



UNIVERSIDAD DE CIENCIAS
APLICADAS Y AMBIENTALES
U.D.C.A

Facultad de Ingeniería Agronómica



Escuela de Formación de Investigadores y Capacitación en
Agricultura Tropical - EFICAT

MAESTRIA EN AGROFORESTERIA TROPICAL

**IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DEL GENERO *Clostridium* spp., EN LOS
SISTEMAS DE PRODUCCIÓN BOVINA TRADICIONAL Y SILVOPASTORIL EN
PREDIOS DEL MUNICIPIO DE SAN MIGUEL DE SEMA, DEPARTAMENTO DE
BOYACÁ**

POR

ALDEMAR ZUÑIGA LOPEZ

**BOGOTA D.C., COLOMBIA
2013**

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS AMBIENTALES Y APLICADAS
U.D.C.A**

Facultad de Ingeniería Agronómica

**CORPORACION COLOMBIANA DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA
CORPOICA**

**Escuela De Formación de Investigadores y Capacitación en Agricultura Tropical
EFICAT**

**IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DEL GENERO *Clostridium* spp., EN LOS
SISTEMAS DE PRODUCCIÓN BOVINA TRADICIONAL Y SILVOPASTORIL EN
PREDIOS DEL MUNICIPIO DE SAN MIGUEL DE SEMA, DEPARTAMENTO DE
BOYACÁ**

Trabajo de Investigación presentado como requisito
para optar por el grado de:

Magister Scientiae en Agroforestería Tropical

Presentado Por

ALDEMAR ZUÑIGA LOPEZ

**BOGOTA D.C., COLOMBIA
2013**

CONSTANCIA APROBATORIA

El presente documento ha sido, debidamente revisado y evaluado de acuerdo a las normas establecidas por la Universidad, para validar el rigor científico de los planteamientos y conclusiones en el reflejadas, de tal manera que el mismo es aprobado por el Comité de Maestrías, en calidad requisito parcial para optar al título de:

Magister Scientiae en Agroforestería Tropical

FIRMANTES:



GERMAN ANZOLA MONTERO

Rector y Presidente del Comité de Maestrías U.D.C.A



DIEGO ORTIZ ORTEGA

Director del trabajo de investigación



MANUEL ISSAC GALLEGO MARIN

Codirector del trabajo de investigación



SANDRA STELLA UJUETA

Jurado evaluador



GIOVANNA MEZA BARRETO

Jurado evaluador

DEDICATORIA

A DIOS

Por haberme permitido culminar mi estudio y brindarme salud para poder terminar mis objetivos propuestos, gracias Señor por permitir alcanzar mis metas y le pido que las pueda disfrutar mucho tiempo.

A mi madre Sierva María

Por haberme apoyado en todos los momentos, por todos los consejos que me infundió para poder lograr esta meta, por sus valores de responsabilidad y honestidad que me ha enseñado en todo momento.

A mi padre José Delio (QEPD)

Por todo el amor que me brinda, los consejos que me ha dado y la enseñanza de trabajador que me infundía.

A mi esposa Liliana.

Por su comprensión y apoyo que me brindo durante mi carrera, por todo el tiempo que no estuve en casa por estar estudiando.

A mis Hijos Sara Gabriela, Juan David y Julián Andrés

Por su amor, comprensión y motivación que me vienen brindado para poder terminar mi tesis, por todo el tiempo que no he compartido con ellos.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Diego Ortiz.

Por todo su orientación, asesoría y enseñanza que me apporto durante el trabajo de investigación, gracias a su conocimiento y gran experiencia sobre el tema.

Al Doctor Manuel Isaac Gallego.

Por todo su colaboración, y aporte en mi trabajo y en investigación.

Al Doctor Luis Carlos Concha.

Por toda su colaboración y aporte que hizo que mi maestría se hiciera realidad.

Al Doctor Braulio Albeiro Gutiérrez.

Por su colaboración y apoyo durante el desarrollo de la maestría

A Los Compañeros Niria Bonza, Jenny Herrera, Andrés Cubides, Juan Carlos Benavides y Sebastián Fonseca.

Por todo su colaboración y apoyo incondicional durante el desarrollo de la maestría, y en general a todas aquellas personas que de una o otra manera me colaboraron para terminar satisfactoriamente con mi objetivo.

RESUMEN

Identificación de bacterias del genero *Clostridium* spp., en sistemas de producción bovina tradicional y silvopastoril en el municipio de San Miguel de Sema, departamento de Boyacá

Palabras claves: Sistema silvopastoril, sistema tradicional, *Clostridium septicum*, *Clostridium botulinum*, API 20, muerte súbita, variabilidad climática, factores de riesgo, *Trifolium repens*

Las ganaderías bovinas colombianas se ven afectadas frecuentemente por casos de mortalidad súbita, la cual se relaciona estrechamente con *Clostridium* spp., bacilos anaerobios espora formadores con componentes de pared celular Gram- positivos, los cuales se distribuyen mundialmente en toda clase de ambientes: suelo, agua, plantas y tracto gastrointestinal de animales. La investigación identificó y cuantificó UFC/g de bacteria anaerobias patógenas (*Clostridium* spp.) asociadas al suelo en sistemas de producción bovina agroforestales (silvopastoriles) y tradicionales, al tiempo que buscó correlacionar la influencia de las variables climáticas en las poblaciones bacteriales por sistema de producción.

Se realizaron aislamientos microbiológicos que permitieron la identificación bioquímica de cepas de *Clostridium septicum*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium perfringens* y *Clostridium bifermentans*, cuyas concentraciones se correlacionaron con el comportamiento de las variables climáticas registradas durante la fase experimental, concluyendo que la presencia de *Clostridium* spp es independiente del funcionamiento del sistema productivo y de las variables climáticas en ellos encontradas.

El análisis global de la información recolectada, permitió identificar variables asociadas a lograr los umbrales edafológicos y climáticos de confort y proliferación de este tipo de bacterias, de tal manera que se crea una línea base para posteriores observaciones en las cuales los sistemas agroforestales estuviesen en posibilidad de crear condiciones controladas para romper los umbrales de confort y manifestación patógena de *Clostridium* spp.

ABSTRACT

Identification of bacteria of the genus *Clostridium* spp., in traditional and silvopastorile cattle production systems in the municipality of San Miguel de Sema, Boyacá

Keywords: silvopastorile system, traditional system, *Clostridium septicum*, *Clostridium botulinum*, API 20, sudden death, climate variability, risk factors, *Trifolium repens*

The Colombian bovine herds are frequently affected by sudden death cases, which are closely related to *Clostridium* spp., spore-forming anaerobic bacilli with components of Gram-positive cell wall, which is distributed worldwide in all types of environments: soil, water, plants and animal gastrointestinal tract. The research identified and quantified CFU / g of pathogenic anaerobic bacteria (*Clostridium* spp.) associated with bovine production systems agroforestry (silvopastoral) and traditional, while seeking to correlate the influence of climatic variables on bacterial populations by system production.

Microbiological isolations were made that allowed the biochemical identification of strains of *Clostridium septicum*, *botulinum*, *beijerinckii*, *perfringens* and *bifermentans*, whose concentrations were correlated with the behavior of climate variables recorded during the experimental phase, concluding that the presence of *Clostridium* spp is independent of operation of the production system and the climatic variables they found.

The global analysis of the information collected, if allowed to identify variables associated thresholds achieve soil and climate of comfort and proliferation of this type of bacteria, so that you create a baseline for future observations in which agroforestry systems if they were in ability to create controlled conditions to break the threshold of comfort and manifestation pathogenic *Clostridium* spp.

CONTENIDO

CAPITULO I. INTRODUCCION	14
1.1 PRESENTACION	14
1.2 ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION	15
1.3 CONCRECION DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	17
1.4 OBJETIVOS	17
1.4.1 Objetivo general.....	17
1.4.2 Objetivos específicos	17
1.5 LIMITACIONES Y DELIMITACIONES	18
CAPITULO II. MARCO TEORICO	19
2.1 SISTEMAS DE PRODUCCION BOVINA EN PASTOREO TRADICIONAL	19
2.2 SISTEMAS AGROFORESTALES	20
2.2.1 Características de la agroforestería	21
2.2.2 Clasificación de los sistemas agroforestales.....	22
2.2.3 El papel potencial de los árboles.....	23
2.2.4 Interacciones: Arboles -Suelo.....	23
2.2.5 Interacciones: Arboles – Microclima.	24
2.2.6 Interacciones: Arboles – Hidrología.	24
2.2.7 Componentes biológicos asociados en sistemas Agroforestales.	25
2.2.8 Ventajas de los sistemas agroforestales	25
2.2.9 Algunas restricciones de los sistemas agroforestales.....	26
2.3 SISTEMAS SILVOPASTORILES	27
2.3.1 Árboles, maderables o frutales dispersos en potreros.....	28
2.3.2 Producción animal bajo plantaciones forestales o plantaciones de frutales	28
2.3.3 Praderas en callejones de árboles.....	29
2.3.4 Cercas vivas y barreras vivas.....	29
2.3.5 Cortinas rompevientos.....	30
2.3.6 Bancos forrajeros puros o en policultivos de varios estratos	31
2.3.7 Sucesión vegetal manejada.....	32
2.3.8 Ventajas de los sistemas silvopastoriles.....	33
2.3.9 Desventajas de los sistemas silvopastoriles.....	33
2.4 SÍNDROME MUERTE SÚBITA EN BOVINOS	33

2.4.1 Enfermedades que pueden causar muerte súbita en bovinos	34
2.5 GENERALIDADES DEL GÉNERO Clostridium Y ENFERMEDADES QUE CAUSAN	37
2.5.1 Habitats.....	37
2.5.2 Botulismo producido por <i>Clostridium botulinum</i> tipos C y D	39
2.5.3 Enterotoxemia <i>Clostridium perfringens</i>	39
2.5.4 Toxina épsilon	39
2.5.5 Toxinas alfa y beta	40
2.5.6 Carbunco sintomático (<i>Clostridium chauvoei</i>).....	40
2.5.7 Edema maligno (<i>Clostridium septicum</i>).....	41
2.5.8 <i>Clostridium novyi</i>	42
2.6 VARIABLES CLIMATOLÓGICAS OBJETO DE ESTUDIO.....	42
2.6.1 Temperatura.....	42
2.6.2 Humedad relativa.	43
2.6.3 Precipitación.	43
CAPITULO III. METODOLOGÍA.....	44
3.1 DEFINICIÓN Y UBICACIÓN DEL ÁREA EXPERIMENTAL	44
3.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS SISTEMAS PRODUCTIVOS TRADICIONAL Y SILVOPASTORIL ..	45
3.3 TIPO DE ESTUDIO Y TAMAÑO DE LA MUESTRA.....	46
3.3.1 Tipo de estudio	46
3.3.2 Definición y tamaño de la Muestra	46
3.3 DISEÑO Y APLICACIÓN DE ENCUESTAS	47
3.4. PROTOCOLOS	48
3.4.1 Toma de muestras	48
3.4.2 Procesamiento de muestras.....	48
3.4.3 Aislamiento y purificación de cepas	49
3.4.4 Caracterización bioquímica	49
3.4.5 Recuento de <i>Clostridium</i> spp en las muestras	49
3.5 MEDICIONES DASOMÉTRICAS DE LOS ARBOLES.....	50
3.6 VARIABLES CLIMATOLÓGICAS.....	50
3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	51
CAPITULO IV. RESULTADOS.....	52

4.1 OBJETIVO ESPECIFICO 1. CARACTERIZAR LOS PREDIOS DEL MARCO MUESTRAL DE LOS SISTEMAS DE PRODUCCIÓN TRADICIONALES Y SILVOPASTORILES, DEL MUNUCIPIO DE SAN MIGUEL DE SEMA (DEPARTAMENTO DE BOYACA)	52
4.1.1 Criterios para la selección de fincas por sistema	52
4.1.2 Fincas objeto de estudio	54
4.2 OBJETIVO ESPECIFICO 2. “AISLAR, IDENTIFICAR Y CUANTIFICAR UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS DE BACTERIAS PATOGENAS DEL GENERO Clostridium ENCONTRADAS EN CADA SISTEMA PRODUCTIVO (TRADICIONAL Y SILVOPASTORIL), A PARTIR DE MUESTRAS DE SUELOS” E INFERIR SUS RELACIONES CON VARIABLES CLIMATICAS”	65
4.2.1 Muestreo de suelos, procesamiento de las muestras de suelos, aislamiento y purificación de cepas clostridiales y caracterización y cuantificación unidades formadoras de colonias.	65
4.2.2 Caracterización e identificación de bacterias	65
4.2.3 Presencia y recuento de unidades formadoras de colonias.....	67
4.2.4 Análisis de la concentración y distribución del tipo de <i>Clostridium spp.</i> Encontrado por época, tipo y sistema de producción	71
4.2.4.1 Tendencias de la presencia de <i>clostridium spp</i> patógenos por época y sistema	71
4.3 COMPORTAMIENTO DE VARIABLES CLIMATICAS	73
4.3.1 Fluctuaciones de Temperatura.....	73
4.3.2 Fluctuaciones de precipitación	74
4.3.3 Fluctuaciones de humedad relativa.....	76
4.3.5 Correlaciones integradas entre UFC/ g y las variables climáticas.....	79
4.4 OBJETIVO 3: IDENTIFICAR POTENCIALES EVENTOS DE INFECCIÓN CLOSTRIDIAL EN LOS SISTEMAS DE PRODUCCIÓN	82
4.5 OBJETIVO 4: PROPONER ESTRATEGIAS DE MANEJO PARA LOS TIPOS DE Clostridium SPP, IDENTIFICADOS Y CARACTERIZADOS EN LOS SISTEMAS DE PRODUCCIÓN BOVINA TRADICIONAL Y SILVOPASTORIL.	87
CAPITULO V. METANALISIS Y DISCUSIÓN.....	89
5.1 INFLUENCIA DE LOS SISTEMAS EN LA PRESENCIA DE ESPECIES DE <i>Clostridium spp.</i>	89
5.2 CONCENTRACIÓN DE <i>Clostridium spp.</i> EN SUELO.....	90
5.3 CORRELACIÓN DE VARIABLES CLIMÁTICAS CON LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS PERTENECIENTES AL GÉNERO CLOSTRIDIUM SPP.....	91
5.4 EXPONER CON BASE EN LOS RESULTADOS ENCONTRADOS, LOS RIESGOS DE INFECCIONES CLOSTRIDIALES EN LOS SISTEMAS DE PRODUCCION TRADICIONAL Y SILVOPASTORIL.	92
CAPITULO VI. CONCLUSIONES	95
6.1 RECOMENDACIONES	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de un sistema silvopastoril	28
Figura 2. Distribución en un sistema silvopastoril de árboles en hileras	29
Figura 3. Distribución en un sistema silvopastoril de cercas vivas	30
Figura 4. Distribución en un sistema silvopastoril de bancos de proteína	32
Figura 5. Localización del Municipio de San Miguel de Sema	45
Figura 6. Diagrama de procesamiento de muestras	50
Figura 7. Ubicación Fincas evaluadas en el Municipio de San Miguel de Sema.	52
Figura 8. Fotografía de árboles sauce distribuidos en línea.	54
Figura 9. Foto satelital de la finca Nueva Zelanda de sistema silvopastoril	55
Figura 10. Foto satelital tomada a la finca Berlín de sistema silvopastoril	56
Figura 11. Fotografía tomada a la finca la Bonita de sistema silvopastoril	57
Figura 12. Foto satelital tomada a la finca El Prado de sistema Tradicional	61
Figura 13. Foto satelital tomada a la finca El Silencio de sistema Tradicional	62
Figura 14. Fotografía tomada a la finca El Diamante de sistema tradicional	63
Figura 15. Pruebas bioquímicas colorimétricas para determinar la especie de <i>Clostridium spp.</i> aislada en la finca el Prado con su respectivo formato de registro de datos	66
Figura 16. Identificación bioquímica obtenida por el procesamiento de los datos con el software API-Web® para la finca El Prado.	66
Figura 17. Tendencias de la presencia de <i>clostridium spp</i> patógenos por época y sistema	71
Figura 18. Fluctuaciones de Temperatura mínima y máxima mensual.	73
Figura 19. Fluctuaciones de Precipitación mensual por sistema	75
Figura 20 . Promedios mensuales del porcentaje de humedad relativa por sistema	76
Figura 21. Distribución de la razón UFC/g. _ temperatura _ precipitación	80
Figura 22. Distribución de la razón UFC/g. _ temperatura _ precipitación _ finca	81
Figura 23 Dispersión de UFC/g.	83
Figura 24. Tendencias de medias, máximas y mínimas de las UFC/g, por sistema durante la fase experimental	85
Figura 25. Precipitación, Humedad relativa y Temperaturas máxima y mínima	86

