depósito:

- 10 • CECT 20824: cepa fúngica de la especie *M. circinelloides* depositada el 18 de diciembre de 2012.
- CECT 20823: cepa fúngica de la especie *D. flagrans* depositada el 18 de diciembre de 2012.

15 Los ejemplos que se describen a continuación tienen como objetivo ilustrar la presente invención, pero sin limitar el alcance de la misma.

Ejemplo 1. Aislamiento de hongos parasitoides

20 El aislamiento de los hongos parasitoides utilizados en la presente invención se llevó a cabo a partir de muestras de heces de animales y de muestras del suelo de diferentes explotaciones de ganado. Se sembró aproximadamente 1 gramo de cada muestra de heces en placas Petri que contenían medio de cultivo compuesto por harina de trigo (25 g), agar (20 g), cloramfenicol (500 mg) y agua (1 L). Una vez observado el crecimiento de los

25 hongos, se procedió a hacer pases seriados en placa hasta conseguir una sola especie de hongo. De este modo se obtuvieron 13 aislados, que se identificaron siguiendo diferentes claves morfológicas como pertenecientes a los géneros: *Gliocladium*, *Duddingtonia*, *Mucor*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Verticillium*, *Penicillium*, *Sordaria* y *Arthrobotrys*. Para ello, se tuvo en cuenta si estaban provistos de columela, esporangióforo ramificado de naturaleza hialina,

30 y esporangio esférico (Weitzman I, Whittier S, McKittrich JC, Della-Latta P. 1995. J. Clin. Microbiol. 33:781-783).

A modo de ejemplo se expone a continuación la metodología seguida para la identificación de los aislados pertenecientes a los géneros *Mucor* y *Duddingtonia*. Para la identificación de

35 dichos aislados se utilizaron técnicas morfológicas y moleculares.

Estudio morfológico:

Las cepas se inocularon en los medios de cultivo: PDA (en sus siglas en inglés *Potato Dextrose Agar*; BD Difco™ Potato Dextrose Agar, Madrid, España), MEA (en sus siglas en inglés *Malt Extract Agar*; BD Difco™ Malt Extract Agar, Madrid, España), CMA (en sus siglas en inglés *Corn Meal Agar*; BD BBL™ Corn Meal Agar, Madrid, España) y se utilizaron dos temperaturas de incubación: 26°C y 37°C.

Las características estudiadas en la identificación, después de un período de incubación de 7 días, fueron:

- a) datos del crecimiento: tamaño de las colonias, textura, color, producción de exudado, producción de pigmento difusible y observación del reverso de la colonia
- b) detallada observación microscópica
- c) formación del estado teleomórfico si lo hubiese.

Estudio Molecular:

La identificación a nivel molecular se ha llevado a cabo por los siguientes métodos:

- a) Amplificación y posterior secuenciación (con lecturas en las dos direcciones) de la zona del DNA ribosómico ITS1 e ITS2, que incluye al gen 5,8S rDNA con los cebadores *its1* e *its4* (White, T. J., et al. 1990. In M. A. Innis, et al. PCR protocols. A guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, Cali p. 315-322).
- b) Amplificación y posterior secuenciación parcial del gen de la β -Tubulina (con lecturas en las dos direcciones), con los cebadores *Bt2a* y *Bt2b* (Glass, N.L., Donaldson, G.C. (1995). *Appl Environ Microb* 61:1323–1330).
- c) Amplificación y posterior secuenciación de los dominios D1/D2 del extremo 5' del gen que codifica el 28S rRNA con los cebadores *nl1* y *nl4* (Kurtzman, C.P., & Robnett, C.J. (1998). *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 331–371).

Los resultados del análisis morfológico, tanto microscópico como macroscópico, del aislado identificado como perteneciente a la especie *M. circinelloides* mostró un crecimiento rápido de las colonias en los diferentes medios de cultivo utilizados. Dichas colonias mostraban una textura flocosa de color marrón ocráceo y el reverso de color crema. También se observa crecimiento positivo a 37°C aunque con colonias de crecimiento más restringido. De la observación microscópica destaca la presencia de un micelio no septado y esporas asexuales en gran cantidad formándose en esporangios, que muestran una morfología de esférica a subesférica y sin apófisis. Los esporangióforos aparecen ramificados simpodialmente y con rizoides. También se observan esporangiosporas lisas, ovoides a elipsoidales, de 4 x 5µm, y clamidosporas presentes en las hifas.

Por otro lado, los resultados obtenidos del análisis molecular, corroboraron que la cepa perteneciente al género *Mucor*, pertenecía específicamente a la especie *M. circinelloides*. Para la obtención de dichos resultados moleculares se obtuvieron amplificadores de 639 y de 722 pb para las regiones ribosómicas ITS-5.8S rRNA y D1/D2 del gen 28S rRNA, respectivamente, mediante los cebadores mencionados anteriormente. A continuación se realizó un análisis tipo BLAST de las secuencias ribosómicas mencionadas arriba frente a las bases de datos del NCBI, obteniéndose los siguientes resultados:

- Región ITS1-5,8S-ITS2: *M. circinelloides* muestra un 99% de identidad (545/553) con la cepa CBS 195.68T perteneciente a la especie indicada y un 83% de identidad (440/533) con la especie *M. hiemalis* cepa CBS 201.65NT.
- Región D1/D2 del gen 28S: *M. circinelloides* muestra un 99% de identidad (698/699) con la cepa CBS 195.68T perteneciente a la especie indicada y un 90% (633/701) con la especie *M. hiemalis* cepa CBS 201.65NT.

Por lo tanto, los resultados mostrados ponen de manifiesto que el aislado del género *Mucor* corresponde específicamente a la especie *M. circinelloides*.

Por otro lado, los resultados del análisis morfológico, tanto microscópico como macroscópico, del aislado identificado como perteneciente a la especie *D. flagrans* puso de manifiesto que dichos aislados no crecían a la temperatura de 37°C en ninguno de los medios de cultivo utilizados, mientras que si se observó crecimiento a 26°C. Los cultivos obtenidos presentaban las mismas características a nivel macroscópico en los medios de cultivo PDA y MEA: colonias de rápido crecimiento, ocupando toda la superficie de la placa en 7 días, textura algodonosa, de color marrón anaranjado. En el medio de cultivo CMA las colonias eran de menor tamaño de diámetro y mostraban una textura algodonosa de color blanquecino. Los resultados obtenidos del análisis microscópico pusieron de manifiesto la presencia de hifas hialinas, septadas y ramificadas, con una producción abundante de clamidosporas, intercaladas en las hifas o encadenadas, presentando protuberancias globulares en la superficie. También se observaron conidios de diferentes morfologías, elipsoidales a cilíndricos, con 0-1 septo, con un extremo redondeado y el extremo basal con forma de botella poco diferenciado, y un tamaño de 20-39µm x 11-15µm. Todos estos resultados aseveraron la pertenencia del aislado del género *Duddingtonia* (*Arthrobotrys*) a la especie *D. flagrans*.

Para la identificación molecular se obtuvieron amplificadores de 644 y de 577 pb para la región ribosómica ITS-5.8S rRNA y para el gen de la β -tubulina, respectivamente mediante los

cebadores indicados previamente. El análisis BLAST, realizado según se ha explicado previamente, puso de manifiesto que:

- Región ITS1-5,8S-ITS2: *D. flagrans* presenta un 99.84% de identidad (639/640) con la cepa CBS 583.91 perteneciente a la especie *D. flagrans* y un 89% de identidad (442/499) con la especie *D. pseudoclavata* cepa AS 3.6756.
- Gen de la β -Tubulina: Se ha obtenido un 100% de identidad con ambas especies *D. flagrans* y *D. pseudoclavata*, cepa CBS 583.91 (442/442) y cepa AS 3.6756 (532/532), respectivamente.

Por lo tanto, los resultados mostrados ponen de manifiesto que el aislado del género *Duddingotina* (*Arthrobotrys*) se corresponde específicamente con la especie *D. flagrans*.

Los hongos preferidos utilizados en la presente invención pertenecen a los géneros *Mucor* y *Duddingtonia*, siendo preferidas las especies *M. circinelloides* y *D. flagrans*. Las cepas fúngicas pertenecientes a las especies *M. circinelloides* y *D. flagrans* fueron depositadas el 18 de diciembre de 2012 en la Colección Española de Cultivos Tipo y se les adjudicaron los números CECT 20824 y CECT 20823, respectivamente.

Ejemplo 2. Análisis de la actividad parasitocida de las cepas fúngicas aisladas.

Con el objetivo de analizar la actividad parasitocida, frente a las diferentes formas de propagación de los parásitos, de las diferentes cepas fúngicas aisladas según se describe en el Ejemplo 1, se emplearon distintas metodologías. Por un lado se analizó el porcentaje de reducción de las formas viables (quistes, huevos y larvas) de diferentes especies de parásitos tratadas con las cepas fúngicas aisladas en el Ejemplo 1. Por otro lado, se analizó la capacidad que presentaban dichas cepas fúngicas para alterar las diferentes formas de propagación de los parásitos.

Para ello, se prepararon placas con medio de cultivo enriquecido con trigo, que se sembraron con inóculos de los aislados fúngicos detallados en el Ejemplo 1. Una vez observado el crecimiento (10-12 días), se añadieron distintas formas parasitarias viables, como por ejemplo, ooquistes de *Eimeria spp.*, huevos de *Parascaris equorum* o larvas de ciatostominos. El posible efecto parasitocida de los hongos sobre los ooquistes y los huevos de los parásitos, se analizó de acuerdo a los criterios establecidos por Lýsek (Lýsek H, Faasatová O, Cuero Pineda ON, Lorenzo Hernández N. 1982. Folia Parasitol. (Praha) 29: 265-270):

Actividad	Nivel alteración
Ninguna	I
Rotura de la cubierta	II
Rotura de la cubierta y colonización del interior	III

La actividad larvicida de los hongos se determinó evaluando la capacidad de destruir las larvas mediante formación de trampas, anillos constrictores, etc. El análisis de la actividad de los aislados fúngicos en placa se resume en la Tabla 1.

5

Tabla 1. Actividad parasitica de distintos aislados fúngicos frente a diferentes formas parasitarias viables.

Aislado	Género	Ooquisticida	Ovicida	Larvicida
F1 F2	<i>Penicillium</i>	-	-	-
F3 F12	<i>Gliocladium</i>	-	-	-
F4	<i>Duddingtonia</i>	-	-	++++
F8 F9	<i>Arthrobotrys</i>	-	-	++
F5 F6 F11	<i>Fusarium</i>	-	+	-
F6 F13	<i>Verticillium</i>	-	+	-
F7 F10	<i>Mucor</i>	-	++	-
F11	<i>Sordaria</i>	-	-	-
F13	<i>Trichoderma</i>	-	++	-

-: ausencia de actividad parasitica; +: presencia de actividad parasitica, cuanto mayor número de + se muestren, mayor actividad parasitica.

10

Ninguno de los aislados fúngicos mostró actividad frente a los ooquistes. Los hongos que mayor capacidad ovicida presentaron fueron los pertenecientes a los géneros *Mucor* y *Trichoderma*, que mostraron capacidad para romper la cubierta de los huevos de ascáridos, colonizar su interior y destruir el embrión (actividad III de acuerdo a los criterios establecidos

15

por Lýsek (1982)). *Duddingtonia* presentó la mayor actividad larvicida, gracias a la formación de anillos-trampa. Por otro lado, los aislados de los géneros *Gliocladium*, *Penicillium* y *Sordaria* no mostraron ninguna actividad parasitica (Figura 1).

5 Ejemplo 3. Actividad parasitica-ovicida de diferentes especies de hongos nematófagos sobre parásitos cultivados en placas Petri.

Se prepararon 45 placas con medio de cultivo agar enriquecido con trigo, que se sembraron con muestras de cada uno de los aislados fúngicos obtenidos en el Ejemplo 1, a diferentes concentraciones. Transcurridos 10-12 días (y observado crecimiento), se depositaron 200 huevos de diferentes tipos de parásitos/placa, y el efecto ovicida de los aislados fúngicos sobre los huevos de dichos parásitos se evaluó a los 30 días según los criterios descritos en Lýsek (1982; Lýsek H, Faasatová O, Cuero Pineda ON, Lorenzo Hernández N. 1982. Folia Parasitol. (Praha) 29: 265-270):

15

Actividad	%Huevos alterados
0	≤ 15
1	15-20%
2	21-49%
3	50-79%
4	> 80%

Como control se utilizaron placas que no contenían hongos y a las que se les añadieron los huevos de los parásitos. La actividad o eficacia parasitica de los hongos se determinó aplicando la siguiente fórmula:

20

$$\% \text{ Reducción} = (1 - \text{Parásitos viables en Control} / \text{Parásitos viables en Tratados}) \times 100$$

Las concentraciones de las esporas de los diferentes hongos aislados y utilizados en la presente invención, son a partir de aquí y a lo largo de todo el presente documento D1: 0.025x10⁶; D2: 0.05x10⁶; D3: 0.1x10⁶; D4: 0.2x10⁶ y D5: 0.4x10⁶ / L medio de cultivo.

25

Tabla 2. Actividad ovicida de diferentes aislados fúngicos sobre huevos del parásito *Calicophoron daubneyi*, según los criterios descritos en Lýsek (1982).

	Concentración de esporas					
	0.025x10 ⁶	0.05x10 ⁶	0.1x10 ⁶	0.2x10 ⁶	0.4x10 ⁶	Control
<i>CECT 20824</i>	2	2	3	4	3	0
<i>Trichoderma</i>	2	2	2	2	2	0
<i>Fusarium</i>	1	1	2	1	2	0

5

En la Tabla 2 se muestra la actividad ovicida de las esporas de los hongos CECT 20824 (*M. circinelloides*), *Trichoderma* y *Fusarium* frente al parásito *Calicophoron daubneyi* presente en heces de bovinos en pastoreo.

10 En la Tabla 3 se muestra la actividad ovicida de los hongos CECT 20824 (*M. circinelloides*), *Trichoderma* y *Fusarium* frente a huevos del nematodo parásito *Parascaris equorum* obtenidos de heces de potros en pastoreo. Las concentraciones de las esporas de los diferentes hongos utilizadas son las mismas que se han descrito anteriormente.

15 **Tabla 3.** Actividad ovicida de diferentes aislados fúngicos sobre huevos del nematodo parásito *Parascaris equorum*, según los criterios descritos en Lýsek (1982).

	Concentración de esporas					
	0.025x10 ⁶	0.05x10 ⁶	0.1x10 ⁶	0.2x10 ⁶	0.4x10 ⁶	Control
<i>CECT 20824</i>	3	2	3	2	2	0
<i>Trichoderma</i>	1	2	2	2	2	0
<i>Fusarium</i>	1	1	2	1	1	0

20 En la Tabla 4 se muestra la actividad ovicida de los hongos CECT 20824 (*M. circinelloides*), *Trichoderma* y *Fusarium* frente a huevos del parásito *Trichuris spp.* recogidos de heces de dromedarios (*Camelus dromedarius*) en “Marcelle Natureza”. Las concentraciones de las

esporas de los diferentes hongos utilizadas son las mismas que se han descrito anteriormente.

Tabla 4. Actividad ovicida de diferentes aislados fúngicos sobre huevos del parásito *Trichuris spp.* según los criterios descritos en Lýsek (1982).

	Concentración de esporas					
	0.025x10 ⁶	0.05x10 ⁶	0.1x10 ⁶	0.2x10 ⁶	0.4x10 ⁶	Control
<i>CECT 20824</i>	1	2	3	2	1	0
<i>Trichoderma</i>	0	1	1	1	1	0
<i>Fusarium</i>	0	1	1	0	1	0

Estos resultados ponen de manifiesto que la mayor actividad ovicida se pone de manifiesto en presencia de los hongos del género *Mucor*, específicamente en presencia de la cepa CECT 20824, correspondiente a *M. circinelloides*, frente a la actividad ovicida que presentan los hongos del género *Trichoderma*, especialmente sobre los huevos de ascáridos y tricúridos. Por el contrario, los hongos del género *Fusarium* apenas mostraron actividad ovicida sobre los huevos de los ascáridos y tricúridos analizados en el presente ejemplo.

Ejemplo 4. Análisis de la actividad parasitocida-ovicida de diferentes especies de hongos nematófagos sobre coprocultivos infectados con parásitos.

Se colocaron, sobre cajas de plástico, cinco gramos de heces de diferentes especies de animales infectados con parásitos y que eliminan huevos de dichos parásitos en sus heces. A continuación se añadieron diferentes concentraciones de esporas (ver Ejemplo 3) de los aislados fúngicos descritos en el Ejemplo 1. Para simular las condiciones reales a las que se ven expuestos tanto los hongos como los parásitos, las cajas de plástico con las heces, los huevos de los parásitos y los hongos, se mantuvieron al aire libre en prados de pastoreo. Como control se utilizaron cajas con heces de animales infectados a las que no se les añadieron los aislados fúngicos. La eficacia de la actividad parasitocida de los hongos analizados se determinó a los 30 días de la adición de las esporas, mediante la fórmula descrita anteriormente.

En la Figura 2 se muestra la actividad ovicida de los hongos *M. circinelloides* CECT 20824 y *Trichoderma* sobre huevos del nematodo parásito *Parascaris equorum*. Para ello se prepararon 60 cajas con cinco gramos cada una de heces de cebras que eliminaban 800 huevos de *P. equorum* (por gramo de heces, hpg), que se dividieron en 3 grupos:

- 5 • 25 cajas recibieron esporas de *M. circinelloides* CECT 20824,
- 25 cajas recibieron esporas de *Trichoderma*
- 10 cajas se mantuvieron sin esporas-Grupo control.

Las concentraciones de esporas empleadas fueron las mismas que se han utilizado
10 previamente (ver Ejemplo 3). Como se observa en dicha Figura 2, las concentraciones de esporas, D2-D5, de *M. circinelloides* CECT 20824 muestran un porcentaje de reducción $\geq 50\%$ de huevos del parásito *P. equorum*, mientras que con las esporas de *Trichoderma* se obtuvieron valores de reducción del 20%-42%. El porcentaje más elevado del efecto ovicida se alcanzó cuando se utilizó una concentración de esporas de 0.2×10^6 esporas (D4) de *M.*
15 *circinelloides* CECT 20824, obteniéndose un porcentaje de reducción de huevos del parásito del 72%. En el grupo control no se observó actividad ovicida.

También se analizó la actividad ovicida de las esporas de dichos hongos nematófagos sobre cultivos de heces que contenían huevos del nematodo parásito *Trichuris spp* (Figura 3) y del
20 trematodo parásito *Calicophoron daubneyi* (Tabla 5). En la Figura 3 se muestra la actividad ovicida de los hongos *M. circinelloides* CECT 20824 y *Trichoderma* sobre huevos del nematodo parásito *Trichuris spp.* presentes en heces de dromedarios que eliminaban 2500 huevos de *Trichuris spp.* (por gramo de heces). Los resultados ponen de manifiesto que los porcentajes de reducción de huevos viables fueron más elevados cuando las heces se
25 trataron con esporas de *M. circinelloides* CECT 20824, especialmente cuando se utilizaron concentraciones de esporas superiores a 0.1×10^6 esporas (D3), observándose una reducción del número de huevos del parásito que variaba de entre el 46-56%.

En la Tabla 5 se muestra la actividad ovicida de los hongos *Mucor* y *Trichoderma* sobre
30 huevos del trematodo parásito *Calicophoron daubneyi*. Se llevó a cabo el mismo desarrollo experimental que se ha explicado anteriormente, pero utilizando cultivos de heces de vacas que eliminaban diferentes cantidades de huevos del trematodo *Calicophoron daubneyi* en heces (50, 100, 150 y 200), y se añadió una mezcla de 2×10^6 esporas de *Duddingtonia* y *Mucor*, obteniéndose los siguientes resultados:

35

Tabla 5. Actividad ovicida de esporas de *Mucor* y *Trichoderma* sobre huevos del parásito *Calicophoron daubneyi*. En la tabla se muestra el porcentaje de reducción de huevos mostrado por las esporas de los hongos nematófagos utilizados.

	50 hpg	100 hpg	150 hpg	200 hpg	Media
Actividad ovicida <i>M. circinelloides</i> CECT 20824	88	89	88	94	90
Actividad ovicida <i>Trichoderma</i>	54	57	62	74	62

5

Al contrario de lo que ocurre con algunos nematodos (ascáridos y tricúridos), en los que la fase infectiva (larva) no sale del huevo, en los trematodos, una vez en el suelo, en el interior de los huevos se forma el miracidio, que abandona el huevo, infecta a un caracol (*Galba truncatula*), que emite cercarias, que finalmente se transforman en las fases infectivas, las metacercarias. La formación de los miracidios depende de la temperatura, oscilando entre 20-60 días a temperaturas entre 10 y 20°C. Por este motivo, es necesario tener en cuenta el tiempo que transcurre para que los hongos nematófagos-ovicidas destruyan los huevos de los trematodos. En este sentido, se diseñó un ensayo en el que se añadieron las diferentes concentraciones de esporas de *M. circinelloides* CECT 20824, descritas a lo largo de la presente invención sobre cinco gramos de heces de vacas que eliminaban 250 huevos del trematodo *Calicophoron daubneyi*.