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Distribución de fincas por sistema	53
Tabla 2. Datos obtenidos de las medidas dasométricas de uno de los segmentos arbolados de la finca Nueva Zelanda.	55
Tabla 3. Datos obtenidos de las medidas dasométricas de uno de los segmentos arbolados de la finca	57
Tabla 4 . Datos obtenidos de las medidas dasométricas de uno de los segmentos arbolados de la finca	58
Tabla 5. Ponderación de la sombra finca Nueva Zelanda con base en la densidad arboles	60
Tabla 6. Ponderación de la sombra finca Berlín con base en la densidad arboles	60
Tabla 7 . Ponderación de la sombra finca La Bonita con base en la densidad arboles	61
Tabla 8. Componente pecuario y animal de las fincas de estudio.	64
Tabla 9. Resumen de características de cultivo de las muestras en épocas seca	68
Tabla 10. Resumen de características de cultivo de las muestras en épocas seca	70
Tabla 11. Resumen del recuento de UFC/g en números absolutos por periodo durante la fase experimental.	71
Tabla 12. Frecuencias de UFC/g por tipo de <i>Clostridium spp</i>, aislado y sistema de producción	72
Tabla 13. Valores P para distribución normal de UFC/g. Acumuladas	72
Tabla 14. Distribución normal y estadísticos de Fluctuaciones de Temperatura por sistema	74
Tabla 15. Estadísticos descriptivos para temperatura	74
Tabla 16. Distribución normal y estadísticos para distribución normal de precipitación por sistema	75
Tabla 17. Distribución normal y estadísticos para distribución normal de humedad	77

relativa por sistema

Tabla 18 . Correlaciones entre variables climáticas por sistema	78
Tabla 19.. Contraste de varianzas de la razón UFC/g. _ temperatura _ precipitación _ finca	81
Tabla 20. Tabla de frecuencias de <i>Clostridium ssp</i>, patógenos, por tipo de <i>Clostridium</i> y sistema	82
Tabla 21 Tabla de frecuencias de <i>Clostridium ssp</i>. por sistema, predio y tipo de <i>Clostridium</i>	83
Tabla 22 Variables de contraste y asociación	84
Tabla 23 Variables de contraste y asociación	85
Tabla 24. Medias de concentración de UFC/g por época y sistema	90

CAPITULO I. INTRODUCCION

1.1 PRESENTACION

En Colombia existen factores de riesgo asociados a la presencia de enfermedades que causan la muerte repentina en el ganado bovino, fenómeno que afecta sustancialmente a los sistemas de producción ganadera, ya que lesionan la estructura económica y la sostenibilidad de las explotaciones, con el agravante de que muchas de ellas constituyen una problemática de salud pública. (Reyes *et al.*, 2004).

Varios agentes etiológicos que cursan con un cuadro neuromuscular han sido relacionados con la muerte repentina del ganado: rabia bovina, botulismo, carbón bacteriano (ántrax o carbunco), carbón sintomático, plantas tóxicas, fiebre de garrapatas, intoxicación por nitritos y nitratos, deficiencia de tiamina, deficiencia de minerales, lesiones neurológicas asociadas a virus (particularmente *Herpesvirus*), y aun las mordeduras de culebra (Blood, Radostitis & Henderson, 1986), citado por (Benavides, 2004). De estas enfermedades, el botulismo, y el carbón sintomático son causadas por bacterias del genero *Clostridium* spp.

Las patologías asociadas con el género *Clostridium* spp., son de curso agudo y su efecto patógeno se relaciona principalmente con el tipo de toxinas que producen, las cuales afectan diferentes tejidos corporales. En la mayoría de los casos su efecto es tan rápido que los animales no presentan sintomatología clínica o ésta es poco evidente, lo que dificulta su diagnóstico y su tratamiento; la enfermedad afecta animales en muy buenas condiciones corporales y que generalmente no presentan signos y síntomas clínicos. Por la agudeza de la enfermedad, en el examen post-mortem no se encuentran lesiones de algún tipo, dificultando el diagnóstico patológico, clínico, microbiológico, o de otra índole, causando confusión en los profesionales de campo y en los productores. El cuadro clínico culmina casi siempre con la muerte de los animales afectados (Ortiz & Benavides, 2002).

En el municipio de San miguel de Sema, departamento de Boyacá, se presentó un episodio de mortalidad bovina de más de 600 animales en pastoreo (principalmente de las razas holstein y normando), los cuales, según los productores, murieron después de las inundaciones generadas en diversas zonas del municipio, aledañas a la laguna de Fúquene, durante la temporada de lluvias en el año 2010.

Esta no es la primera vez que se presentan eventos de muerte repentina del ganado en Colombia, ya que a mediados de los noventa, en la altillanura colombiana, murieron más de 6.000 bovinos, en especial vacas recién paridas y novillas de buena condición corporal, en eventos asociados al denominado síndrome de muerte súbita (Benavides, 2004).

Las investigaciones realizadas en la búsqueda de la etiología de estos eventos, concluyen atribuyendo como una de las principales causas, la presencia de bacterias del genero *Clostridium* spp., las cuales están asociadas al suelo e incrementan su actividad después de fuertes

temporadas de lluvias y condiciones de temperatura elevadas (Gomes, 2011 y Ortiz & Villamil, 2008).

Si bien es cierto se conoce que las bacterias del genero *Clostridium* presentan estos comportamientos asociados al suelo y a los cambios ambientales que surgen en los agroecosistemas, sinergias que a su vez están asociadas a la disponibilidad de forrajes y hábitos alimenticios de los animales; también es cierto que se encuentran estudios en los cuales se afirma que los sistemas silvopastoriles, fuera de potencializar la oferta y la calidad del forraje a través del año (Ruiz *et al.*, 2008, Sánchez, 1998 y Mahecha, 2002), generan microambientes que se traducen en aumentos de materia orgánica y ciclaje de nutrientes en el suelo, junto a una más estrecha estabilidad y mantenimiento de las variables climáticas temperatura y humedad relativa, que bien pueden estar asociadas a la presencia, activación o latencia de los *Clostridium* spp.

En este contexto, el presente trabajo buscó aislar, identificar y cuantificar bacterias patógenas del genero *Clostridium*, catalogadas como agentes etiológicos de enfermedades en bovinos, en los sistemas de producción tradicional y silvopastoril; con el propósito de tratar de correlacionar la presencia, identidad y cantidad de las bacterias en el sistema, con la estructura y funcionalidad del mismo, y con las variables climáticas temperatura, precipitación y humedad relativa.

1.2 ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION

En el año 1996 Parra y colaboradores explicaron un evento presentado en los departamentos de Meta y Vichada, Colombia, en el que de forma inusual morían vacas de buena condición corporal, después de un periodo variable de entre 1 a 20 días, periodo en el cual fue evidente un agudo y progresivo menoscabo y muerte del animal. En la búsqueda de etiologías, evaluaron el contenido de nutrientes de las pasturas y de las sales mineralizadas otorgadas a los animales en las zonas afectadas, y establecieron que las pasturas, históricamente adaptadas a las condiciones de fertilidad de los suelos de los departamentos del Meta y Vichada, no presentaban contenidos de proteína cruda, Ca, P, Mg, S, Zn y Cu, que cumplieran con los requerimientos nutricionales mínimos de bovinos para crecimiento, mantenimiento, gestación y lactancia, y que las sales mineralizadas suministradas tenían contenidos inferiores a los de su óptima formulación, concluyendo que estas deficiencias de nutrientes y de minerales como el fósforo y el calcio, conllevan a los bovinos a buscar estos elementos de otras fuentes, alterando su comportamiento alimenticio normal al ingerir una serie de alimentos extraños como carroña, huesos, tierra, cemento, entre otros, los que pudieron vehiculizar agentes patógenos causantes de intoxicaciones por toxina botulínica, y otras toxinas propias de la descomposición bacteriana de las proteínas. Este marco condujo a establecer que el botulismo, la rabia y la intoxicación por plantas son las tres causas más importantes de muerte súbita en la Altillanura colombiana.

Con base en la investigación realizada por Parra *et al.*, (1996), Ortiz & Benavides (2000) realizaron una investigación para determinar el grado de responsabilidad que tenían las neurotoxinas tipo C y D de *Clostridium botulinum* en la mortalidad de bovinos afectados por síndrome neuroparalítico en la Orinoquia Colombiana, encontrando que los principales factores de riesgo asociados al problema de mortalidad de la zona fueron: el consumo de huesos por parte

de los animales, la no quema de cadáveres de animales muertos repentinamente y la no quema de la sabana nativa en época de verano. El estudio mostró que efectivamente algunos de los animales murieron por una intoxicación alimentaria, proveniente del consumo de huesos, según los análisis realizados, a partir de muestras, de contenido intestinal, contenido ruminal e hígado, en las que se encontraron trazas de las neurotoxinas.

En otro estudio epidemiológico realizado por Ortiz, Villamil y Benavides (2001), se demostró que el grupo de animales con mayor riesgo de sufrir botulismo eran las hembras mayores de dos años de edad en buena condición corporal. Los resultados indicaron que la mortalidad se presentaba, principalmente en la épocas de lluvias y que concordaba con los máximos picos de precipitación.

Partiendo del referente en lo que concierne a los episodios de mortalidad bovina observados en el municipio de San Miguel de Sema durante la ola invernal del 2010, Fonseca *et al.*, (2010), realizaron un estudio en el municipio de Mosquera, Cundinamarca el cual también se vio afectado por varias inundaciones, obteniendo asilamientos e identificación bioquímica de *Clostridium spp* patógenos, en muestras de suelos de los predios ganaderos afectados; estos suelos contenían bacterias del género *Clostridium spp.*, correspondientes a *C. botulinum* y *C. septicum*, ambos causantes de muerte de bovinos.

En esta misma dirección Ortiz (2010), realizó el aislamiento y caracterización molecular de bacterias anaerobias asociadas al suelo en zonas ganaderas que presentaron muerte de bovinos, muertes que estuvieron asociadas a la presencia de *Clostridium spp*, en los municipios de Mariquita, Puerto López, Nemocón y Ubaté; detectando que la prevalencia de *Clostridium spp* en las fincas fue del 27,3%. En este trabajo se concluyó además que los niveles de temperatura y precipitación elevados, favorecen la presentación de brotes epidémicos de mortalidad súbita y la eliminación inadecuada de cadáveres resultó ser el principal factor de riesgo, para que los animales contrajeran la enfermedad.

En atención al impacto económico y social que conlleva la pérdida masiva e inesperada de animales en un sistema productivo especializado (producción de leche), como es el reportado para el municipio de San miguel de Sema, departamento de Boyacá, donde murieron más de 600 animales, junto a la inquietud del Comité de Ganaderos de Chiquinquirá, quienes estimaron en el año 2010 un total de 17.000 cabezas de ganado en alerta de ser objeto de patologías y muerte inespecíficas, Corpoica y el Comité de Ganaderos de Chiquinquirá han venido trabajando para buscar respuestas de estos acontecimientos y ofrecer soluciones a los productores asentados en el área de influencia de dicho Comité.

Esta realidad del sector lechero regional, motivó diseñar y desarrollar el presente trabajo, tratando de contribuir a las observaciones epidemiológicas realizadas por: Parra (1996), Ortiz & Benavides (2000), Villamil y Benavides (2001), Ortiz, Villamil y Benavides (2001), (Benavides, 2004), Ortiz (2010) y Fonseca *et al.*, (2010), indagando si en la estructura y funcionamiento del sistema productivo tradicional o silvopastoril, se encontraban variables que hicieran posible inferir indicadores en favor o en contra de la presencia, niveles y tipo de bacterias del género *Clostridium spp*; conclusiones que permitirían formular recomendaciones para el manejo de los agroecosistemas y los sistemas de explotación bovina tradicional o silvopastoril, presentes en el

área de estudio, como alternativas en el manejo de estas patologías inespecíficas y en las cuales los clostridios, siempre están como protagonistas de acuerdos y desacuerdos.

De esta síntesis se extraen como elementos de reflexión: los clostridios son habitantes naturales del suelo; su dinámica de latencia y virulencia ligada a variaciones climáticas (temperatura y precipitación); los sistemas silvopastoriles modifican las condiciones del suelo y crean condiciones micro climáticas en los ambientes en los cuales están establecidos que pueden actuar en favor o en contra de la proliferación clostridial.

1.3 CONCRECIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

El problema de investigación propuesto se concreta en indagar si las especies y concentración (UFC) de *Clostridium spp*, encontrados en un marco muestral de predios ganaderos organizados como sistemas tradicionales o silvopastoriles, están influenciados por la estructura y funcionamiento del sistema de producción y las condiciones climáticas de temperatura, precipitación y humedad relativa.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo general

Identificar la presencia de bacterias del género *Clostridium spp.*, encontradas en muestras de suelo de sistemas de producción bovina tradicional y silvopastoril en predios del municipio de San Miguel de Sema, (Departamento de Boyacá) y establecer la relación con sus variables climáticas.

1.4.2 Objetivos específicos

Objetivo 1: Caracterizar los Sistemas de Producción Tradicionales y Silvopastoriles, del Municipio de San Miguel de Sema, seleccionados como marco muestral del estudio

Objetivo 2. Aislar, identificar y cuantificar unidades formadoras de colonias de bacterias patógenas del género *Clostridium*, encontradas en cada sistema productivo (Tradicional y Silvopastoril), a partir de muestras de suelos, e inferir sus relaciones con las variables climáticas

Objetivo 3: Identificar potenciales eventos de infección clostridial en los sistemas de producción

Objetivo 4: Proponer estrategias de manejo, para los tipos de *Clostridium spp*, identificados y caracterizados en los sistemas de producción bovina tradicional y silvopastoril.

1.5 LIMITACIONES Y DELIMITACIONES

La definición del área de estudio obedeció a criterios tales como:

- Ser un área que presento casos de muerte con diagnostico inespecífico.
- Contar con el interés de un grupo de productores locales para facilitar sus predios como unidades observacionales, y permitir la toma de datos y el suministro de la información requerida.
- Disponibilidad de sistemas de producción tradicionales y silvopastoriles

La definición de los sistemas tradicionales y silvopastoriles objeto de observación, se concretaron con base en que estuvieran ubicados en agroecosistemas lo más homogéneos posible.

Los sistemas silvopastoriles, se seleccionaron con base en que cumplieran como requisitos, tener la misma especie arbórea y en el mismo arreglo.

Las metodologías y protocolos utilizados en la búsqueda, caracterización y tipificación de *Clostridium spp*, son las disponibles técnica y logísticamente en Corpoica.

La identificación de *Clostridium spp*, se limitó a características bioquímicas y microbiológicas.

El número de fincas observadas, si bien fue calculada mediante procedimientos utilizados en trabajos de esta cohorte (Ortiz, Benavidez, Villamil), se ajustó a seis predios, tres tradicionales y tres silvopastoriles en atención a:

- Disponibilidad de tiempo y equipos de laboratorio.
- Costos de materiales y reactivos específicos principalmente.

CAPITULO II. MARCO TEORICO

En este aparte se incorporan los elementos bibliográficos que contextualizan:

- Los escenarios de los sistemas de producción bovina tradicional y silvopastoril.
- Los factores asociados como etiología del denominado síndrome de muerte súbita.
- Las variables objeto de estudio.

2.1 SISTEMAS DE PRODUCCION BOVINA EN PASTOREO TRADICIONAL

Son sistemas de producción en los cuales la base la de alimentación de los animales, está representada por el consumo directo de los forrajes por parte de los animales en las praderas. La finalidad básica de un sistema de pastoreo es lograr mantener una alta biomasa de forraje, por largos periodos de tiempo manteniendo un balance favorable entre las especies forrajeras (gramíneas y leguminosas); buscando una eficiente utilización del forraje producido y lograr una producción ganadera rentable.

Tipos de Pastoreo

- **Pastoreo Continuo:** Se refiere a un sistema extensivo de pastoreo en el cual el animal permanece durante un período prolongado en el mismo potrero. Este sistema es generalmente utilizado en los pastos naturales en los cuales por su escasa producción y crecimiento no se justifica la subdivisión de potreros. Por regla general, la capacidad de carga de estos sistemas es relativamente baja, los potreros se sub-pastorean durante la época de lluvia y se utilizan en exceso durante las épocas secas, con el consiguiente deterioro de la cobertura forrajera.
- **Pastoreo Rotacional:** Es la práctica en la cual los animales se mueven de un potrero a otro con el fin de utilizar más eficientemente toda la pastura. Se refiere a un sistema intensivo de manejo de pasturas, en el cual el área de pastoreo se subdivide en cierto número de potreros destinados a que el ganado utilice las praderas en forma rotacional, aprovechándolos por períodos cortos y permitiéndoles un tiempo adecuado para su recuperación.

En estos sistemas la mano de obra utilizada es mínima y existe una escasa o nula asesoría profesional, lo que conlleva a que las explotaciones tiendan a estandarizarse en niveles muy por debajo de los óptimos de producción (Russo, 1994).

En la zona de estudio, enmarcada en lo que geográficamente se conoce como el Valle de Ubaté – Chiquinquirá existe una alta heterogeneidad de sistemas bovinos productivos orientados hacia la producción de leche y en los cuales es común encontrar diversidad de tecnificación y manejo, que van desde lo artesanal hasta altamente tecnificados.

Como sistemas básicos de explotación están:

- El sistema de pastoreo extensivo tradicional que se caracteriza por la incorporación de prácticas culturales de manejo de las praderas y los animales dirigidas a preservar o mantener las capacidades productivas del sistema ganadero; la base fundamental de la producción es la pradera natural o introducida de baja productividad (Mahecha et al. 2002) .
- En el sistema de pastoreo extensivo mejorado, el productor establece relaciones técnicas dirigidas a potenciar la productividad, tanto de la tierra como la de los animales. Aunque la base de la producción sigue siendo el pastoreo, se cuenta con pastos mejorados en asociaciones con leguminosas nativas o introducidas, manejados en forma más intensiva, con control de malezas y aplicación de fertilizantes; se cuenta con suministro permanente de sales mineralizadas, en muchos casos formuladas para corregir las deficiencias del forraje; manejo sanitario de tipo preventivo; programas de reproducción y mejoramiento genético basados en monta controlada e inseminación artificial (Mahecha et al. 2002) .
- El sistema de pastoreo semi-intensivo suplementado se desarrolla en zonas cercanas a los centros urbanos, con un alto grado de presión económica sobre la tierra. Se practica un manejo intensivo de pastos de alto rendimiento, con cercas eléctricas, riego y fertilización periódicos, esto asociado a programas de suplementación alimenticia; además, se da una alta vinculación con la agroindustria pecuaria (Mahecha et al. 2002).

2.2 SISTEMAS AGROFORESTALES

La agroforestería es un nombre colectivo para todos los sistemas de uso de la tierra donde plantas leñosas perennes se siembran y crecen en asocio con plantas herbáceas y/o ganado, existiendo entre estos componentes interacciones ecológicas y económicas (Escobar, 1993).

Cualquiera sea la definición, generalmente se está de acuerdo en que la agroforestería representa un concepto de uso integrado de la tierra que se adapta particularmente a las zonas marginales y a los sistemas de bajos insumos. El objetivo de la mayoría de los sistemas agroforestales es el de optimizar los efectos benéficos de las interacciones de los componentes boscosos con el componente animal o cultivo para obtener un patrón productivo que se compara con lo que generalmente se obtiene de los mismos recursos disponibles en el monocultivo, dadas las condiciones económicas, ecológicas, y sociales predominantes (Nair 1985).

Son varias las definiciones que se dan al término agroforestería desde hace ya varios años, todas apuntan a la asociación de varios componentes que incluyen una especie leñosa primordialmente, con una especie herbácea (cultivo, pastos) y/o animales en forma secuencial ya sea en la misma unidad de terreno o separados; con la condición de que existan interacciones de tipo biológico o económico.

El International Research Council for Research in Agroforestry define la agroforestería como un sistema sostenible del manejo de la tierra que aumenta su rendimiento, combina la producción de cultivos con especies forestales y/o animales en forma simultánea o secuencial sobre la misma superficie de terreno y aplica prácticas de manejo que son compatibles con las prácticas culturales de la población local (Krishnamurthy & Ávila, 1999).

Young, (1990), define la práctica agroforestal como un arreglo diferenciable del componente leñoso con cultivos, pastos o animales en el espacio y en el tiempo en una misma unidad de terreno o separados.

El Centro Mundial Agroforestal (ICRAF) 1997, la define como un sistema dinámico basado ecológicamente, en el manejo de los recursos naturales, que a través de la integración de árboles en las tierras agrícolas y de pastizales, diversifica y sostiene la producción para aumentar los beneficios ambientales, económicos y sociales de los usuarios de la tierra en todos los niveles.

Lundgren y Raintree (1983) proponen definir la agroforestería como un nombre colectivo para los sistemas del uso de la tierra y tecnologías donde las perennes leñosas (árboles, arbustos, palmas, bambúes etc.) se usan deliberadamente en las mismas unidades de manejo de tierra con cultivos agrícolas y/o animales en alguna forma de arreglo espacial o secuencia temporal.

A su vez y siendo el concepto que acogemos en nuestro caso, Somarriba (1998) define la agroforestería como una forma de cultivo múltiple en el que se cumplen tres funciones fundamentales.

Existen al menos dos especies de plantas que interactúan biológicamente.

Al menos uno de los componentes es una leñosa perenne

Al menos uno de los componentes es una planta manejada con fines agrícolas (incluyendo los pastos).

2.2.1 Características de la agroforestería

Farrell y Altieri (1999) sostienen que las principales características de la agroforestería son:

Estructura: A diferencia de la agricultura y la actividad forestal modernas, la agroforestería combina árboles, cultivos y animales. En el pasado, los agricultores rara vez consideraban útiles a los árboles en el terreno para el cultivo, mientras que los forestales han tomado los bosques simplemente como reservas para el crecimiento de árboles (Nair 1993).

Sustentabilidad: La agroforestería optimiza los efectos beneficiosos de las interacciones entre las especies boscosas y los cultivos o animales. Al utilizar los ecosistemas naturales como modelos y al aplicar sus características ecológicas al sistema agrícola, se espera que la productividad a largo plazo pueda mantenerse sin degradar la tierra. Esto resulta particularmente importante si se considera la aplicación actual de la agroforestería en zonas de calidad marginal de la tierra y baja disponibilidad de los insumos.

Incremento en la productividad: Al mejorar las relaciones complementarias entre los componentes del predio, con condiciones mejoradas de crecimiento y un uso eficaz de los recursos naturales (espacio, suelo, agua, luz), se espera que la producción sea mayor en los sistemas agroforestales que en los sistemas convencionales de uso de la tierra.

Adaptabilidad cultural/socioeconómica : A pesar de que la agroforestería es apropiada para una amplia gama de predios de diversos tamaños y condiciones socioeconómicas, su potencial ha sido particularmente reconocido para los pequeños agricultores en áreas marginales y pobres de las

zonas tropicales y subtropicales. Si se considera que los campesinos generalmente no son capaces de adoptar tecnologías muy costosas y modernas, que han sido pasados por alto por la investigación agrícola y que no tienen poder social o político de discernimiento, la agroforestería se adapta particularmente a las realidades de los pequeños agricultores.

2.2.2 Clasificación de los sistemas agroforestales

Varios criterios se pueden utilizar para clasificar las prácticas y sistemas agroforestales. Se utilizan más corrientemente la estructura del sistema (composición y disposición de los componentes), función, escala socioeconómica, nivel de manejo y la distribución ecológica.

En cuanto a la estructura, los sistemas agroforestales pueden agruparse de la siguiente manera:

- Agrosilvicultura: el uso de la tierra para la producción secuencial o concurrente de cultivos agrícolas y cultivos boscosos.
- Sistemas silvopastorales: sistemas de manejo de la tierra en los que los bosques se manejan para la producción de madera, alimento y forraje, como también para la crianza de animales domésticos.
- Sistemas agrosilvopastorales: sistemas en los que la tierra se maneja para la producción concurrente de cultivos forestales y agrícolas y para la crianza de animales domésticos.
- Sistemas de producción forestal de multipropósito: en los que las especies forestales se regeneran y manejan para producir no sólo madera, sino también hojas y/o frutas que son apropiadas para alimento y/o forraje.

Otros sistemas agroforestales se pueden especificar, como la apicultura con árboles, la acuicultura en zonas de manglar, lotes de árboles de multipropósito.

Los componentes se pueden disponer temporal o espacialmente y se utilizan varios términos para señalar las variadas disposiciones.

La base funcional se refiere al producto principal y al papel de los componentes, en particular los arbolados.

Estos pueden ser funciones productivas (producción de las necesidades básicas, como alimento, forraje, leña, otros productos) y roles protectores (conservación del suelo, mejoramiento de la fertilidad del suelo, protección ofrecida por los rompevientos y los cinturones de protección).

Basándose en la ecología, los sistemas se pueden agrupar para cualquier zona agroecológica definida como las zonas tropicales húmedas de las tierras bajas, zonas tropicales áridas y semiáridas, tierras altas tropicales.

La escala socioeconómica de la producción y el nivel de manejo de los sistemas se pueden utilizar como los criterios para designar a los sistemas como comerciales, intermedios o de subsistencia. Cada uno de estos criterios tiene méritos y aplicabilidad en situaciones específicas, pero también tienen limitaciones, por lo que ninguna clasificación única se puede aplicar universalmente. La clasificación dependerá del propósito para el que se planifique.

Los niveles jerárquicos son los siguientes con sus diferentes categorías:

Nivel 1: Sistemas: agrosilvícola (componente agrícola asociado a componente forestal), silvopastoril (componente pecuario asociado a componente forestal) y agrosilvopastoril (componentes forestal, pecuario y agrícola asociados).

Nivel 2: Tecnología agroforestales: cercas vivas, cortinas rompeviento, cultivos en fajas, Barbecho o rastrojo, barreras antierosivas, lotes multipropósitos, huertos familiares entre otros.