Como se puede observar en la Figura 4, los resultados más precoces de actividad ovicida mostrados por las esporas de *M. circinelloides* CECT 20824 sobre los huevos de *C. daubneyi*, se obtuvieron con las concentraciones de D3-D5, comprobándose que la viabilidad de los huevos se redujo de forma significativa en $\geq 50\%$ a los 17 días de estar en contacto con dichas concentraciones de esporas de *M. circinelloides* CECT 20824. Estos resultados muestran que con el empleo de cantidades de esporas de *M. circinelloides* CECT 20824 superiores a 0.05×10^6 (D2) se reduce la probabilidad de infección por trematodos en al menos un 50%.

Ejemplo 5. Análisis de la actividad parasiticida-ovicida de diferentes especies de hongos sobre parásitos en medio arenoso.

Como se ha mencionado previamente, entre las zoonosis parasitarias más peligrosas para la salud humana se encuentran las ascariosis, provocadas, principalmente, por el nematodo parásito *Toxocara canis*. Se trata de una helmintozoonosis en la que las mascotas, principalmente perros y gatos, eliminan huevos que salen al exterior con las heces. En el suelo, se completa el desarrollo de dichos huevos hasta larva 2 (L2), que no abandona el huevo. De forma accidental, por ejemplo en parques públicos, areneros, etc., puede tener lugar la ingestión de huevos con L2 en su interior, que se liberan en el intestino de las personas, y realizan migraciones por el organismo, situándose en el globo ocular, musculatura, etc. El principal grupo de riesgo se encuentra en los niños.

Con objeto de simular dichas condiciones, se colocaron cinco gramos de heces de coatíes (*Nasua narica*) del “Parque Zoológico Marcelle Natureza” (Outeiro de Rei, Lugo) que eliminan 850 huevos de ascáridos por gramo de heces en diferentes cajas de plástico. Se prepararon un total de 18 cajas, que se dividieron en 3 grupos:

- 7 cajas que contenían esporas de *M. circinelloides* CECT 20824
- 7 cajas que contenían esporas de *M. circinelloides* CECT 20824 + arena
- 4 cajas que no contenían esporas (Grupo control)

Las cajas se mantuvieron en un prado para simular las condiciones reales a las que se ven expuestos. La eficacia del hongo *M. circinelloides* CECT 20824 se determinó con la fórmula descrita anteriormente, obteniéndose valores más elevados de reducción del número de huevos viables cuando *M. circinelloides* CECT 20824 se encontraba en medio arenoso, lo que indica que se trata de un hongo muy útil en la prevención de infecciones parasitarias de personas por ingestión de huevos eliminados por animales domésticos o ganado (zoonosis). Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que la actividad ovicida de *M. circinelloides* CECT 20824 sobre parásitos en suelo arenoso fue de un 72% de reducción de dichos parásitos frente a un 61% de reducción cuando *M. circinelloides* CECT 20824 no se encuentra en suelo arenoso.

Ejemplo 6. Análisis de la actividad parasiticida-larvicida en placas de cultivo de esporas de *Duddingtonia flagrans* CECT 20823 sobre parásitos cultivados en placa.

Se prepararon 40 placas con medio enriquecido (agar, harina de trigo, cloramfenicol, agua), en las que se sembró un inóculo de *D. flagrans* CECT 20823. Después de 8-10 días, se colocaron en 30 placas larvas 3 (L3) de nematodos estrangilados parásitos (ciatostominos) obtenidas tras la incubación de heces de caballos a 22-25°C durante 20 días. Transcurridos 15-17 días desde la adición de las larvas se analizó la eficacia larvicida del hongo, empleando la fórmula:

$$\% \text{ Reducción} = 1 - (\text{Parásitos placas con CECT 20823} / \text{Parásitos placas control}) \times 100$$

El porcentaje de reducción de larvas L3 de los nematodos estrangilados fue de un 80-90%.

Ejemplo 7. Análisis de la actividad parasiticida-larvicida de esporas de *D. flagrans* CECT 20823 sobre coprocultivos infectados con parásitos.

Se utilizaron cuatro concentraciones diferentes de clamidosporas de *D. flagrans* CECT 20823 5×10^6 , 10×10^6 , 20×10^6 y 40×10^6 / 100 g. heces, que se añadieron a cajas de plástico con 10 gramos de heces de caballos que eliminaban huevos de nematodos estrangilados parásitos. En función de la eliminación de huevos, se establecieron 3 grupos: bajo (≤ 300), medio (800) y alto (1200), observándose un porcentaje de reducción del 89-99% según la carga parasitaria inicial (Tabla 6). La actividad parasiticida de *D. flagrans* CECT 20823 más elevada se observó en los grupos que presentaban un nivel de eliminación de huevos alto (> 1200) (Tabla 6).

Tabla 6. Actividad parasiticida de *D. flagrans* CECT 20823 frente a nematodos estrangilados presentes en heces de caballo.

Carga parasitaria inicial	Nº cajas	% Reducción
300 huevos	82	89
800 huevos	54	96
1200 huevos	60	99
Total	196	94

Los resultados obtenidos en función de la concentración de esporas de *D. flagrans* CECT 20823 añadidas pusieron de manifiesto que la mayor actividad parasitocida-larvicida se observó cuando se utilizaron dosis de esporas superiores a 10×10^6 (Tabla 7).

- 5 **Tabla 7.** Actividad parasitocida-larvicida de diferentes concentraciones de esporas de *D. flagrans* CECT 20823 frente a nematodos estrangilados presentes en heces de caballo.

Concentración de esporas	Nº cajas	% Reducción L3
5×10^6	60	91
10×10^6	40	92
20×10^6	60	95
40×10^6	36	99
Total	196	94

- 10 Se analizó también la actividad parasitocida-larvicida de *D. flagrans* CECT 20823 sobre parásitos presentes en las heces de lechones. En la granja de la asociación PRODEME (Pro Deficientes Mentales) localizada en Monforte de Lemos (Lugo), se recogieron heces directamente del recto de 20 lechones, que eliminaban en las heces huevos de nematodos ascáridos (*Ascaris suum*) y estrangilados (*Oesophagostomum*). Se establecieron diferentes
- 15 grupos en función del número de huevos de parásitos en las heces, colocándose 15 gramos de heces en cajas de plástico, preparándose un número total de 66 cajas. Se añadieron 20×10^6 clamidosporas de *D. flagrans* CECT 20823 en 44 cajas, manteniéndose 22 cajas sin hongos como controles. La eficacia de la actividad parasitocida de *D. flagrans* sobre este tipo de parásitos se evaluó a los 21 días utilizando la fórmula:

20

$$\% \text{ Reducción} = 1 - (\text{Parásitos cajas con CECT 20823} / \text{Parásitos cajas control}) \times 100$$

- Como se puede apreciar en la Tabla 8, el porcentaje de reducción de nematodos estrangilados (L3) fue igual o superior al 95%, con independencia de la carga inicial (Huevos por gramo de heces, hpg).
- 25

Tabla 8. Actividad parasitocida-larvicida de *D. flagrans* CECT 20823 frente a nematodos estrongilados L3 presentes en coprocultivos de heces de lechones.

Hpg inicial estrongilados	0-300	350-600	650-900	950-1200	>1200
% Reducción	95	96	95	97	99

- 5 No se observó efecto de *D. flagrans* CECT 20823 sobre parásitos coccidios ni ascáridos de los lechones, lo que parece deberse a que en este caso las formas larvarias no salen del huevo hasta que son ingeridas de nuevo por un hospedador, por lo que las trampas elaboradas por el hongo nematófago *D. flagrans* CECT 20823 carecen de utilidad en este caso. Por el contrario, las larvas L2 y L3 de los nematodos estrongilados constituyen la
- 10 diana principal de este hongo.

También se analizó la actividad parasitocida-larvicida de *D. flagrans* CECT 20823 sobre parásitos presentes en las heces de terneros. En la granja de la asociación PRODEME (Pro Deficientes Mentales) localizada en Monforte de Lemos (Lugo), se recogieron heces

15 directamente del recto de 20 terneros que eliminaban huevos de estrongilados (*Ostertagia*, *Oesophagostomum* y *Trichostrongylus*) en las heces. Se prepararon 70 cajas de plástico con 15 gramos de heces, que se agruparon en función del número de huevos eliminados. Se añadieron 30×10^6 clamidosporas de *D. flagrans* CECT 20823 en 56 cajas, manteniéndose 24 cajas sin hongos como controles. La eficacia de la terapia con hongos se

20 evaluó a los 21 días con la fórmula descrita anteriormente, demostrándose que el porcentaje de larvas L3 que permanecían viables tras la adición de las esporas era $\geq 5\%$ (Tabla 9). Estos resultados corroboran la elevada eficacia de *D. flagrans* CECT 20823 frente a nematodos estrongilados parásitos.

- 25 **Tabla 9.** Actividad parasitocida-larvicida de *D. flagrans* CECT 20823 frente a nematodos estrongilados L3 presentes en heces de terneros.

Hpg inicial	0-50	51-100	101-150	>150
% Reducción	96	96	95	96

Ejemplo 8. Análisis de la actividad parasiticida-larvicida de esporas de *D. flagrans* CECT 20823 sobre animales infectados con parásitos.

Se llevaron a cabo dos pruebas con animales. En primer lugar se procedió a la distribución de esporas de *D. flagrans* CECT 20823 directamente sobre prados que servían de alimento a caballos en pastoreo (Granja “Gaioso-Castro”, Castro Riberas de Lea, Diputación Provincial de Lugo). En segundo lugar, se procedió a la administración oral de las esporas de *D. flagrans* CECT 20823 a diferentes especies de équidos mantenidos en el “Parque Zoológico Marcelle Natureza” (Outeiro de Rei, Lugo), mediante su mezcla con concentrado alimentario (pienso).