Nivel 3: Prácticas agroforestales: puede resumirse a una tecnología agroforestal al nivel local, dependiendo de parámetros socioculturales.

2.2.3 El papel potencial de los árboles

Los árboles generalmente se subutilizan en la agricultura y, si bien se ha escrito mucho respecto a sus virtudes (Smith 1968, Douglas y Hart 1976, MacDaniels y Lieberman 1979), su potencial se ha explotado relativamente poco. A causa de sus hábitos de crecimiento y su forma, los árboles influyen a otros componentes del sistema agrícola. Sus grandes doseles afectan la radiación solar, precipitaciones y movimiento del aire, a la vez que su extenso sistema de raíces ocupa grandes volúmenes de suelo. La absorción de agua y nutrientes y la redistribución de los nutrientes como el humus, al igual que el movimiento eruptivo de las raíces y las posibles asociaciones bacteriales y fungales, también pueden alterar el ambiente de crecimiento.

Los árboles pueden mejorar la productividad de un agro ecosistema, al influir en las características del suelo, del microclima, de la hidrología y de otros componentes biológicos asociados.

2.2.4 Interacciones: Árboles -Suelo

Los árboles pueden afectar el nivel de nutrientes del suelo al explotar las reservas minerales más profundas de la roca parental y recuperar los lixiviados y depositarlos sobre la superficie como humus. Esta materia orgánica aumenta el contenido de humus del suelo, el cual a su vez aumenta su capacidad de intercambio de cationes y disminuye las pérdidas de nutrientes. La materia orgánica adicionada modera además las reacciones del suelo extremas (pH) y la consecuente disponibilidad de nutrientes esenciales y elementos tóxicos. Puesto que el nitrógeno, fósforo y azufre se tienen fundamentalmente en forma orgánica, la abundancia de materia orgánica es especialmente importante para aprovecharlos. La asociación de árboles con bacterias fijadoras de nitrógeno y micorrizas también incrementará los niveles de nutrientes disponibles. La actividad de microorganismos tiende a aumentar debajo de los árboles, debido a que la materia orgánica es incrementada (un abastecimiento de alimentos mejorado) y al ambiente de crecimiento (temperatura y humedad del suelo).

Los árboles también pueden aumentar las propiedades físicas del suelo, siendo la estructura del suelo la más importante. La estructura mejora como resultado del incremento de materia orgánica

(hojas y raíces), de la acción disociadora de las raíces de los árboles y la actividad de los microorganismos, todos los cuales ayudan a desarrollar agregados del suelo más estables. La temperatura del suelo se modera por la sombra y la cubierta de la hojarasca.

La función que pueden desempeñar los árboles en la protección del suelo es bien reconocida. Además de reducir la velocidad del viento, el follaje de los árboles disipa el impacto de las gotas de lluvia que golpean la superficie del suelo. La capa de hojarasca que cubre el suelo y su estructura mejorada también pueden ayudar a reducir la erosión de la superficie. El sistema de raíces penetrantes de los árboles realiza una función importante en la estabilización del suelo, especialmente en laderas escarpadas. La inclusión de especies compatibles y convenientes de perennes leñosos en terrenos de cultivos, pueden dar como resultado un mejoramiento acentuado en la fertilidad del suelo, mediante lo siguiente:

Aumento en los contenidos de materia orgánica del suelo por la adición de hojarasca y otras partes de plantas. Un ciclaje eficiente de nutrientes dentro del sistema y consecuentemente una mejor utilización de los nutrientes tanto nativos como los nutrientes aplicados.

La fijación biológica de nitrógeno y la solubilización de nutrientes relativamente escasos, por ejemplo el fósforo por medio de la actividad de micorrizas y bacterias solubilizadoras de fosfato. Aumento en la fracción cíclica de nutrientes de las plantas y reducción de la pérdida de nutrientes más allá de la zona absorbente de nutrientes del suelo.

Interacción complementaria entre las especies componentes del sistema, dando como resultado una repartición más eficiente de los nutrientes entre sus componentes. Economía adicional de nutrientes debido a diversas zonas absorbentes de nutrientes de los sistemas de raíces de las especies componentes. Efecto moderador de la materia orgánica del suelo en reacciones de suelo extremo y la consecuente liberación y disponibilidad de nutrientes.

2.2.5 Interacciones: Árboles – Microclima.

Los árboles moderan los cambios de temperatura, dando como resultado temperaturas máximas más bajas y mínimas más altas bajo los árboles, en comparación con las áreas abiertas. La disminución de temperatura y la reducción de los movimientos del aire debido al dosel de los árboles reducen el promedio de evaporación. También se puede encontrar mayor humedad relativa bajo los árboles en comparación con los sitios abiertos.

2.2.6 Interacciones: Árboles – Hidrología.

El equilibrio del agua de un micro sitio dado, predio o región está influido por las características funcionales y estructurales de los árboles. En distintos grados, dependiendo de la densidad del follaje, y las características de las hojas, la precipitación pasa a través de ellas hasta el suelo, se intercepta y se evapora o se redistribuye a la base del tronco por el propio flujo. La humedad del aire también puede ser recogida por el follaje de los árboles y ser depositada como precipitación

interna (niebla de goteo), una significativa fuente potencial de agua en áreas de neblinas húmedas. Como resultado de una mejorada estructura del suelo y la presencia de una capa de hojarasca, el agua que llega al suelo se utiliza más eficientemente debido al incremento de la filtración y permeabilidad, reduciendo la evaporación y el escurrimiento superficial. En gran escala, particularmente en áreas propensas a las inundaciones, los árboles pueden reducir las descargas de aguas subterráneas, existiendo la evidencia de que las características hidrológicas de las áreas de captación son influidas favorablemente por la presencia de árboles.

2.2.7 Componentes biológicos asociados en sistemas Agroforestales.

Todas las plantas, los insectos y los organismos del suelo pueden resultar beneficiados por la presencia de árboles compatibles. Aunque los mecanismos específicos son poco entendidos, por lo general involucran un microclima más benigno; temperatura de suelo favorable, régimen de humedad y estado de materia orgánica; una mayor disponibilidad de nutrientes así como su eficiente utilización y reciclaje. El mejoramiento en el estado de la materia orgánica del suelo puede dar como resultado una mayor actividad de los microorganismos favorables en la zona de raíces. Tales microorganismos también pueden producir sustancias que promueven el crecimiento mediante interacciones deseables provocando efectos comensalísticos en el crecimiento de especies de plantas.

2.2.8 Ventajas de los sistemas agroforestales

Mediante la combinación de la producción agrícola y forestal se pueden alcanzar mejor diversas funciones y objetivos de la producción de bosques y cultivos alimenticios. Existen ventajas ambientales, como también socioeconómicas, de tales sistemas integrados sobre la agricultura y/o monocultivos forestales (Wiersum 1997).

2.2.8.1 Ventajas ambientales

Se hace un uso más eficiente de los recursos naturales. Las diversas capas de vegetación proporcionan una eficiente utilización de la radiación solar, los diferentes tipos de sistemas de raíces a distintas profundidades hacen buen uso del suelo y las plantas agrícolas de corta duración que aprovechan de la capa superficial enriquecida, como resultado del ciclaje mineral mediante las copas de los árboles. Además la integración de animales en el sistema puede aprovecharse para la producción secundaria y el reciclaje de nutrientes.

La función protectora de los árboles con respecto al suelo, la hidrología y la protección de las plantas puede utilizarse para disminuir los peligros de degradación ambiental. Sin embargo, se debe tener en cuenta que en muchos sistemas agroforestales, los componentes pueden competir por luz, humedad y nutrientes, por lo tanto se deben considerar los intercambios. El buen manejo puede reducir al mínimo estas interferencias y aumentar las interacciones complementarias (Gutierrez & Fierro, 2006).

2.2.8.2. Ventajas socioeconómicas

Mediante la eficiencia ecológica se puede aumentar la producción total por unidad de tierra. No obstante que la producción de cualquier producto individual puede ser menor que en los monocultivos, en algunos casos la producción del cultivo base puede aumentar. Por ejemplo, en Java se ha demostrado que después de la introducción del sistema Taungya, la producción de arroz de secano aumentó. Los diferentes componentes o productos de los sistemas podrían ser utilizados como insumos para la producción de otros (por ejemplo, implementos de madera, abono verde), y disminuir así la cantidad de inversiones e insumos comerciales.

En relación con las plantaciones puramente forestales, la introducción de cultivos agrícolas junto con prácticas culturales intensivas bien adaptadas, a menudo se traduce en un aumento de la producción forestal y en una merma en los costos del manejo arbóreo (por ejemplo, la fertilización y desmalezaje de los cultivos agrícolas también puede beneficiar el crecimiento de los árboles), y proporciona una serie más amplia de productos (Canjura-Saravia, *et al* 2002).

Los productos arbóreos a menudo se pueden obtener a lo largo de todo el año, proporcionando oportunidades de mano de obra y un ingreso regular anualmente. Algunos productos arbóreos se pueden obtener sin necesidad de un manejo muy activo, otorgándoles una función de reserva para los períodos en que fallan los cultivos agrícolas, o para necesidades sociales determinadas (por ejemplo, la construcción de una casa).

En la producción de varios productos se distribuye el riesgo, en la medida que varios de ellos serán afectados de manera diferente por condiciones desfavorables. La producción se puede enfocar hacia la autosuficiencia y el mercado. La dependencia de la situación del mercado local se puede ajustar de acuerdo con la necesidad del agricultor. Si se desea, los diversos productos son consumidos total o parcialmente, o son destinados al mercado cuando se dan las condiciones adecuadas (Canjura-Saravia, *et al* 2002).

2.2.9 Algunas restricciones de los sistemas agroforestales

Existe un número de restricciones o condiciones limitantes para la aplicación de los sistemas agroforestales. Es necesario reconocerlas y hacer esfuerzos por superarlas, si se desea aplicar con éxito la agroforestería. Una de las principales limitaciones es en relación con el hecho que los sistemas agroforestales son específicos del ecosistema, y en ciertos suelos de baja calidad la elección de las especies vegetales apropiadas puede resultar limitante, aun cuando muchos árboles tienen mayor capacidad para adaptarse a los suelos pobres que los cultivos anuales.

La competencia entre los árboles y los cultivos de alimentos, y la prioridad que se les debe dar para satisfacer necesidades básicas, puede excluir del cultivo arbóreo a los agricultores pobres, que cuentan con muy poca tierra, para cultivar árboles (Kuishnamurthy & Avila, 1999)

Al promover la plantación arbórea, se necesitan beneficios a corto y largo plazo. Estos beneficios económicos o productivos deben ser considerados. Una restricción económica común es que

algunos sistemas agroforestales establecidos recientemente, pueden requerir costos sustanciales de inversión para comenzar (por ejemplo, material de cultivo, conservación del suelo, fertilizante). Para dichas inversiones se puede necesitar crédito. En la mayoría de los sistemas agroforestales pueden ser necesarios algunos años antes de obtener los primeros rendimientos. En algunos casos, dicho período de espera requiere apoyo financiero.

El tamaño del terreno puede afectar el tipo de insumos. En áreas con una alta presión poblacional y suelos pobres, los predios particulares pueden resultar demasiado pequeños como unidades confiables de producción. En este caso, es necesario hacer algún tipo de esfuerzo cooperativo. La disponibilidad de semillas y/o plántulas es una variable primordial para los proyectos agroforestales. En la mayoría de los casos, una planificación a más largo plazo, incluye el desarrollo de pequeños semilleros junto con la plantación y mantención de árboles (Giraldo, 2000).

El manejo de ganado en algunas ocasiones puede entrar en conflicto con las actividades agroforestales, especialmente en áreas donde se practica la ganadería vacuna o caprina.

En áreas con sistemas comunales o de clanes complejos de tierras, puede resultar difícil desarrollar métodos agroforestales. Los derechos de posesión constituyen una consideración fundamental para la agroforestería. Ellos pueden ser un factor limitante.

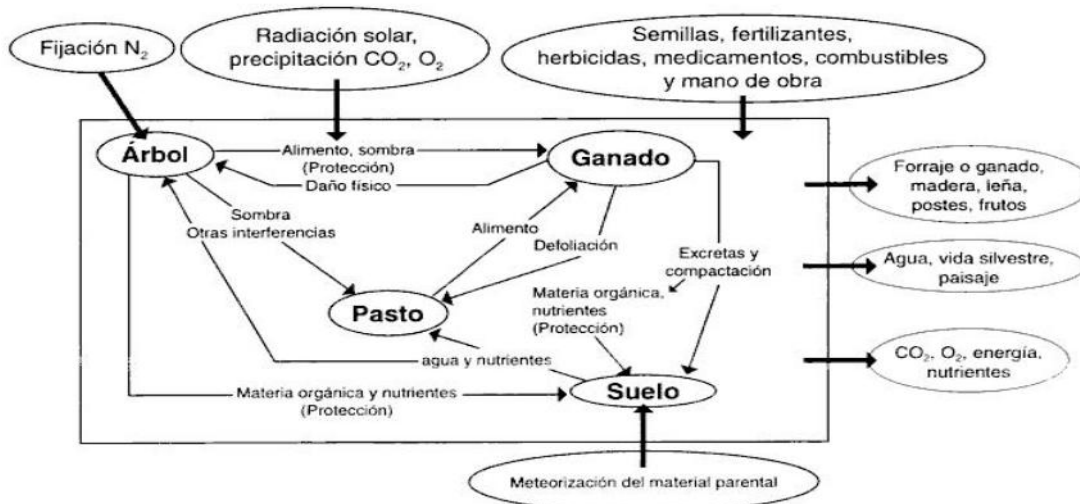
La tenencia de árboles también constituye una posible restricción. En algunos casos, la tierra en la cual los árboles pueden ser plantados y protegidos no pertenece a aquellos que los plantaron. De manera que los que las plantaron pueden no estar legalmente autorizados para hacer usufructo de los árboles y su producción. Aún más, en algunos países existen leyes que restringen la cosecha/tala de los árboles para cualquier propósito, sin considerar al dueño de la tierra en que se encuentran plantados (Giraldo, 2000).

2.3 SISTEMAS SILVOPASTORILES

Por ser los sistemas silvopastoriles objeto de observación en el presente trabajo se reseñan algunos aspectos específicos de estos sistemas.

En líneas generales los sistemas agroforestales que basan su producción en asocio con el componente pecuario, se denominan silvopastoriles, y permiten una gran cantidad de combinaciones para asociar los componentes agrícolas representados en pastos y forrajes, el arbóreo y los animales.

Figura 1. Diagrama de un sistema silvopastoril



Fuente: Tomado de: Pezo y Ibrahim. (1999)

Gutiérrez y Fierro (2006), al referirse a estos sistemas, establecen lo siguiente: Sistemas Silvopastoriles o Sistemas agroforestales Pecuarios-SAFP-. Un sistema silvopastoril es una opción de producción pecuaria que involucra la presencia de leñosas perennes (árboles o arbustos), que interactúa con el componente no leñoso (forrajeras herbáceos) y el componente animal, todos ellos bajo un sistema de manejo integral.

2.3.1 Árboles, maderables o frutales dispersos en potreros

Son arreglos donde el componente animal se beneficia de la sombra y de los frutos aportados por el componente leñoso y estos a su vez puede ser fuente de madera, forraje, leña, fijadores de nitrógeno atmosférico y refugio para la fauna (Gutierrez & Fierro, 2006).

2.3.2 Producción animal bajo plantaciones forestales o plantaciones de frutales

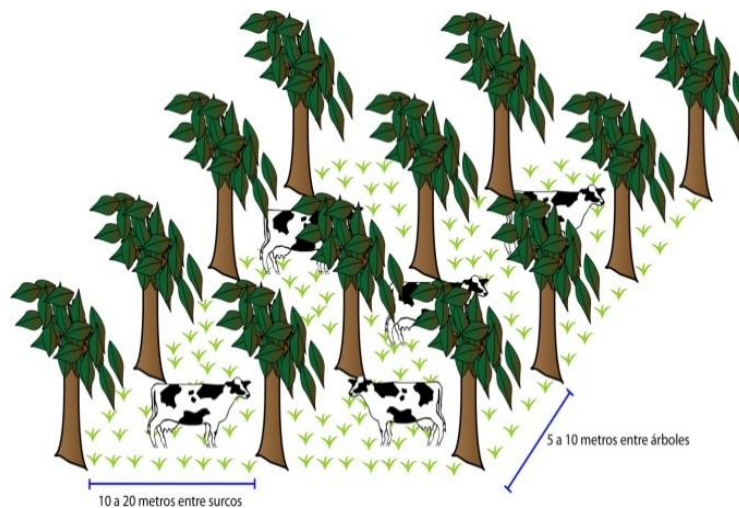
Son arreglos en los cuales se utilizan las plantaciones forestales o frutales para el pastoreo de animales en donde el componente animal se usa como controlador de las plantas invasoras del cultivo forestal y/o de frutales.

2.3.3 Praderas en callejones de árboles

Son arreglos que utilizan árboles o arbustos sembrados en líneas paralelas que acompañan el forraje de corte o de pastoreo con el propósito de mejorar el ciclaje de nutrientes, prevenir la erosión y reducir el efecto del pisoteo de los animales sobre el suelo.

Este sistema (figura 2) mejora las condiciones del suelo, minimiza los efectos de los procesos erosivos, genera un microclima favorable para los animales en la zona de implementación, eleva la calidad de la pradera por la disposición de árboles en hileras permitiendo conservar un espacio que facilita el movimiento del ganado y otras operaciones sin sacrificar el crecimiento de los árboles. Una de las mayores ventajas de este sistema es que el forraje desarrollado bajo condiciones de sombra, poco viento y cercano a los árboles tiende a madurar más lentamente por lo tanto, posee menos fibra y presenta mayor digestibilidad en comparación con los forrajes que crecen en pasturas sin sombra. En general después del establecimiento el manejo de este tipo de sistema silvopastoril se realiza mediante pastoreo rotacional, cuya periodicidad depende de la capacidad de recuperación de la pradera asociada, generalmente de 45 a 60 días (Sánchez, 1998).

Figura 2. Distribución en un sistema silvopastoril de árboles en hileras



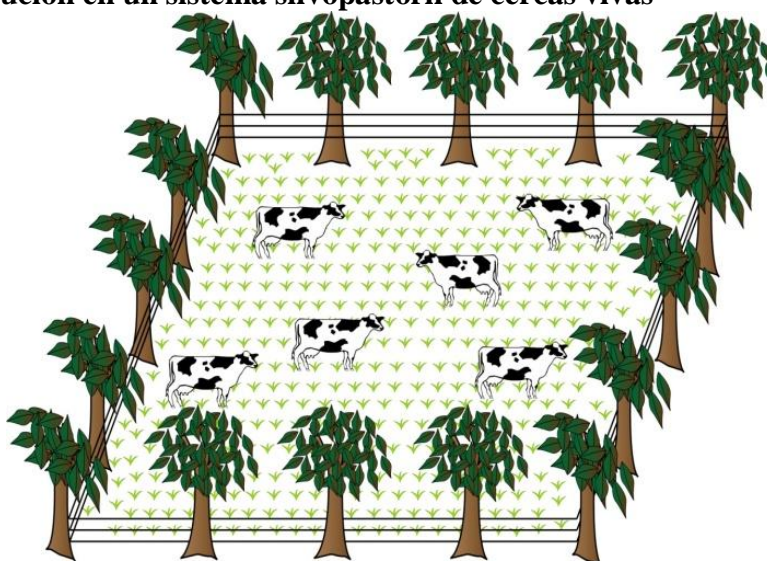
Fuente: <http://www.fao.org/docrep/009/ah648s/AH648S09.htm>

2.3.4 Cercas vivas y barreras vivas

Son hileras de árboles o arbustos plantados que separan un potrero de otro, complementado con el uso de alambre de púas. Cada vez es más reconocida su importancia ya no solo para delimitar propiedades, sino a través de otras funciones de proveer forraje, leña, madera, postes, alimentos, uso ornamental y promoción de la biodiversidad.

Las cercas vivas (figura 3) son usados en lugar de postes muertos de madera, cemento u otros materiales empleados para sostener el alambre de púas o electrificado en linderos y divisiones de potreros. Para establecer cercas vivas se pueden usar plántulas, que es necesario proteger del ganado mientras crecen o lo que es más usado, estacas de árboles de al menos 2,5 metros de altura. Las cercas vivas pueden estar compuestas por varias especies de árboles. Su mayor ventaja es que evitan que el productor gaste dinero en la compra y el reemplazo periódico de postes muertos. Además pueden aportar sombra, alimento, leña o madera para diversos usos y contribuir a mejorar el suelo. Las cercas vivas contribuyen a la conectividad entre fragmentos de bosque y facilitan el tránsito de la fauna. Si no se podan severamente con el tiempo se pueden transformar en corredores biológicos y así contribuyen a la conservación de una porción importante de la biodiversidad, además con las cercas vivas se elimina la necesidad de recurrir al bosque para extraer postes provenientes de los árboles, con lo que se contribuye a la protección del recurso (Pezo & Ibrahim, 1999).

Figura 3. Distribución en un sistema silvopastoril de cercas vivas



Fuente: <http://www.fao.org/docrep/009/ah648s/AH648S09.htm>

2.3.5. Cortinas rompevientos

Son franjas múltiples de árboles sembrados con el propósito de reducir el efecto negativo de los vientos sobre las praderas y los animales. Pueden ser simples o múltiples de árboles, en uno o varios estratos sembradas con la finalidad principal de reducir el efecto negativo de los vientos sobre los pastos y los animales. Son similares a las cercas vivas, pero las filas de árboles se dejan crecer libremente, tienen al menos dos tipos de alturas o estratos, pueden ser dobles o triples y se disponen de forma perpendicular al flujo de los vientos desecantes de los pastos, cuando el viento generalmente viene en una sola dirección, una cortina rompe viento puede ser efectiva para su control, solo si la dirección viento varía 45°, sin embargo en lugares donde la dirección del viento

suele variar a lo largo del año se recomienda ubicar más de una cortina o barrera (Wilkinson & Elevitch, 2000) a fin de evitar un daño sobre las pasturas, cultivos y suelo.

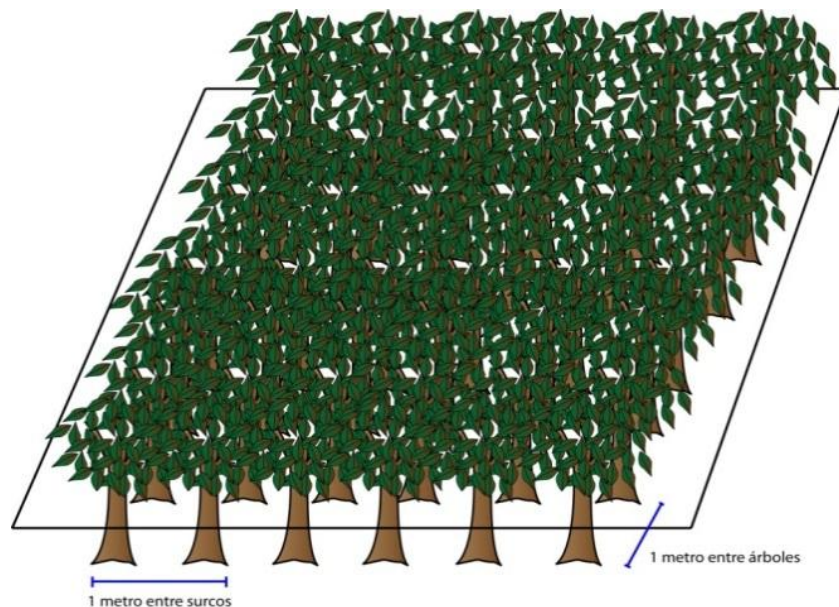
2.3.6 Bancos forrajeros puros o en policultivos de varios estratos

Son cultivos de árboles y arbustos (a veces especies herbáceas), con follaje de alto contenido proteico o energético, dispuestos en arreglos de altas densidades de plantas, que se pueden cosechar y llevar a los animales en un sistema de corte y acarreo o pastorear directamente, por lo general, durante cortos periodos. "Si la especie forrajera sembrada tiene más del 15% de proteína cruda, el bloque constituye un banco de proteína; si la especie forrajera presenta altos niveles de energía digerible (más del 70% de digestibilidad), el bloque constituye un banco energético y si cumple los dos requisitos anteriores (Pezo y Ibrahim, 1999).

Una variante de este tipo de arreglos son los Bancos mixtos de forrajes, que son cultivos asociados intensivos, cuya finalidad es producir hojas y tallos de alto valor nutritivo para la alimentación de los animales por medio de sistemas de corte o acarreo. Dentro de los bancos forrajeros se pueden considerar plantas herbáceas, arbóreas y arbustivas sembradas y manejadas en alta densidad (diez mil o más). En lo posible deben estar constituidos por varias especies y asociarse con cultivos de consumo humano, árboles frutales o maderables y palmas. Necesitan un buen régimen de fertilización orgánica u órgano-mineral para garantizar una buena producción de forraje. Los arbustos forrajeros se caracterizan por tener altos contenidos de proteína (generalmente superiores al 20%), que complementan la dieta del ganado basada en gramíneas (Giraldo, 2000).

Una segunda variante son los Bancos de proteína, (figura 4) se basa en áreas en las cuales los árboles y/o arbustos se cultivan en bloque y a alta densidad (mayores de 5000 plantas/ha). Generalmente se establecen en áreas cercanas a las instalaciones de manejo y alimentación (corrales, establos etc.) destinadas exclusivamente a la producción de grandes volúmenes de forrajes de alta calidad para su utilización en la suplementación animal. Su utilización puede darse bajo dos sistemas, corte o pastoreo. En el sistema de corte y picado se estimula el consumo y se reduce el desperdicio al ofrecer el forraje a los animales en los comederos. En el sistema de pastoreo los animales tienen acceso directo a las fuentes de forraje (Sánchez, 1998).

Figura 4. Distribución en un sistema silvopastoril de bancos de proteína



Fuente: <http://www.fao.org/docrep/009/ah648s/AH648S09.htm>

2.3.7 Sucesión vegetal manejada

La sucesión vegetal es el proceso mediante el cual el ecosistema tiende a recuperar una cobertura vegetal diversa en especies y compleja en estructura. Es también conocida como “enrastramiento” y percibida como una invasión de cultivos y pastos indeseables. Proceso puede ser beneficioso para el productor ya que puede aprovechar y favorecer el establecimiento de árboles y arbustos a una densidad tal, que permita la producción de pastos bajo el dosel y se forme así un sistema silvopastoril. En el caso de los potreros la sucesión vegetal empieza con la aparición de plantas invasoras que generalmente se eliminan mediante el pastoreo o mediante la deshierba manual, mecánica o con la aplicación de herbicidas. Para establecer el sistema silvopastoril de sucesión vegetal, se debe hacer control de manera selectiva para que las especies arbóreas y arbustivas más deseables se mantengan (Garibello, 2003).

2.3.8 Ventajas de los sistemas silvopastoriles

- Mejor calidad, variedad y cantidad de alimento (estabilización de la oferta de forrajes a largo tiempo).
- Microambiente favorable para los animales
- Mejoramiento de las propiedades del suelo
- Reciclaje de nutrientes
- Fijación de N
- Mejor estructura del suelo
- Control de la erosión

2.3.9 Desventajas de los sistemas silvopastoriles

- El limitado conocimiento y la difusión del sistema silvopastoril.
- El lucro cesante durante el período que transcurre entre la plantación y el ingreso del ganado al sistema.
- Costos de implementación y prácticas silvícolas (podas y raleos).
- En general, el crecimiento de las pasturas es menor cuando éstas crecen bajo la copa de los árboles, aunque las gramíneas tropicales son afectadas que las gramíneas templadas y las leguminosas.
- La alelopatía resulta de la liberación de compuestos químicos de una especie que afectan la germinación, el crecimiento o la sobrevivencia de otras especies. Varias especies forrajeras y arbóreas presentan este tipo de actividad, lo que debe ser tomado en cuenta al momento de diseñar sistemas silvopastoriles (Kuishnamurthy & Avila, 1999).
- La disponibilidad energética del follaje de muchos árboles y arbustos es similar o superior a la observada en gramíneas tropicales, pero debido a la presencia de taninos son menos digestibles.
- En los sistemas en que los animales tienen acceso directo a las áreas donde se encuentran las plantas leñosas, éstas pueden presentar daños por la actividad animal (Kuishnamurthy & Avila, 1999)

2.4 SÍNDROME MUERTE SÚBITA EN BOVINOS

Se puede definir la muerte súbita de bovinos en pastoreo como la condición patológica de los animales, en la cual el bovino bien aparece muerto o muere luego de un curso corto de enfermedad sin presentar mayores alteraciones visibles en su comportamiento o estado general (Benavides, 2004). Generalmente los animales se encuentran un día en estado normal, su

alimentación no se altera y su comportamiento es similar al de siempre, sin embargo al día siguiente son encontrados muertos por los productores, o mueren rápidamente después de presentar síntomas dependiendo de la enfermedad causante de muerte súbita que presentan.