Granja “Gaioso-Castro”

Se emplearon 16 yeguas adultas Pura Raza Galega, mantenidas en tres parcelas de dos Ha, que eliminaban huevos de nematodos strongilados parásitos. Los equinos se dividieron en 3 grupos:

- Grupo I (IVM): 6 animales tratados con ivermectina (1 mg/Kg p.v. Noromectin®, Norbrook, Irlanda), un antiparasitario convencional,
- Grupo II (IVM+CECT 20823): 6 animales tratados con ivermectina y mantenidos en pastoreo en una pradera donde se vertieron mensualmente sobre el suelo clamidosporas de *D. flagrans* CECT 20823 ($2 \times 10^6 / 100 \text{ m}^2$)
- Grupo Control: 4 animales que permanecieron sin tratar.

En la Figura 5 se observa que la administración de ivermectina suprimió la eliminación de huevos de nematodos en las heces de los animales del grupo IVM y del grupo IVM + CECT 20823 durante 8 semanas. Con la distribución de las esporas de *D. flagrans* CECT 20823 en la parcela de los caballos del grupo IVM + CECT 20823, se mantuvieron unas cifras de eliminación de huevos de strongilados que variaron de entre 50 y 150 hpg, en dicho grupo, mientras que dichas cifras son muy superiores cuando no se administran esporas (grupo IVM: entre 50 y 400 hpg).

Con objeto de reducir el uso indiscriminado y reiterado de antihelmínticos en caballos, se ha introducido el término de *terapia selectiva*, que consiste en administrar antiparasitarios a los animales que eliminan en las heces cantidades superiores a los 300-400 huevos por gramo, en base a que esta carga parasitaria empieza a ser patógena para los equinos, y por tanto se requiere aplicar un tratamiento antiparasitario (Uhlinger CA. Vet Clin North Am Equine Pract 2007;23:509-17 Francisco R, Paz-Silva A, Francisco I, Cortiñas FJ, Miguélez S,

Suárez J, Cazapal-Monteiro CF, Suárez JL, Arias MS, Sánchez-Andrade R. J Eq Vet Sci 2012. 32: 274-280.). Ello pone de manifiesto la utilidad de la adición de esporas de *D. flagrans* para reducir carga parasitaria en las heces de los animales y por tanto para reducir las posibilidades de infección de los mismos, ya que las cifras de huevos estrangilados presentes en las heces de los caballos se mantienen por debajo de los 300 hpg cuando se administran esporas en las parcelas donde se encuentran.

Marcelle Natureza

Se probó la eficacia del tratamiento con esporas de *D. flagrans* CECT 20823 en la prevención de la reinfección de diferentes especies equinas: cebras (*Equus quagga*), burro doméstico (*E. asinus*) y burro africano (*E. africanus asinus*). El ensayo consistió en administrar cada 15 días 2×10^6 esporas/animal, mezcladas con el concentrado alimentario (pienso).

En la Figura 7 se observa que tras la administración de antiparasitario (ivermectina + praziquantel (Equimax®, Virbac, Spain), 1,07 g gel / 100 kg p.v.) en el mes de septiembre del año 2010, se suprimió la eliminación de huevos de estrangilados en las 3 especies equinas. En noviembre volvieron a aparecer y aumentaron hasta el mes de marzo de 2011, momento en el que se volvieron a tratar con el antiparasitario de nuevo los animales. A partir de mayo 2011 se produjo un nuevo incremento, y se aplicó antiparasitario en septiembre de ese año. Desde septiembre del 2011 se proporcionó a los animales 2×10^6 esporas/animal de *D. flagrans* CECT 20823, cada 15 días, mezcladas con el concentrado alimentario, consiguiéndose mantener la eliminación de huevos de estrangilados entre 50 y 400. No se administró tratamiento con antiparasitarios desde el mes de septiembre de 2011 hasta la fecha actual (noviembre 2012), manteniéndose los niveles de eliminación de huevos de estrangilados entre los valores arriba mencionados, sin ayuda del tratamiento con antiparasitarios comerciales.

Ejemplo 9. Eficacia parasitocida de la combinación de esporas de *M. circinelloides* CECT 20824 y *D. flagrans* CECT 20823.

Como se ha mostrado a lo largo de la presente invención, *M. circinelloides* CECT 20824 presenta la mayor actividad ovicida y *D. flagrans* CECT 20823 la mayor actividad larvicida, de todos los hongos analizados. Por ello, se ha considerado su empleo en combinación con

el objeto de ampliar el rango de actuación de dichos hongos sobre diferentes formas infectivas de los parásitos, huevos y larvas.

5 Dado que es conocido que algunas cepas de hongos nematófagos, como por ejemplo cepas de *Trichoderma* inhiben el crecimiento de otras cepas nematófagas, como por ejemplo *Fusarium* (Hernández Mansilla AA, Sierra Peña A, Carr Pérez A. Fitosanidad (Cuba) 10: 105-108), se procedió a la comprobación de que ambas cepas de hongos, *M. circinelloides* CECT 20824 y *D. flagrans* CECT 20823, podían crecer juntas, observándose que no existía problema alguno, como se aprecia en la Figura 8. A continuación se procedió a la
10 determinación de la actividad parasitica conjunta de ambas especies de hongos sobre diferentes estadios parasitarios que se pueden encontrar en el suelo.

Actividad parasitica de *M. circinelloides* CECT 20824 + *D. flagrans* CECT 20823 sobre huevos de parásitos. Ensayos en placas.

15 Se prepararon 20 placas con agar-trigo, y cada una se sembró simultáneamente con un inóculo de *D. flagrans* CECT 20823 y otro de *M. circinelloides* CECT 20824. A los 10 días, una vez observado crecimiento de ambos hongos, se añadieron en cada placa 200 huevos de *Parascaris equorum* y 500 L3 de nematodos estrangilados. La eficacia de la actividad
20 parasitica se estableció 17 días más tarde. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que el porcentaje de reducción para los ascáridos (*Parascaris equorum*) fue de aproximadamente un 86% (72–96%) y para las larvas L3 de los nematodos estrangilados de aproximadamente un 98% (96–99%). Estos resultados ponen de manifiesto que la combinación de los dos hongos no merma su actividad, dado que *M. circinelloides* CECT
25 20824 ejerce una alteración sobre los huevos de ascáridos de tipo III (rotura de la cubierta y colonización del interior), y una actividad 4 sobre su viabilidad (destrucción huevos superior al 80%), como se había demostrado en los Ejemplos 2 y 3. Por otro lado, la eficacia de *D. flagrans* CECT 20823 sobre las larvas de estrangilados también alcanzó los valores observados con anterioridad en los Ejemplos 6 y 7.

30 Actividad parasitica de *M. circinelloides* CECT 20824 + *D. flagrans* CECT 20823 sobre animales infectados con parásitos.

Teniendo en cuenta que la asociación de *M. circinelloides* CECT 20824 + *D. flagrans* CECT
35 20823 es capaz de reducir la presencia de huevos y larvas de parásitos, se consideró que un mecanismo muy adecuado para su distribución en los animales es su incorporación al

concentrado alimentario (pienso) que reciben los animales. De este modo se consigue que los hongos actúen tanto en el propio animal como, principalmente en la materia fecal de los mismos, que hace también de vehículo de las formas parasitarias hasta el suelo, evitándose de esta manera la infección de los animales en pastoreo.

5

En primer lugar se analizó la termorresistencia de una mezcla de esporas de los dos hongos (*M. circinelloides* CECT 20824 + *D. flagrans* CECT 20823), teniendo en cuenta que durante el procedimiento de fabricación del pienso se llega a una temperatura de 70°C durante 1-2 min (fase de secado), y que tanto las materias primas en fábrica, como el producto final (concentrado) pueden estar expuestos a temperaturas próximas a 4°C. Existen algunos estudios que señalan que el crecimiento de los hongos del género *Mucor* se produce a bajas temperaturas, indicando 30°C como el límite para observar desarrollo de este hongo (de Hoog *et al.*, 2000. Atlas of Clinical Fungi, 2nd ed, vol. 1. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands). En la presente invención se pone de manifiesto, Tablas 10 y 11, que las esporas de *M. circinelloides* CECT 20824 y las de *D. flagrans* CECT 20823, muestran resistencia al tratamiento térmico experimentado durante la fabricación del concentrado alimentario (70°C), así como a su conservación en la fábrica (4°C).

Tabla 10. Resistencia de las esporas de *M. circinelloides* CECT 20824 y *Duddingtonia flagrans* CECT 20823 frente a tratamientos con altas temperaturas.

Temperatura: 70°C			
Tiempo	Crecimiento	Reducción L3 (%)	Reducción huevos
0	++++	0	0
10''	++++	95-99	56-78
30''	++++	93-99	64-81
1'	++++	96-98	73-82
2'	++++	91-97	69-77
5'	++++	90-96	72-80
10'	+	10	12

Tabla 11. Resistencia de las esporas de *M. circinelloides* CECT 20824 frente tratamientos con bajas temperaturas.

Temperatura: 4°C			
Tiempo	Crecimiento	Reducción L3 (%)	Reducción huevos Parascaris (%)
0	++++	0	2
12 h	+++++	95-97	72-77
24 h	+++++	94-98	74-81
48 h	+++++	91-99	76-82

5

Una vez demostrada la resistencia de las esporas al tratamiento térmico experimentado durante la fabricación del concentrado alimentario, así como a su conservación en la fábrica, se procedió a su adición al producto Pro-Horse Club® (Nanfor) en las instalaciones de NANTA (Nanfor, Nutreco) en Outeiro de Rei (Lugo). Se adicionaron 72×10^6 esporas de cada especie fúngica por 1200 Kg pienso. Del concentrado así elaborado se tomaron muestras (1 g) que se disolvieron en agua (1 mL), y se depositaron en placas Petri con medio de cultivo compuesto por agar y trigo. A los 7 días se observó crecimiento de las dos especies fúngicas, lo que demuestra que la elaboración del pienso bajo las condiciones de fábrica no altera su capacidad de desarrollo.

10

15

A continuación, se añadieron en cada placa 200 huevos del nematodo parásito *Parascaris equorum* + 500 L3 de nematodos estrongilados (ciatostominos) de caballos. A los 14 días se determinó que el porcentaje de reducción de huevos oscilaba entre el 72 y el 82%, y el de larvas entre el 95-99%, lo que confirma que las esporas permanecen viables después de la elaboración del concentrado alimentario.