La muerte súbita del ganado no solo se presenta en bovinos en pastoreo, también es común observar casos de muerte súbita en animales en sistemas de confinamiento como los feed lots, en donde la muerte es producida por enfermedades como la neumonía atípica intersticial, edema traqueal agudo y enfermedades clostridiales (Glock & DeGroot, 2008), la mayoría de las muertes súbitas se refieren a muertes insospechadas que generalmente ocurren de noche, estas muertes se caracterizan porque no se pueden predecir y son fallidos los intentos de encontrar síntomas previos a la muerte y no existe una razón clara para determinar la causa de la muerte (Pierson *et al.*, 1976; Panciera & Williams, 1986; DeGroot, 1994). En el caso de los feed lots, Pierson *et al.*, (1976), establecen que los casos de muerte súbita como se mencionó anteriormente no presentan síntomas algunos que permitan inferir un estado sanitario crítico en el animal que conlleve a la muerte, sin embargo las causas de los fenómenos de muerte súbita pueden ser encontradas en la necropsia, lo que ayuda en la prevención de estos casos (Glock & DeGroot, 2008).

En varios casos se asocian los fenómenos de muerte súbita (también llamado síndrome de caída del ganado) con la presencia de plantas tóxicas (Tokarnia, 1987), sin embargo diversos agentes etiológicos pueden ser la causa de este problema, dentro de estos se las bacterias del género *Clostridium spp.*, como botulismo bovino producido por las neurotoxinas tipo C y D, de *Clostridium botulinum*, carbón sintomático producido por *Clostridium chauvoei* y en menor proporción por el tétano causado por *Clostridium tetani*, (Ortiz & Villamil, 2008), además de estos agentes, también se encuentran, la rabia bovina, el carbón bacteriano, plantas tóxicas, fiebre de garrapatas, intoxicación por nitritos y nitratos entre otros (Benavides, 2004).

2.4.1 Enfermedades que pueden causar muerte súbita en bovinos

Son distintas las enfermedades que pueden causar muerte súbita en los bovinos, estas son diversas en cuanto a su origen y el entorno en el que se encuentra el animal, cada una de ellas de distintas maneras pueden provocar la muerte de un animal en un curso rápido y sin síntomas aparentes que permitan realizar un diagnóstico eficaz y un posterior tratamiento.

2.4.1.1 Rabia paralítica bovina

Es una infección viral aguda, invariablemente fatal, transmitida por mordedura de un animal rábico que afecta el sistema nervioso central y que se manifiesta por una encefalomielitis no supurativa y por signos neurológicos variables en el ganado bovino, en situaciones de ganadería extensiva es transmitida generalmente por carnívoros silvestres, murciélagos y/o vampiros (Benavides, 2004 y Medina, 2000). La rabia produce una parálisis progresiva que conduce a la muerte del animal afectado.

La rabia bovina como resultado de la mordedura de un vampiro (*Desmodus rotundus*) es enzoótica en muchos países de América latina desde México hasta Argentina (Torres et al. 1995).

En los bovinos el virus tiene preferencia por el tallo encefálico y el cerebelo. Las lesiones se limitan al tejido nervioso y se caracterizan por una encefalomiелitis no supurativa con ganglioneuritis, infiltración linfocítica perivascular y presencia de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos (Dierks, 1981, Marcato, 1990, Jubb, 1985 y Sánchez, 1990).

Generalmente el primer signo de rabia en el ganado es una depresión generalizada, característica de muchas infecciones virales y a medida que la enfermedad progresa se desarrolla un apetito depravado caracterizado por morder madera o comérsela, así como otros objetos no digestibles. Se pueden observar temores o espasmos musculares, la parálisis de los músculos de la garganta con excesiva salivación, las vacas tienden a ptialismo y presentan dificultad para beber agua, hay incremento en la excitación sexual tanto en hembras como en machos, algunos animales desarrollan la etapa furiosa y atacan a otros animales, al hombre o a objetos inanimados, el ganado rara vez muerde en la etapa de excitación pero puede embestir. Durante este periodo estímulos externos como luz, movimientos repentinos o ruidos pueden causar reacciones violentas, convulsiones o colapso (Medina, 2000).

2.4.1.2 Anaplasmosis

La Anaplasmosis es una infección no contagiosa del ganado bovino, ampliamente distribuida que ocasiona grandes pérdidas en países en desarrollo (Ristic, 1980), se caracteriza por anemia e ictericia asociadas con la presencia de ciertos cuerpos en los eritrocitos llamados anaplasmas. La enfermedad es más frecuente en áreas donde el desarrollo de vectores tales como garrapatas moscas y mosquitos es grande (Gasque, 2008).

La infección es causada por la rickettsia *Anaplasma marginale* que parasita los eritrocitos maduros del ganado bovino y causa severas pérdidas económicas fundamentalmente en zonas tropicales y subtropicales (Palmer, Rurangirwa, Kocan, y Brown 1999), aunque son varios los signos que se pueden observar en los animales con anaplasmosis, está puede presentarse en cuadros clínicos hiperagudos, con muerte súbita en ausencia de signos clínicos, cuadros agudos o crónicos, con un serio retraso en el crecimiento de los animales jóvenes y en algunos casos se pueden presentar abortos.

2.4.1.3 Carbón bacteridiano o ántrax

Es una enfermedad febril hiperaguda o aguda causada por la bacteria *Bacillus anthracis* la cual forma esporas que sobreviven por años en el medio ambiente, específicamente en suelos generalmente alcalinos (Maas, 2008 y Benavides, 2004) el ganado, las ovejas y las cabras son los que mayor riesgo tienen de contraer la enfermedad, sin embargo otros animales de producción o inclusive el humano pueden ser afectados, la mayoría de los animales contraen la enfermedad mediante la ingestión de suelo contaminado con esporas de ántrax, presentándose como el signo clínico más común la muerte súbita (Pelzer & Currin, 2009).

2.4.1.4 Deficiencia de cobre

La presentación de hipocuprosis en rumiantes es considerada la segunda carencia de minerales más importante después de la del fósforo (Picco *et al.*, 2004), esta se presenta cuando los forrajes que consume el animal no poseen niveles de cobres suficientes para cubrir sus requerimientos. El cobre es uno de los microelementos esenciales para los animales y las plantas, en los animales participa en la hematopoyesis y en el metabolismo de los tejidos conectivos, formación de la mielina y de los huesos y pigmentación y formación de lana y pelo (Cavalheiro y Trindade 1992, NRC 1996, Radostits *et al.* 1999). En los bovinos se encuentran diferentes cuadros clínicos en una hipocuprosis, entre estos se presentan: Menor desarrollo corporal y bajo desempeño reproductivo (Phillippo, Humphries, Atkinsson, Henderson y Garthwaite, 1987) también produce diarreas, fragilidad ósea y deformaciones articulares (Ramírez, Mattioli , Tittarelli , Giuliadori y Yano, 1998), presentándose también casos de muerte súbita (Bennets, Beck y Harley, 1948).

La hipocuprosis sucede cuando existen elementos que por su concentración interfieren en la absorción digestiva del cobre como el azufre (S) el hierro (Fe) y el molibdeno (Mo) (Suttle, 1991 y Radostitis *et al.*, 1999).

Se denominan plantas tóxicas a todo vegetal que introducidas en el organismo del hombre o de los animales domésticos, en condiciones naturales, es capaz de causar daños que se reflejan en la salud y la vitalidad de esos seres, ellas ocasionan un desequilibrio que se traduce en el paciente como síntomas de intoxicación.

Estas plantas cuentan con un principio tóxico el cual es una sustancia o un conjunto de sustancias químicamente bien definidas, de la misma naturaleza o de naturaleza diferente, capaces de causar intoxicación, cuando entran en contacto con un individuo. La intoxicación depende de la cantidad de sustancia tóxica absorbida, de la naturaleza de esa sustancia y de la forma de introducción (Haraguchi, 2003).

En países tropicales como Brasil es muy común la presencia de muerte súbita en bovinos caracterizada por el consumo de plantas tóxicas, estas muertes se caracterizan porque no presentan ningún tipo de síntoma y ausencia en la necropsia de descubrimientos macroscópicos de importancia, sin embargo en el examen histológico de muchos animales intoxicados se encuentra en los riñones lesiones características en el epitelio de los túbulos contornados distales, una degeneración hidrópico vacuolar y cariopcnosis (Gava *et al.*, 1997).

En Brasil se conocen al menos 11 especies de plantas que pueden causar la muerte súbita de bovinos en pastoreo. La principal es *Palicourea marcgravii*, de la familia *Rubiaceae* planta de amplia distribución responsable de la mayoría de muertes súbitas de bovinos en Brasil (Tokarnia y Döbereiner, 1986) el principio tóxico de la *Palicourea marcgravii* es el ácido monofluoracético, uno de los venenos más violentos que se conoce, el cual interfiere en el metabolismo celular inhibiendo el ciclo de Krebs (Tokarnia *et al.*, 2000) el monofluoracetato es una sustancia que bloquea la respiración celular al inhibir la enzima aconitato deshidrogenasa (aconitasa) del ciclo del ácido tricarboxílico (Sherley, 2004).

En el género *Mascagnia* las plantas capaces de causar muerte súbita son la *Mascagnia rigida* y *Mascagnia pubiflora*, (Tokarnia *et al.* 1961, Santos, Ferri y D'Assumpção, 1975., Tokarnia *et al.* 1994 y Fernandes y Macruz 1964) en el caso de este género, experimentos realizados por Gava *et al.*, 1997, demostraron que a medida que la cantidad consumida de plantas del género *Mascagnia* aumenta la intoxicación en el animal y mayor es el riesgo de presentarse la muerte sin signos previos. En esta investigación la dosis mínima capaz de producir síntomas de intoxicación en el animal fue de 5 g/Kg y la dosis que puede producir la muerte en bovinos es aquella que es superior a 20 g/Kg de peso.

Otra planta capaz de producir muerte súbita en los bovinos es la *Tertrapteryx acutifolia* la cual pertenece a la familia *Malpighiaceae*, es una planta frondosa con hojas verdes con forma de panícula con flores amarillas que cuando fructifican adquieren una coloración marrón (Carvalho, Nunes, Braganç y Porfirio, 2008). También las plantas *Pseudocalymma elegans*, *Arrabidaea bilabiata* y *Arrabidaea japurensis*, pueden causar la muerte súbita de bovinos.

2.5 GENERALIDADES DEL GÉNERO *Clostridium* Y ENFERMEDADES QUE CAUSAN

Son bacterias en forma de bastones que miden entre 0,3 – 2,0 micrómetros de diámetro y de 1,5 – 20 micrómetros de largo; se encuentran por pares o en cadenas cortas, con las extremidades redondeadas o puntiagudas; generalmente Gram positivos en el cultivo joven. Forman endosporas ovoides que deforman la pared celular. Metabólicamente son muy diversos y poseen un rango de temperatura ideal para su desarrollo de 10°C a 65°C. Están distribuidos en el ambiente, especialmente en el suelo y tracto gastrointestinal de los animales, varias especies producen poderosas exotoxinas, algunas de estas llegando a ser patógenas para diversos animales, tanto por la infección de las heridas, como por la absorción de toxinas (Gomes, 2011).

Estas bacterias cuando se siembra en agar enriquecido con sangre, algunas de ellas poseen hemolisinas, enzimas que lisan los hematíes. Las bacterias que producen estas enzimas presentan un halo transparente alrededor de las colonias a consecuencia de la lisis de los hematíes. La hemólisis alfa se refiere a una lisis parcial de eritrocitos que produce una coloración verde que se observa alrededor de las colonias (debido a la liberación de un producto de degradación de la hemoglobina llamado biliverdina); la hemólisis beta se refiere a un halo de hemólisis completamente claro (Hatheway, 1990).

2.5.1 Habitats

En medicina veterinaria se conocen como bacterias asociadas al suelo y como aquellos organismo que dada su capacidad de producción de esporas usan al suelo como principal medio de diseminación (Seifert *et al.* 1996).

Las enfermedades clostridiales pertenecen al grupo de las infecciones más fatales del ganado, las cuales, son causadas por bacterias pertenecientes al género *Clostridium* spp., que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, las Clostridiosis son de curso rápido y ocurren generalmente en forma de brotes, los cuales son muy difíciles de detener por lo que el enfoque respecto a estas enfermedades debe ser de prevención (Robles, 1998).

Las clostridiosis se pueden clasificar de acuerdo al tipo de afección que ocasionan en los animales y el hombre (Hatheway, 1990) en:

- Las enterotoxemias (afecciones que se encuentran principalmente en el sistema digestivo) asociadas a *Clostridium perfringens*.
- Las infecciones tisulares (afectan distintos tejidos), las cuales causan diversos síndromes en animales domésticos agrupados bajo el nombre de “carbones” los que incluyen la gangrena gaseosa (mionecrosis con producción de gas y toxemia), la pierna negra y el edema maligno, en distintas especies animales, particularmente en bovinos. Las especies involucradas son *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. novyi*, *C. haemolyticum*, *C. sordellii*;

Las neurotoxicosis (afectan las funciones nerviosas), las cuales causan lesiones en el org ocho tipos distintos de toxina botulínica (A, B, Ca, Cb, D, E, F y G) (Hatheway, 1988). Las esporas del *C. botulinum* se encuentran normalmente en los suelos y sedimentos acuíferos de la mayoría de la mayoría de regiones del mundo, pero generalmente se acepta que la afección ocurre únicamente si las esporas tienen la capacidad de germinar en los alimentos, dando lugar al crecimiento bacteriano y a la subsecuente producción de toxina botulínica (Ortiz & Benavides, 2002).

C. botulinum es un bacilo gram-positivo, anaerobio estricto, formador de esporas, móvil, de extremidades redondeadas y esporas generalmente subterminales; en la naturaleza se encuentra de dos formas: cuando no posee buenas condiciones para su multiplicación se encuentra en una forma esporulada y cuando las condiciones son favorables, pasa a una forma vegetativa donde inicia su multiplicación y eventual producción de la toxina. Para que esto ocurra son necesarias unas condiciones de temperatura (promedio 28 grados centígrados) humedad (relativa del 70 % promedio, según el laboratorio de Corpoica) y pH (7.2 pero varía según especie). Las toxinas de *C. botulinum* son de las más potentes de la naturaleza de las cuales los tipos C y D son las que están relacionadas con muertes en los bovinos, una vez producidas pueden mantenerse viables por largos periodos de tiempo, sobretodo en el interior de los huesos o cuando se le protege de alguna manera de la lixiviación (Blood, Radostitis & Henderson, 1986).

La alotriofagia (tendencia a comer alimentos diferentes a los de su dieta), la cual sucede cuando las pasturas en las que se encuentran los animales son deficientes en minerales principalmente fósforo (por esto suelen consumir huesos), permite inferir la posibilidad que los bovinos por este comportamiento contraigan botulismo; esto se puede comprobar con el hallazgo de objetos extraños en el tracto digestivo del animal durante la necropsia o salas de beneficio y la simultanea presentación de brotes de botulismo en animales que estaban en la misma pastura.

Los primeros signos del botulismo aparecen de tres a siete días después de haber ingerido el material tóxico, pero el periodo de incubación puede acortarse de acuerdo a la cantidad de toxina consumida. Pueden existir casos hiperagudos con muerte súbita real, sin ningún tipo de síntomas y pueden existir casos agudos en los que el animal se rehúsa a comer y beber y empieza a tener una parálisis progresiva ascendente, de tal forma que hay incoordinación del tren posterior y posterior muerte también existe una forma sub-aguda en la que el animal presenta ausencia de estímulos, parálisis deglutoria y lingual, midriasis, flexión lateral del cuello, incoordinación, marcha insegura y ataxia, la muerte ocurre en medio de la parálisis respiratoria y los animales conservan la conciencia hasta el final (Ortiz & Benavides, 2002 y Robles, 1998). Cabe resaltar la posibilidad que suceda una toxiinfección por diseminación de la toxina ocurre a partir de una

colonia activa de multiplicación en tracto gastrointestinal, después de que las esporas han sido ingeridas por el animal.

2.5.2 Botulismo producido por *Clostridium botulinum* tipos C y D

Es una infección de bovinos y otras especies animales, que se produce principalmente por la ingestión de la toxina previamente formada por la bacteria anaeróbica *Clostridium botulinum* (Dutra, Weiss, y Dobereiner, 1993), ocurre como una intoxicación alimentaria en animales que consumen huesos y otros materiales orgánicos, debido a la intensa deficiencia mineral, en especial fosforo, de los suelos donde pastan (Benavides, 2004).

2.5.3 Enterotoxemia *Clostridium perfringens*

La enterotoxemia es una afección endógena, condicionada habitualmente por las alteraciones del tracto digestivo, causada por la absorción de un gran número de toxinas producidas por *C. perfringens*, el cual usualmente forma parte de la microflora del intestino de los animales y el hombre aunque también puede ser encontrado en el suelo. (Niilo, 1987)

C. perfringens es un bacilo gram-positivo anaerobio con capacidad de formar esporas, el cual es clasificado en cinco tipos que van desde la A hasta la E, de acuerdo con la producción de cuatro toxinas principales denominadas alfa, beta, epsilon e iota. La enterotoxemia producida por *C. perfringens* tipo D ocurre en bovinos, ovinos y caprinos y perjudica principalmente a animales entre los tres días y seis meses de edad (Lobato et al., 2000), aunque ha sido encontrada también en animales adultos (Silveira et al., 1995). La enfermedad está caracterizada principalmente por la acción letal y necrotizante de la toxina, epsilon secretada por los tipos B y D. producida principalmente como una toxina que es activada por la tripsina o por otras toxinas secundarias de *C. perfringens* (Minami, Katayama, Matsushita, Matsushita y Okabe, 1997). Factores que alteran el ambiente intestinal, como niveles elevados de carbohidratos y dietas muy ricas en proteína pueden resultar en abundante crecimiento de *C. perfringens* y producción de toxinas (Kriek, Odendaal y Hunter, 1994).

2.5.4 Toxina epsilon

La toxina epsilon es la toxina clostridial más potente luego de las neurotoxinas tetánica y botulínica (Payne et al., 1994 y 1997), es secretada como una prototoxina que es activada al ser catalizada por la tripsina, quimi tripsina y una zinc metaloproteasa producida por *C. perfringens* en el tracto gastrointestinal (Minami, Katayama, Matsushita, Matsushita y Okabe, 1997). La principal acción biológica de la toxina es la generación de edemas (Brown, Baker y Barker, 2007), es letal y dermonecrótica, se ha descrito que eleva la presión sanguínea, incrementa la permeabilidad vascular e intestinal y causa daño renal. Una propiedad básica de la toxina epsilon

es que al incrementar la permeabilidad vascular produce daño y edema en diversos órganos como corazón, pulmón y cerebro (Brown et al., 2007).

La enfermedad generalmente es de curso sobreagudo, de aquí que sea una de las causas de muerte súbita, se puede notar decaimiento, fiebre, incoordinación, diarrea, convulsiones y muerte. A la necropsia, el intestino delgado, sobre todo el duodeno, puede estar congestivo y hemorrágico, los riñones congestivos y pulposos, liquido en cavidades torácica y peritoneal y liquido en saco pericárdico (Robles, 1998).

2.5.5 Toxinas alfa y beta

La toxina alfa es el principal factor de virulencia de la gangrena gaseosa en humanos y animales y de la enteritis necrótica de bovinos, equinos y pollos, Todos los tipos de *C. perfringens* poseen los genes codificantes para esta toxina (plc); sin embargo, no todas las cepas la producen y existen grandes variaciones en las cantidades producidas. Esta toxina tiene actividad enzimática, tanto de fosfolipasa (fosfolipasa-C o FLC) como de esfingomielinasa y, además, es hemolítica y dermonecrotica. Uno de los principales factores de virulencia de *C. perfringens* tipos B y C es la toxina beta, que es muy sensible a la degradación por tripsina. Los animales recién nacidos o con deficiencias nutricionales son usualmente los más susceptibles de ser infectados por estos microorganismos. Existe evidencia que esta podría funcionar como una neurotoxina y producir constricción arterial (Morris y Fernández, 2009).

2.5.6 Carbunco sintomático (*Clostridium chauvoei*)

Se trata de una enfermedad infecto-contagiosa de los bovinos, que ocurre principalmente en animales jóvenes, conocida en los países del norte como “Black leg”, en Brasil como “peste da manqueira” (Nunes, 2005) y en Colombia como carbón sintomático, es una enfermedad aguda causada por necrosis muscular, toxemia grave y alta mortalidad.

La enfermedad es causada por la bacteria *C. chauvoei*, la cual es una bacteria anaeróbica formadora de esporas, extremadamente estable y encontrada en la mayor parte de los ambientes que debido a la alta tasa de mortalidad, en ocasiones del 100%, es económicamente importante y de difícil tratamiento (Carvalho, Nunes, Braganç y Porfirio, 2008). El carbunco sintomático es una enfermedad resultante de la producción y multiplicación de toxinas de la bacteria *C. chauvoei*, en los músculos y tejido sub cutáneo de los bovinos, ovinos y caprinos, con lesión local y toxemia. Cuando las condiciones dentro del organismo del animal son las indicadas se produce una reducción del oxígeno molecular, llevando a un bajo potencial de óxido-reducción en los tejidos, favoreciendo la germinación de las esporas de *Clostridium spp* allí localizados, desencadenando la producción de toxinas (Assis et al., 2001).

C. chauvoei es una bacteria anaerobia gram positiva, móvil, que produce cuatro tipos de toxinas (alfa, beta, gamma y delta) y una neuraminidasa que altera la membrana de las células de los tejidos, haciéndolos vulnerables al ataque de las toxinas (Toro, Ortiz y Ossa 2007).

C. chauvoei está ampliamente distribuido en el suelo y en el tracto gastrointestinal de los herbívoros. La sobrevivencia del agente en el suelo es el factor determinante para la transmisión a los bovinos, pues el consumo de pastos contaminados, constituye la principal fuente de infección. Bovinos jóvenes (terneros), entre cuatro y seis meses son los más susceptibles de infectarse (Benetti, 2008).

El microorganismo es acarreado vía circulación sanguínea hasta que llega al tejido muscular, donde se multiplica si las condiciones de anaerobiosis se presentan. La enfermedad en bovinos es endógena, y en algunos casos exógena, en el caso que de la primera es dada a que muchos bovinos porta el *C. chauvoei* dentro de su organismo, específicamente en el hígado (Assis *et al.*, 2005).

Clínicamente los animales presentan, temperatura elevada, anorexia, depresión y cojera, el tejido afectado se torna edematoso y al palpar se sienten burbujas de gas que se producen por la multiplicación de la bacteria, la muerte ocurre generalmente a las 72 horas. Las lesiones son acompañadas por edemas, hemorragia y necrosis que presenta un olor rancio (Assis *et al.*, 2005).

2.5.7 Edema maligno (*Clostridium septicum*)

El edema maligno es una enfermedad infecciosa, no contagiosa que afecta al ganado bovino y a otras especies que se caracteriza por una toxemia aguda. Es causada por la bacteria *Clostridium septicum*, la cual es anaeróbica gram positiva esporulada de forma bacilar recta y los extremos redondeados, sus esporas son ovaladas y excéntricas. (Hindson y Agnes, 2000)

Se consideran cuatro tipos serológicos y posee 4 toxinas: la alfa, que es lecitinasa, tiene efecto letal, hemolítico y necrosante; la beta, desoxirribonucleasa tiene efecto letal, necrosante y hemolítico; la gama, que tiene acción hialuronidasa, necrosante y hemolítica y la delta que tiene un efecto hemolítico. Estas toxinas aumentan la permeabilidad capilar y provocan mionecrosis, favoreciendo la diseminación de la infección a través de los músculos (Gasque, 2008).

Es una enfermedad que existe en todo el mundo y que se presenta en cualquier época del año. Este microorganismo se localiza en el intestino de casi todas las especies y, cuando el animal muere la bacteria invade todos sus tejidos; también se localiza en todos los suelos y en las heces, en donde permanece durante periodos prolongados de tiempo debido a su capacidad de esporular.

La bacteria ingresa al cuerpo a través de una herida o por vía oral, produce necrosis en el tejido afectado, prefiriendo el muscular y el subcutáneo, produce edema abundante y cuando se asocia con otros gérmenes, hay producción de gas. Se produce una toxemia letal en 2 o 3 días, la cual produce la muerte cuando las toxinas son absorbidas en el torrente circulatorio (Gasque, 2008).

Principalmente se presenta inflamación dolorosa y blanca y posteriormente enfisema tenso con salida de espuma. En algunos casos se observa fiebre, depresión, temblores, marcha rígida,

cojera, mucosas congestionadas y secas y una inflamación característica en el hombro, cadera, pecho, espalda y cuello. En algunos casos se presenta muerte repentina sin que se hayan observado signos (muerte súbita) (Gasque, 2008).

2.5.8 *Clostridium novyi*

Anteriormente denominado *oedematiens*, es la bacteria del género más sensible a O² y exigente para el cultivo y el aislamiento. Esta puede ser la razón por la que no es tan frecuentemente reconocida como un agente histotóxico en casos humanos. Se asocia generalmente con *C. sporogenes* y considerado por algunos como el agente en un tercio de los casos de gangrena gaseosa. Es responsable de las infecciones en los animales domésticos, causando la enfermedad conocida como hemoglobinuria bacilar de ganado vacuno, ovino y hepatitis necrótica, parasitismo hígado es el origen de la infección (Smith y Holdema, 1968).

La enfermedad involucra la beta toxina de *C. haemolyticum* y una alfa toxina de *C. novyi*. La toxina de *C. novyi* produce la permeabilidad capilar que conduce a edema masivo y destruye eritrocitos circulantes, lo que conduce a la excreción de hemoglobina en la orina y la sangre que aparece en el lumen intestinal debido al endotelio afectado durante la destrucción capilar (Hatheway, 1990).

2.6 VARIABLES CLIMATOLÓGICAS OBJETO DE ESTUDIO.

Dentro del presente estudio se registraron datos climatológicos continuos y sistemáticos que permitieron determinar la evolución en el tiempo de las variables climáticas de mayor importancia y los cambios, durante la temporada experimental.

Partiendo del hecho de que el comportamiento del clima está sujeto a muchas variables; En nuestro caso la temperatura, la precipitación y la humedad relativa, son las variables climáticas que inciden en las dinámicas de los sistemas de producción bovina y de la presencia de plagas y enfermedades.

2.6.1 Temperatura

La temperatura es una de las principales variables que determina cambios en el clima del planeta. Influye directamente en el crecimiento y desarrollo de las plantas, la explosión o disminución de insectos, plagas y enfermedades para los animales y los cultivos agrícolas y forestales. (Ruiz et al., 2012)

2.6.2 Humedad relativa.

La atmósfera está compuesta por una mezcla de gases entre estos el vapor de agua, este pasa a la atmósfera a partir de la evaporación y la transpiración, y se elimina cuando se condensa o precipita. La humedad relativa es entonces la cantidad de vapor de agua presente en la atmósfera, y que de igual forma afecta los ciclos biológicos de animales, cultivos, plagas y enfermedades. (Globe, 2005).

2.6.3 Precipitación.

La precipitación es la fase del ciclo hidrológico que da origen a todas las corrientes superficiales y profundas, debido a lo cual su evaluación y el conocimiento de su distribución, tanto en el tiempo como en el espacio, son indicadores de los comportamientos esperados en el crecimiento de los cultivos, desarrollo de las malezas, la aparición de plagas y enfermedades y el ciclaje de nutrientes. (Méndez et al., 2008).