20

Posteriormente, con objeto de determinar si la mezcla de esporas atravesaba el tracto digestivo y salía indemne en las heces, se procedió a la administración a un grupo de 8 caballos, de 2'5 Kg pienso/caballo/día para asegurar que se aportaban 15×10^6 esporas de cada hongo/animal/día. Los animales se mantuvieron durante 6 días estabulados. Para la determinación del porcentaje de recuperación de esporas en las heces se siguió el método descrito en Ojeda-Robertos *et al.*, 2008; Ojeda-Robertos NF, Torres-Acosta JF, Aguilar-Caballero AJ, Ayala-Burgos A, Cob-Galera LA, Sandoval-Castro CA, Barrientos-Medina RC, de Gives PM. Vet Parasitol. 2008; 158: 329-335. Los resultados obtenidos (Tabla 12)

25

revelaron que entre el 5 y el 20% de las esporas salían con las heces, lo que coincide con resultados de investigaciones previas en las que se administraban las esporas de *D. flagrans* en solución acuosa por vía oral (Chandrawathani *et al.*, 2003) (Chandrawathani P, Jamnah O, Waller PJ, Larsen M, Gillespie AT, Zahari WM. Vet Parasitol. 2003; 117:173-83).

5

Tabla 12. Porcentaje de recuperación de esporas de *M. circinelloides* CECT 20824 y *D. flagrans* CECT 20823 en las heces de caballos.

Tiempo (h)	0	6	12	24	36	48	72	96	120
Recuperación (%)	0	5	8	12	14	17	16	18	20

10

Posteriormente, se administró a dos grupos de caballos pienso, que contenía la mezcla de las esporas de ambas especies fúngicas y pienso sin esporas (grupo control). Se emplearon equinos Pura Raza Galega mantenidos en pastoreo, que se suplementan con 2'5 Kg pienso/caballo/día. El concentrado alimentario es Pro-Horse Club®. Como se observa en la Figura 9, 15 días después de la administración de un antihelmíntico (ivermectina; 1 mg/Kg p.v. Noromectin®, Norbrook, Irlanda) a ambos grupos de animales, los equinos del grupo control volvieron a eliminar huevos de parásitos nematodos (estrongilados) en las heces, mientras que los que recibieron el pienso con esporas lo hicieron a los 45 días. También se puede comprobar que la adición de las esporas al pienso redujo las tasas de eliminación de huevos en los caballos, manteniéndose valores inferiores a 200, mientras que el grupo control alcanzó cifras de 600.

15

20

REIVINDICACIONES

1. Agente de control biológico que comprende al menos un hongo o una forma reproductiva del mismo, perteneciente a la especie *M. circinelloides*.
- 5 2. Agente de control biológico según la reivindicación 1 caracterizado por que el hongo o una forma reproductiva del mismo es *M. circinelloides* CECT 20824.
3. Agente de control biológico según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 caracterizado por que además comprende al menos otro hongo o una forma reproductiva del mismo, perteneciente a la especie *D. flagrans*.
- 10 4. Agente de control biológico según la reivindicación 3 caracterizado por que el hongo o una forma reproductiva del mismo es *D. flagrans* CECT 20823.
5. Agente de control biológico según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 caracterizado por que además comprende al menos otro hongo o una forma reproductiva del mismo, perteneciente a un género seleccionado de entre cualquiera de los siguientes:
15 *Trichoderma*, *Fusarium*, *Verticillum*, *Arthrobotrys*, *Pochonia* y/o cualquiera de sus combinaciones.
6. Agente de control biológico según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 caracterizado por que es un aditivo para alimentación animal.
7. Agente de control biológico según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 caracterizado
20 por que es una composición parasitocida.
8. Agente de control biológico según cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7 caracterizado por que se administra oralmente.
9. Agente de control biológico según la reivindicación 7 caracterizado por que la
25 composición parasitocida se administra adicional o alternativamente a la administración oral, sobre las heces de los animales y/o sobre el suelo.
10. Agente de control biológico según cualquiera de las reivindicaciones 1-9 caracterizado por que comprende formas reproductivas de los hongos.
11. Agente de control biológico según la reivindicación 10 caracterizado por que las formas reproductivas de los hongos son esporas vivas.
- 30 12. Agente de control biológico según cualquiera de las reivindicaciones 1-11 caracterizado por que el control biológico es ejercido frente a las formas viables de los parásitos helmintos seleccionados de entre cualquiera de los siguientes: nematodos, trematodos, cestodos y/o cualquiera de sus combinaciones.
- 35 13. Agente de control biológico según cualquiera de las reivindicaciones 1-12 caracterizado por que el control biológico es ejercido en animales seleccionados en entre cualquiera de la lista: perros, gatos, bóvidos, óvidos, suidos y équidos.

14. Uso de al menos un hongo o de una forma reproductiva del mismo perteneciente a la especie *Mucor circinelloides* para la elaboración de un agente de control biológico.
15. Uso según la reivindicación 14 caracterizado por que el hongo o una forma reproductiva del mismo es *M. circinelloides* CECT 20824.
- 5 16. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 14-15 caracterizado por que además comprende el uso de al menos otro hongo o una forma reproductiva del mismo perteneciente a la especie *Duddingtonia flagrans*.
17. Uso según la reivindicación 16 caracterizado por que el hongo o una forma reproductiva del mismo es *D. flagrans* CECT 20823.
- 10 18. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 14-17 caracterizado por que además comprende al menos otro hongo o una forma reproductiva del mismo perteneciente a un género seleccionado de entre cualquiera de los siguientes: *Trichoderma*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Arthrobotrys*, *Pochonia* y/o cualquiera de sus combinaciones.
19. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 14-18 caracterizado por que el agente de control biológico es un aditivo para alimentación animal.
- 15 20. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 14-18 caracterizado por que el agente de control biológico es una composición parasitocida.
21. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 19 ó 20 caracterizado por que el agente de control biológico se administra oralmente.
- 20 22. Uso según la reivindicación 20 caracterizado por que la composición parasitocida se administra adicional o alternativamente a la administración oral, sobre las heces de los animales y/o sobre el suelo.
23. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 14-22 caracterizado por que comprende formas reproductivas de los hongos.
- 25 24. Uso según la reivindicación 23 caracterizado por que las formas reproductivas de los hongos son esporas vivas.
25. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 14-24 caracterizado por que el control biológico es ejercido frente a las formas viables de los parásitos seleccionados de entre cualquiera de los siguientes: nematodos, trematodos, cestodos y/o cualquiera de sus combinaciones.
- 30 26. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 14-25 caracterizado por que el control biológico es ejercido en animales seleccionados en entre cualquiera de la lista: perros, gatos, bóvidos, óvidos, suidos y équidos.
27. Cepa fúngica CECT 20824 cultivable caracterizada por que pertenece a la especie *M. circinelloides*.
- 35 28. Cultivo biológicamente puro de la cepa fúngica *M. circinelloides* CECT 20824.

29. Método de reducción de la carga parasitaria presente en las heces de animales y en los entornos donde se encuentran mediante la administración, bien a las heces y/o en el entorno, de una cantidad eficaz de al menos un hongo o una forma reproductiva del mismo, de la especie *M. circinelloides* CECT 20824 sola o en combinación con al menos otro hongo o una forma reproductiva del mismo, seleccionado de entre cualquiera de los siguientes: *D. flagrans* CECT 20823, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Verticillum*, *Arthrobotrys*, *Pochonia* y/o cualquiera de sus combinaciones; o de un agente de control biológico según cualquiera de las reivindicaciones 1-13.
30. Método de reducción de la carga parasitaria según la reivindicación 29 caracterizado por que la reducción de la cantidad de parásitos es de al menos un 50%.
31. Método de reducción de la carga parasitaria según cualquiera de las reivindicaciones 29-30 caracterizado por que la reducción de la cantidad de parásitos es de al menos un 75%.
32. Método de reducción de la carga parasitaria según cualquiera de las reivindicaciones 29-31 caracterizado por que la reducción de la carga parasitaria se lleva a cabo sobre las formas viables de los parásitos helmintos seleccionados de entre cualquiera de los siguientes: nematodos, trematodos, cestodos y/o cualquiera de sus combinaciones.
33. Método de reducción de la carga parasitaria según cualquiera de las reivindicaciones 29-32 caracterizado por que los animales se seleccionan de entre cualquiera de la lista: perros, gatos, bóvidos, óvidos, suidos y équidos.
34. Concentrado alimenticio para alimentación animal que comprende al agente de control biológico según la reivindicación 6.

Figura 1

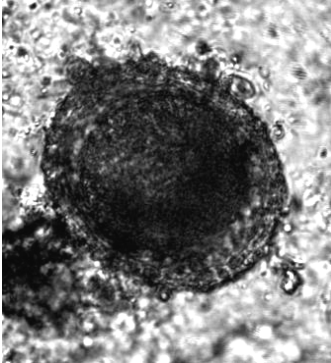
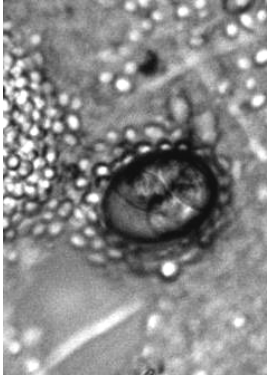
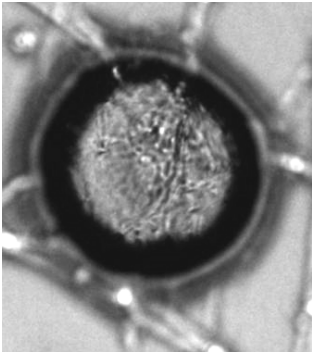
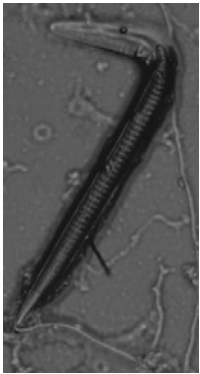
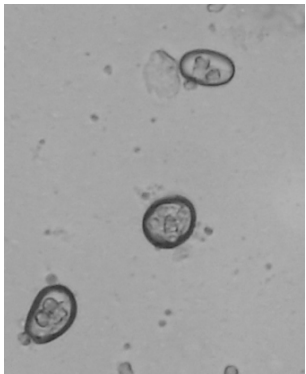
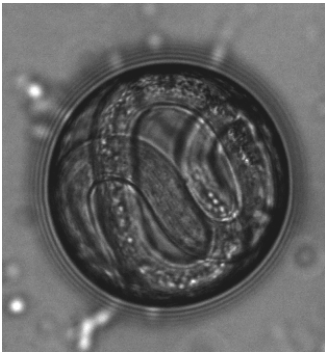
Hongo	OOQUISTES	OVICIDA	LARVICIDA
<i>Mucor</i>			
<i>Gliocladium</i>			
<i>Trichoderma</i>			
<i>Duddingtonia</i>			

Figura 2

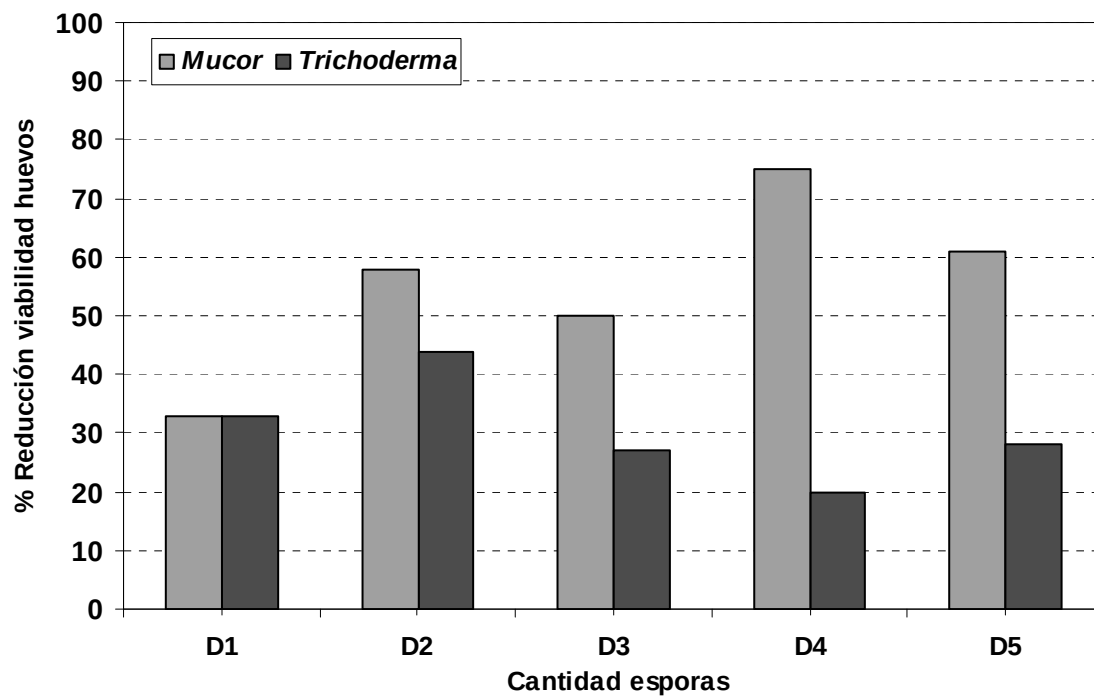


Figura 3

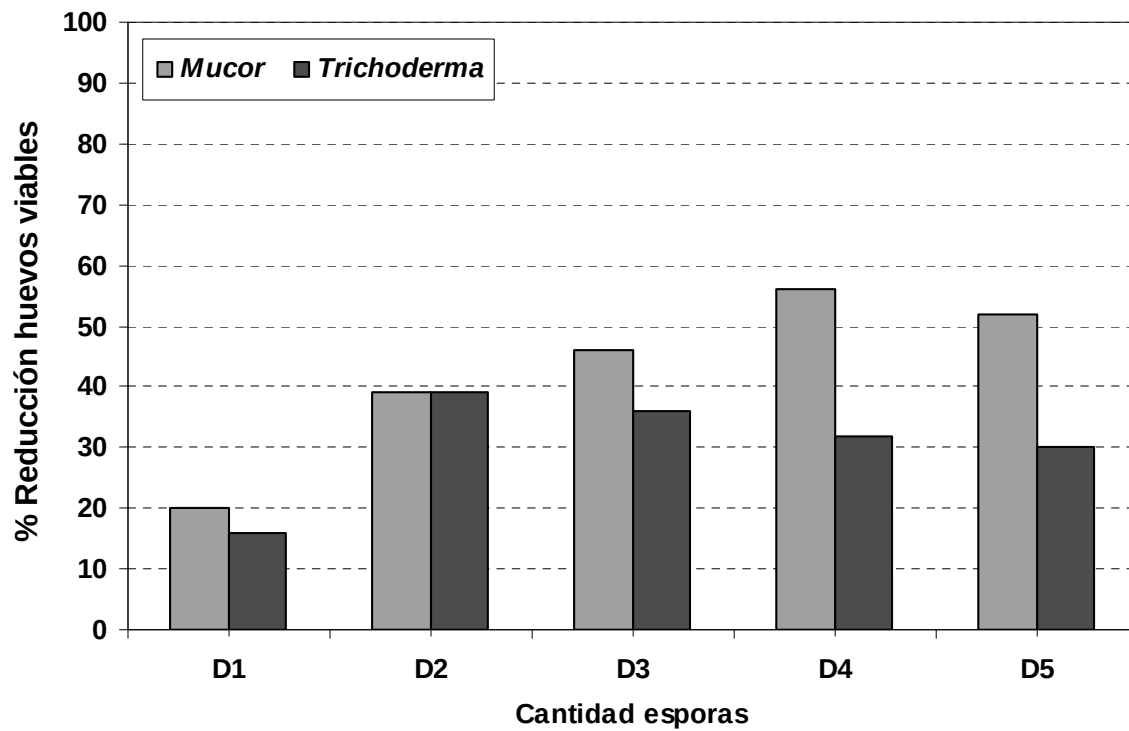


Figura 4

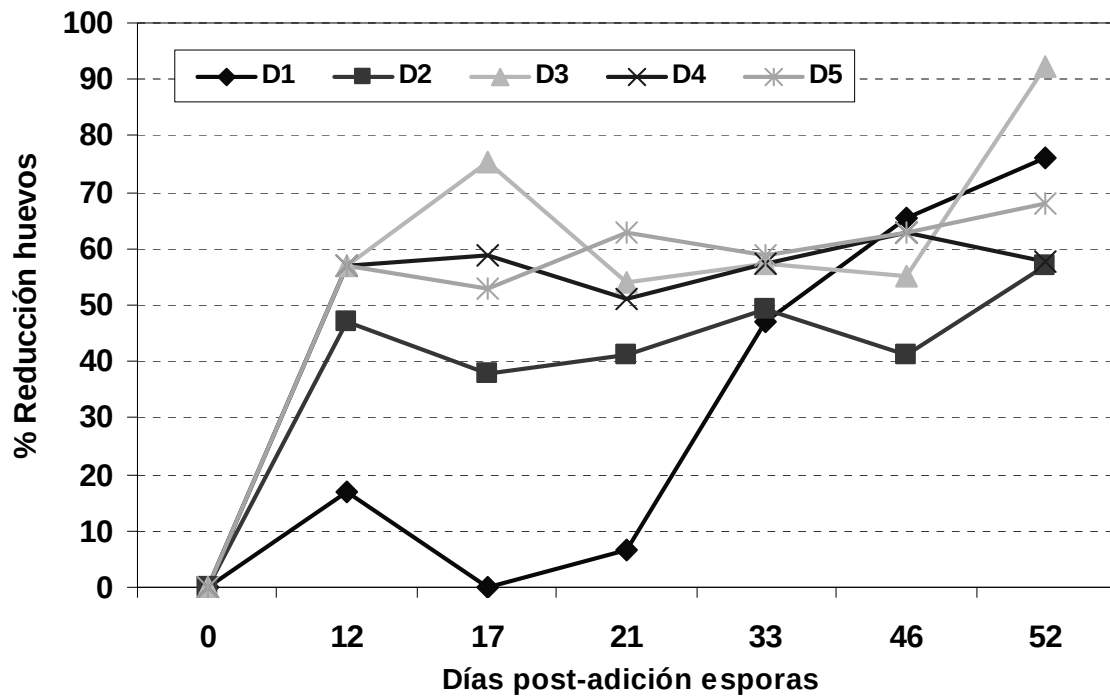


Figura 5

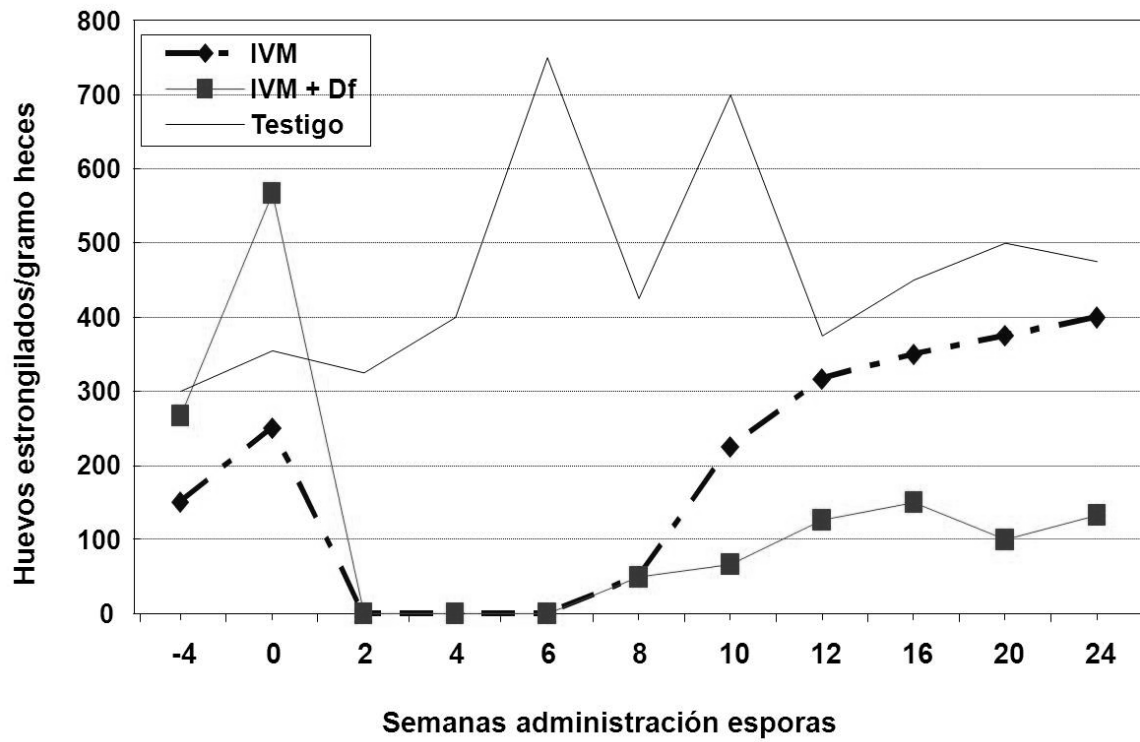
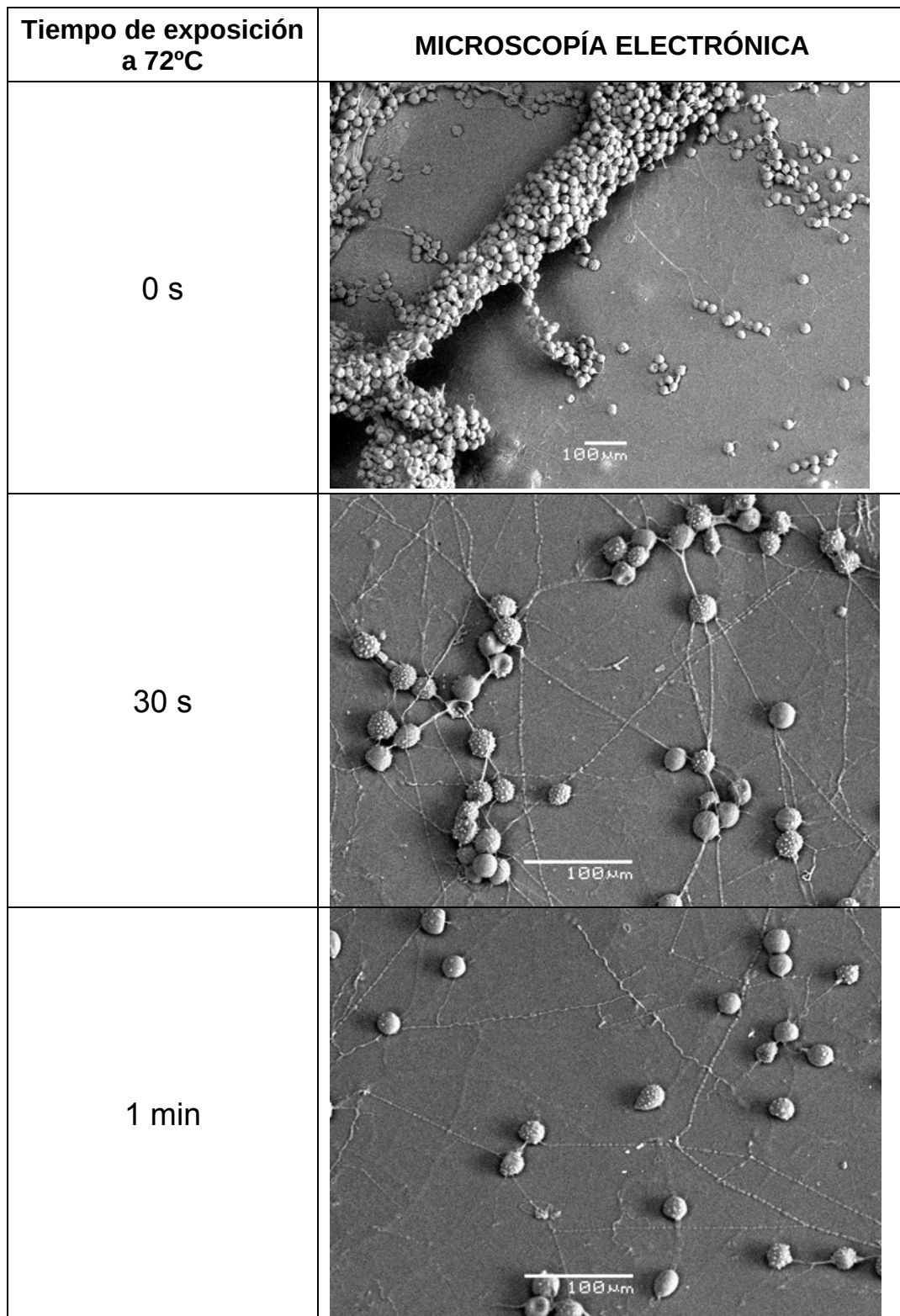


Figura 6



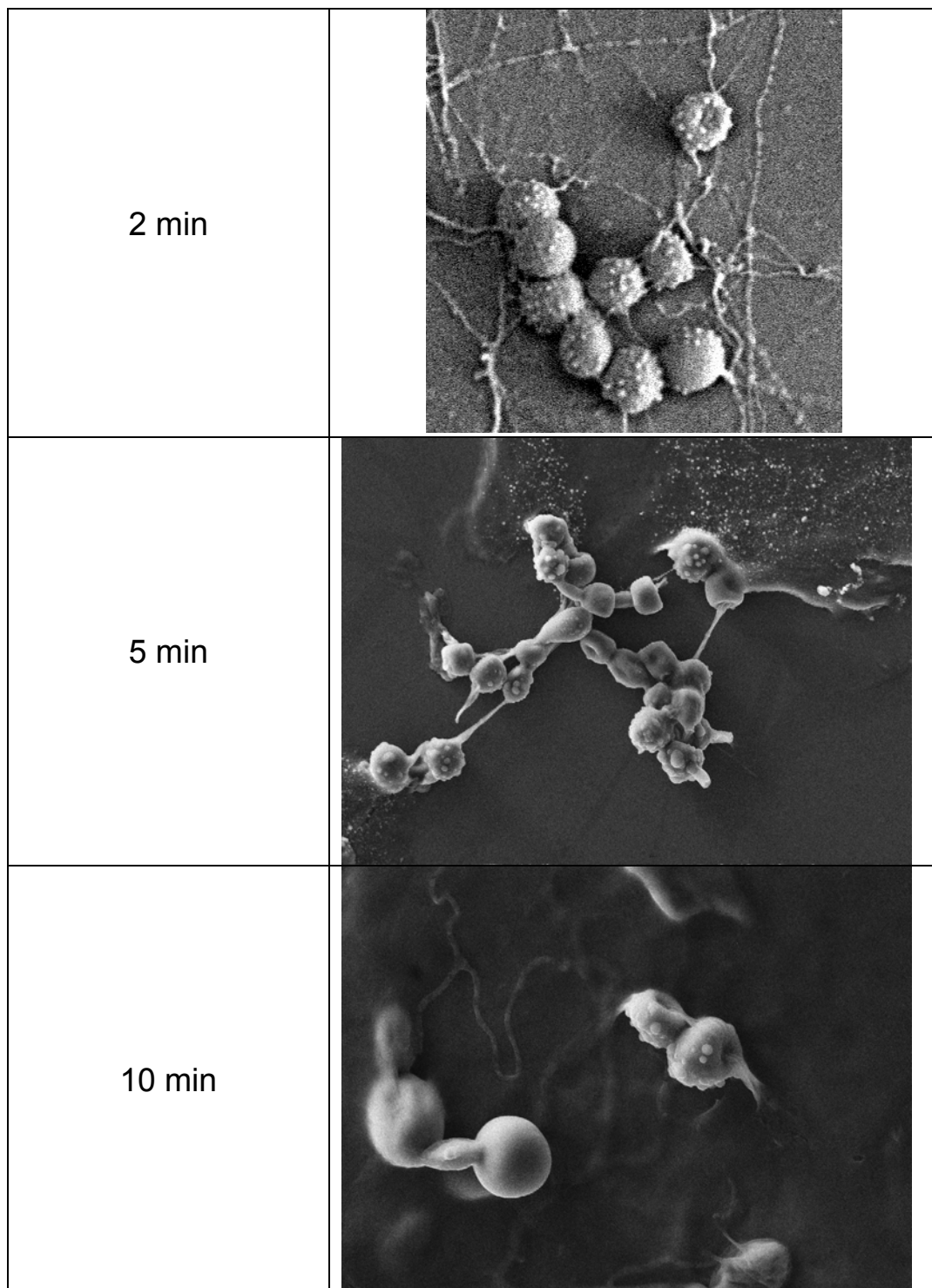


Figura 6 (cont)

Figura 7

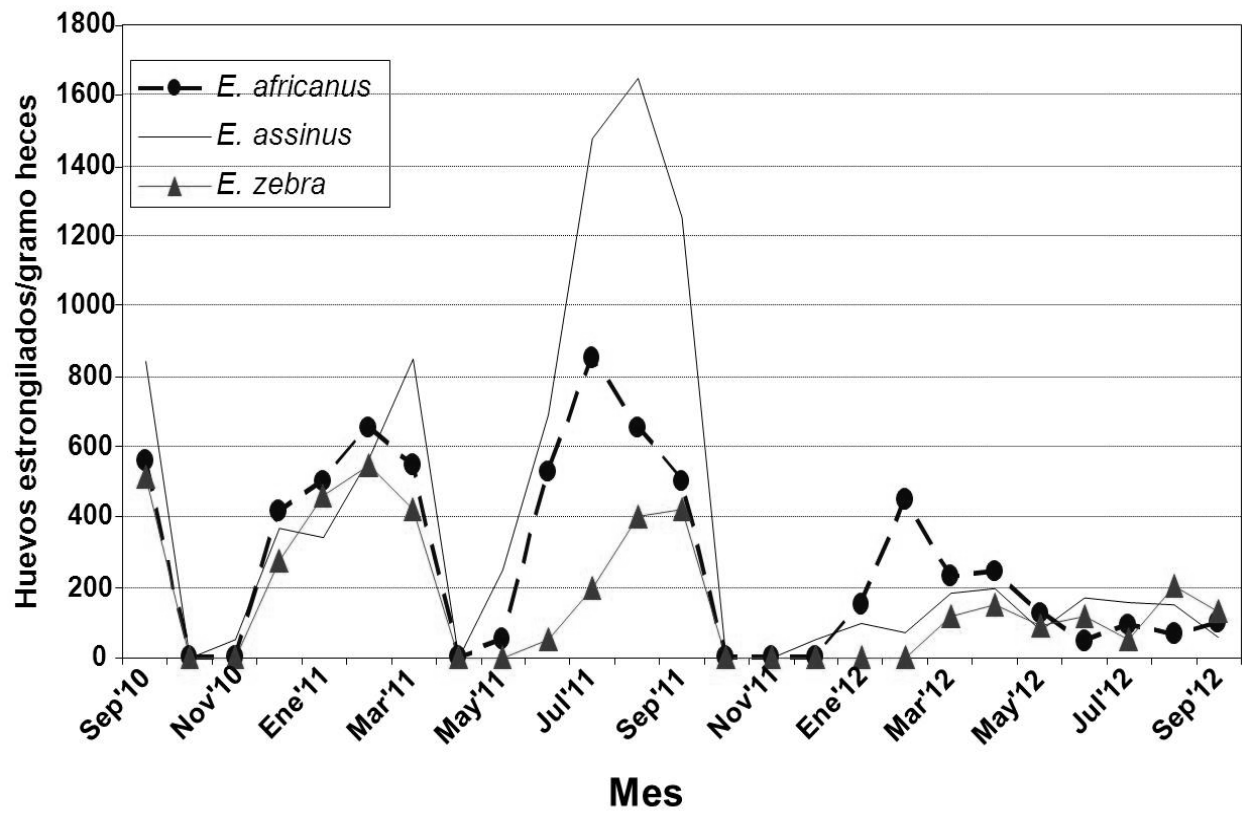


Figura 8

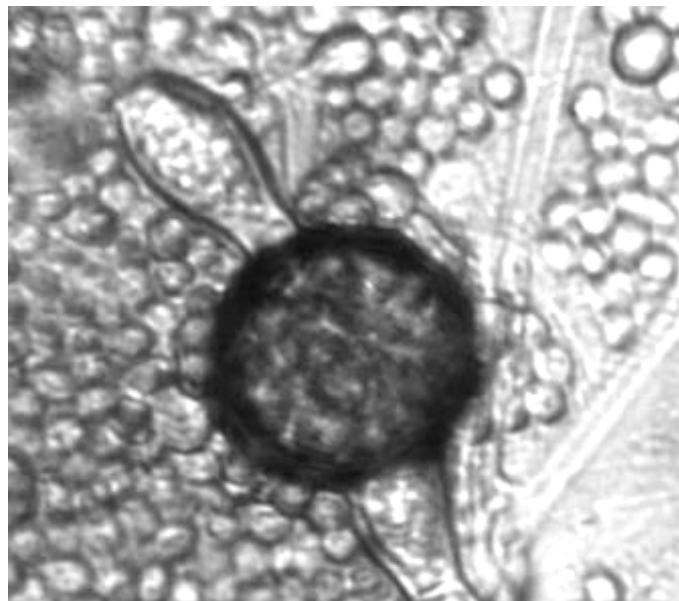
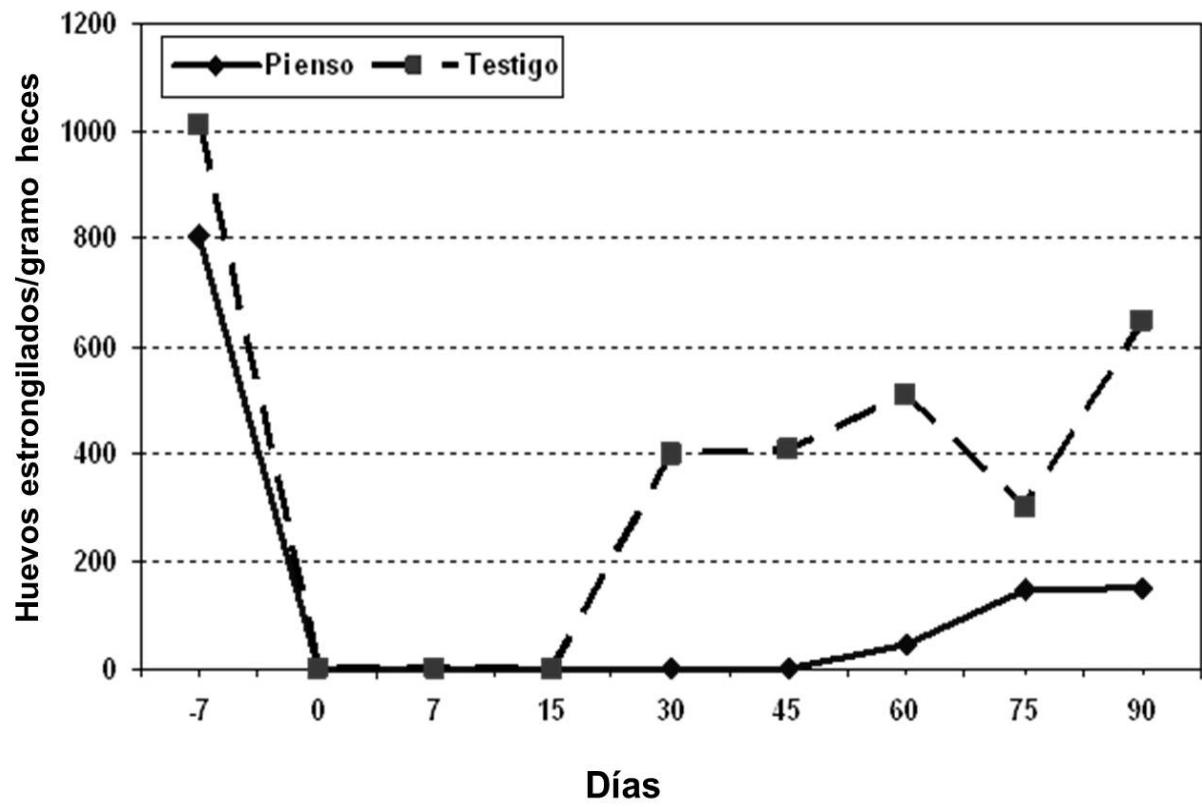


Figura 9





- ②① N.º solicitud: 201330195
②② Fecha de presentación de la solicitud: 14.02.2013
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N1/14** (2006.01)
A01N63/04 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EP 0603315 A1 (WOLSTRUP JENS ET AL.) 29/06/1994, todo el documento. Citado en la solicitud	1-34
A	US 5811092 A (PANCHAUD ELISABETH) 22/09/1998, todo el documento.	1-34
A	WO 9428725 A1 (INCITEC LTD ET AL.) 22/12/1994, todo el documento.	1-34
A	WO 8806407 A1 (HANSENS CHR BIO SYST ET AL.) 07/09/1988, todo el documento. Citado en la solicitud.	1-34

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
30.07.2013

Examinador
M. Hernandez Cuellar

Página
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.07.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-34	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-34	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	EP 0603315 A1 (WOLSTRUP JENS et al.)	29.06.1994
D02	US 5811092 A (PANCHAUD ELISABETH)	22.09.1998
D03	WO 9428725 A1 (INCITEC LTD et al.)	22.12.1994
D04	WO 8806407 A1 (HANSENS CHR BIO SYST et al.)	07.09.1988

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La invención se refiere al uso de hongos filamentosos, preferentemente de la especie *M. circinelloides*, solos o en combinación con otras especies de hongos, preferentemente *D. flagrans*, como agentes de control biológico frente a organismos tales como cestodos, trematodos y nematodos, en animales de compañía y ganado.

Una realización preferida la presente invención se refiere a un agente de control biológico que comprende al menos un hongo o a una forma reproductiva del mismo, perteneciente a la especie *M. circinelloides*, siendo preferida la cepa *M. circinelloides* CECT 20824. Alternativamente, el agente de control biológico también puede comprender al menos otro hongo o una forma reproductiva del mismo, perteneciente a la especie *D. flagrans*, siendo preferida la cepa *D. flagrans* CECET 20823.

Por último la presente invención se refiere a un método de prevención de la transmisión de enfermedades parasitarias caracterizado por la administración a un animal susceptible de padecer una enfermedad parasitaria y/o a sus heces y/o al entorno donde se encuentra, de una cantidad eficaz del agente biológico de control reivindicado.

El documento D01 describe un procedimiento de selección y aislamiento de micro-hongos para el uso en el control biológico de nematodos parásitos en animales que implica el aislamiento de los hongos mediante selección en el fluido del rumen y en el paso de dichos hongos a través de los animales.

El documento D02 describe agentes para el control biológico de los nematodos *Meloidogyne* que comprenden las cepas de *Arthrobotrys conoides* s 42A, 42A', 42B, 42Br, 42T o 42V1. También se reivindica un procedimiento para el control de nematodos seleccionados de *Meloidogyne* sp., *Heterodera* sp. y *Ditylenchus myceliophagus* en los cultivos, que comprende la incorporación del agente reivindicado en el suelo.

El documento D03 describe una composición para el biocontrol de nematodos parásitos de plantas que comprende dos hongos vivos nematófagos seleccionados para que al menos dos 2 de las siguientes clases de hongos están representados: hongos endoparásitos, hongos atrapa-nematodos y hongos parásitos de huevos.

El documento D04 divulga un método para reducir el número de nematodos parásitos en animales domésticos (cerdos, perros, gatos, caballos, ovejas, cabras, vacas, etc) y un método para reducir su transmisión mediante la administración a dichos animales de una composición que comprende un hongo nematófago que pertenece a las especies *Arthrobotrys* spp. o *Dactylaria* spp. Dicha composición parasitocida es capaz de seguir ejerciendo su actividad nematófaga después de pasar por el tracto gastrointestinal de los animales infectados, siendo por tanto útil y, ejerciendo su capacidad nematófaga, incluso en las heces de dichos animales.

1.- NOVEDAD

Entre los documentos citados en el informe de búsqueda internacional no existen referencias a la cepa CECT 20824 ni sobre agentes de control biológico que comprendan cepas de la especie *Mucor circinelloides*. En consecuencia, en opinión de esta Oficina, las reivindicaciones 1-34 cumplen el requisito de novedad establecido en el Art. 6.1 LP 11/1986.

2.- ACTIVIDAD INVENTIVA

En cuanto a la actividad inventiva, los documentos D01-D04 describen agentes de control biológico basados en hongos en los que el biocontrol se ejerce frente a nematodos parásitos. En este sentido, el problema técnico planteado es la provisión de un nuevo agente de control biológico de nematodos parasitos. La solución que proporciona la invención es un agente de control biológico que comprende hongos de la especie *Mucor circinelloides*. Considerando por ejemplo D01 como estado de la técnica más cercano, la diferencia entre este documento y la presente invención radica en que D01 basa el agente de control biológico en el hongo *D. flagrans*, mientras que el agente de biocontrol de la presente invención comprende hongos de la especie *Mucor circinelloides*. Los hongos de la especie *D. flagrans* tienen efecto larvicida y los hongos de la especie *M. circinelloide* tienen efecto ovicida. En este sentido el agente de control biológico de la invención no se puede considerar una mera alternativa. De ninguno de los documentos D01-D04, tomados solos o en combinación, se desprende de forma evidente que tal diferencia sea la causa de tal efecto. Por tanto, en opinión de esta Oficina, las reivindicaciones 1-34 cumplen el requisito de actividad inventiva establecido en el Art. 8.1 LP 11/1986.