CAPITULO III. METODOLOGÍA

Este capítulo incorpora los procesos metodológicos seguidos en el estudio para realizar la toma de datos e información, la selección del área de trabajo y las unidades muestrales, el procesamiento de muestras de suelos y los protocolos usados para identificar y cuantificar los clostridios.

3.1 DEFINICIÓN Y UBICACIÓN DEL ÁREA EXPERIMENTAL

En la definición del área de estudio se partió de los trabajos realizados por Ortiz (2008 – 2011) en predios del valle de Ubate Chiquinquirá y en los cuales se detectó la presencia de muerte de bovinos asociada a la presencia de clostridios, siendo el municipio de San Miguel de Sema uno de las jurisdicciones donde se reportaron antecedentes de muerte de animales, y donde se encontró la disponibilidad de sistemas de producción bovina tradicional y silvopastoril, junto a la voluntad el apoyo de los productores para ejecutar el proyecto.

El municipio de San Miguel de Sema (Departamento de Boyacá) se encuentra enmarcado dentro de las coordenadas geográficas: 5° 31' 15" de latitud norte y a los 73° 43' 39" al oeste del meridiano de Greenwich, Su extensión total es de: 90 Km², la extensión del área urbana: 0.21 Km² y la Extensión del área rural: 89.79 Km²; se encuentra a una altitud de 2.615 metros sobre el nivel del mar. Las alturas máximas (2.850 m.s.n.m), corresponden a: La cuchilla de Peña Blanca, ubicada en la vereda de Peña Blanca al norte del Municipio. La Reforma, localizada dentro de la vereda de Quintoque al occidente del casco urbano. La altura mínima (2500 m.s.n.m.), corresponden a la mayor parte de las veredas Quintoque, Hato Viejo, Sabaneca y Sirigay.

La temperatura media se encuentra a: 13° C, San Miguel de Sema presenta temperaturas que pueden variar entre 1 y 22 °C.

Precipitación: Se presentan temporadas de lluvias en los meses de abril, mayo, septiembre, noviembre y diciembre, y temporadas de sequía en los meses, finales de diciembre, enero, febrero, junio, julio, agosto y parte de septiembre.

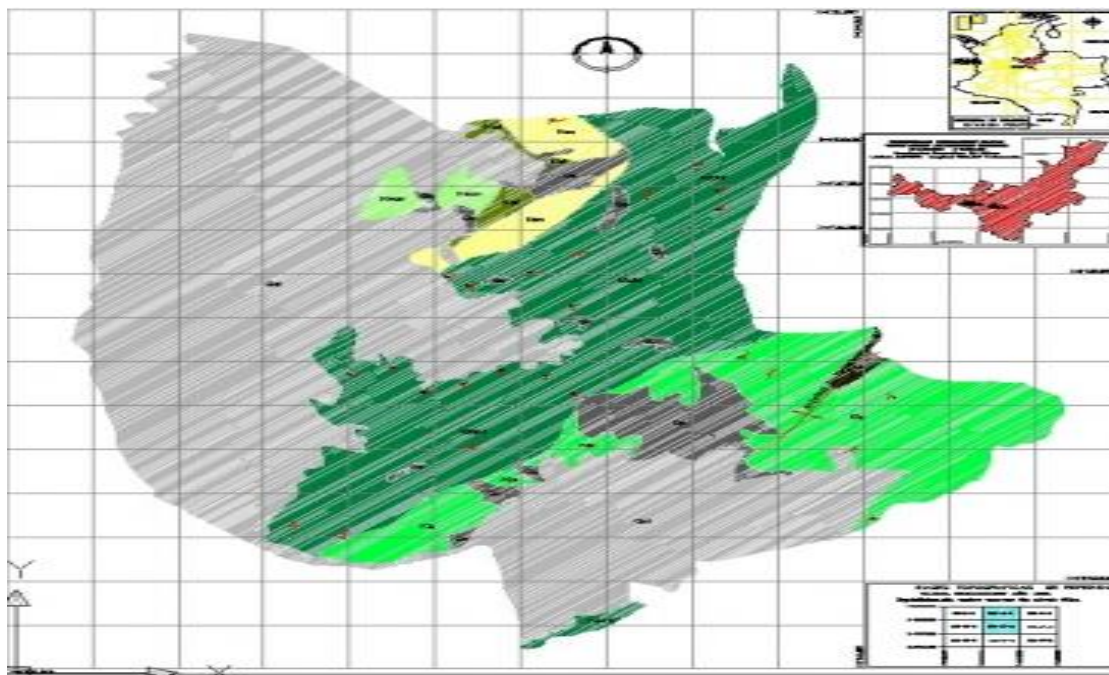
En materia ecológica el principal recurso con que cuenta el Municipio es el Sistema Lagunar de Fúquene, el cual alberga mamíferos, aves y peces en poblaciones muy reducidas a causa de la destrucción de su hábitad. Presenta zonas de bosque andino con predominio de roble *Quercus spp.* y en ellos se pueden observar especies de mamíferos como armadillos y ardillas, igualmente crece de forma silvestre agras, las uvas de monte y la gulupa.

Es un fenómeno generalizado en el municipio el presentar diversos niveles de deterioro ambiental, representado en erosión del suelo, el que se debe principalmente a la intervención antrópica, para ampliar las zonas de pastoreo y en otras zonas a las malas prácticas en materia de

prácticas agrícolas insumos dependientes y reforestación con la implantación de especies como pino (*Pinus Oocarpa*) y eucaliptos (*Eucalyptus Globulus Labill*).

Las actividades económicas del municipio están representadas primordialmente por la producción lechera y agricultura, puesto que de ellas derivan su sustento la gran mayoría de las familias del municipio.

Figura 5. Localización del Municipio de San Miguel de Sema



Fuente: Tomado de: <http://www.sanmiguelde sema-boyaca.gov.co> (2011)

3.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS SISTEMAS PRODUCTIVOS TRADICIONAL Y SILVOPASTORIL

El avance en la investigación de sistemas de producción ha dado lugar al surgimiento de múltiples metodologías de caracterización y tipificación de estos sistemas y que se acomodan a los intereses de los tópicos a investigar, metodologías estas que deben ser evaluadas en función de su eficiencia operacional como también a partir de los supuestos o criterios teóricos implícitos o explícitos que las fundamentan; siendo en este caso la metodología del enfoque sistémico, la que se adoptó, siguiendo como criterios marco los siguientes:

- Áreas mayores de cinco hectáreas.
- Distribución geográfica de fincas en uno y otro sistema, en un rango eco geográfico y biofísico lo más homogéneo posible
- Presencia de árboles de la misma especie y en el mismo arreglo en las fincas silvopastoriles.
- Principal actividad de uso del suelo. Sistemas de producción bovina tradicionales y

silvopastoriles

- Homogeneidad en las prácticas de manejo de praderas
- Facilidad de acceso
- Disponibilidad de los productores a permitir la toma de datos y el suministro de la información previa requerida (Encuestas).
- Antecedentes de casos de muerte de animales asociados al síndrome de muerte súbita

3.3 TIPO DE ESTUDIO Y TAMAÑO DE LA MUESTRA

3.3.1 Tipo de estudio

El estudio es de carácter exploratorio y en su ejecución se procedió bajo los lineamientos de una metodología epidemiológica transversal, siendo el propósito en este caso, tipificar y cuantificar las UFC/g de clostridios, que potencialmente actuarían como agentes etiológicos para el desarrollo de enfermedades clostridiales. (Kleinbaum et al., 1982).

3.3.2 Definición y tamaño de la Muestra

La definición muestral se hizo, siguiendo la metodología propuesta por Otte 1991; y ajustada por Ortiz y Benavides en sus respectivos trabajos (2000, 2004, 2010 y 2011) en los cuales uno de sus objetivos fue el de identificar y cuantificar clostridios.

Se tomó como universo de muestreo la base de predios consolidada por Ortiz en 2008 – 2011; base esta que consulta a su vez el censo predial bovino reportado por Fedegan (Estadísticas Fondo Nacional del Ganado 2006), con un total de 564 predios para la región del Valle de Ubaté y Chiquinquirá, de los cuales 165 corresponden al municipio de San Miguel de Sema.

Para calcular el tamaño de la muestra específica en este caso, se tomó como marco de muestreo las 165 fincas, correspondientes al Municipio de San miguel de Sema (Estadísticas del Fondo Nacional del Ganado), estableciéndose como unidad única de muestreo.

La fórmula y procedimientos utilizados en la definición de la muestra es la empleada por Ortiz (2008 -2011) y propuesta por (Otte, 1991) (Vannelli, 1996).

La fórmula utilizada es:

$$n = [1-(1-NC)^{1/d}] * [N-(d-1) /2]$$

Dónde:

n = tamaño de la muestra requerido

N = Marco de muestreo

d = Número de fincas afectadas

NC = Nivel de confianza (95 %)

La muestra quedo establecida así:

Marco de muestreo (Fincas) 165

Fincas preseleccionadas 45

Prevalencia de Clostridium 27,27% (índice reportada por Ortiz 2010 y 2011).

Nivel de confianza 95

Tamaño de la muestra 10

Fracción de muestreo 6,06

De acuerdo a la fracción de muestreo, las fincas se distribuyeron por sistema: 50 por ciento para el sistema tradicional y 50 por ciento para el sistema silvopastoril; 3 y 3 respectivamente y bajo el criterio estadístico de muestra sin remplazo.

3.3 DISEÑO Y APLICACIÓN DE ENCUESTAS

Se diseñó una encuesta estructurada de tal manera que permitirá, seleccionar las fincas por sistema a observar, recolectar la información básica de aspectos biofísicos, ambientales, tecnológicos y preguntas dirigidas que dieran lugar a conocer la percepción de los productores sobre los clostridios e infestaciones clostridiales. (Ver Anexo 1 encuesta)

Se tomó como formato base de las encuestas utilizadas por Ortiz (2008 - 2011), el que se ajustó indagando aspectos específicos para la caracterización de las fincas, enfatizando algunos tópicos del sistema silvopastoril.

Con base en el inventario municipal de 165 predios dedicados a la explotación bovina, se preseleccionaron 16 entre tradicionales y silvopastoriles, los cuales fueron objeto de visita y aplicación de la citada encuesta, para posteriormente elegir entre estos el marco muestral del trabajo.

La información se obtuvo en las fincas, entrevistando a los propietarios, arrendatarios ó mayordomos.

Con esta información se estructuro una base de datos, la cual se analizó utilizando el programa *Epiinfo 6.1*®.

Después de realizar las encuestas en las fincas seleccionadas para el estudio, se realizó una visita para identificación de moscas sobre el animal y toma de materia fecal, esta última se realizó técnica de coprocultivo para identificar larvas de nematodos gastrointestinales.

3.4. PROTOCOLOS

Los protocolos utilizados son los estandarizados por Ortiz (2000,2004 y 2008 -2011), siendo además los que están disponibles técnica y logísticamente en los laboratorios de Corpoica, donde se procesaron las muestras de suelos.

3.4.1 Toma de muestras

Se realizaron los muestreos del sustrato suelo, muestras con las que se procedió a identificar y valorar la presencia de *Clostridium spp*, con frecuencia de dos repeticiones en época seca y dos en época de lluvia (2010 – 2011) respectivamente. Para cada uno de los muestreos se tomaron 20 submuestras de suelo por finca al azar, siempre en los mismos potreros, en forma de zigzag y cuidando incorporar en las muestras, submuestras de aquellos potreros en los cuales se tenían antecedentes de muerte de animales asociadas al síndrome de muerte súbita.

En cada punto de muestreo se retiró la cobertura vegetal y se recogió la submuestra asistido con una pala única destinada para tal fin, a una profundidad de 15 Cts. Las submuestras se mezclaron y homogenizaron para finalmente tomar la muestra destinada al laboratorio que se calculó en 1 kg., la que se empaco en una bolsa estéril, se rotulo con el nombre de la finca, fecha de recolección y su correspondiente georeferenciación, para ser transportada al laboratorio a temperatura ambiente.

Se obtuvieron un total de 24 muestras de suelo para analizar. Cuatro por finca en total, distribuidos en una por cada época de lluvias (2 en total) y una por cada época de sequía (2 en total).

3.4.2 Procesamiento de muestras

Se tomaron 15 g de cada una de las muestras de suelo y se colocaron en cajas de Petri. Se deshidrataron a 37° C hasta que estuvieron completamente secas y pudieron ser homogenizadas y maceradas en un mortero. Se procedió a tamizar una a una en un tamiz de 5mm; del tamizado se tomó 1 gramo y se colocó en una solución de etanol al 50% por 30 minutos a 37°C. Después de este tiempo se tomó y deposito un gramo de suelo en 9 mililitros de Solución Salina al 0,7%, acto seguido se calentó esta solución en baño maría a 80°C por 10 minutos e inmediatamente se sometió esta muestra al efecto de un choque térmico, sumergiendo la suspensión en agua con hielo por 5 minutos. Terminado este procedimiento se agito en vortex la muestra, acto seguido y en cabina de flujo laminar se tomó 0,1 mililitros de esta solución para ser sembrados por duplicado en caldo tioglicolato con trozos de carne (TTC) de marca OXOID (Id Producto: 1438). Las siembras se incubaron en cámaras de anaerobiosis con catalizador Anaerogen® por 48 horas

a 37°C, para luego tomar de este último producto 1 mililitro del tubo con más turbidez e inocularlo por duplicado en caldo infusión cerebro corazón (BHI) marca Oxoid (Id producto: 4137), el cual se incubó nuevamente por 48 horas a 37°C en condiciones anaerobias.

3.4.3 Aislamiento y purificación de cepas

Se tomó 0,1 ml de cada muestra en BHI y se realizó una siembra masiva en superficie de agar sangre al 5% por duplicado, y se incubaron por 72 horas a 37°C en anaerobiosis. Cumplido el tiempo se evaluó el nivel de hemolisis producida en el medio, de cuya selección se procedió a realizar coloraciones de Gram y Verde de malaquita, para identificar el crecimiento de bacilos Gram positivos esporulados, que se caracterizan por ser colonias beta hemolíticas en el medio.

Acto seguido se seleccionaron la siembras con mejores características (bacilos esporulados Gram positivos homogéneos y colonias beta hemolíticas) y se replicaron nuevamente por duplicado en Agar Sangre al 5% mediante la técnica de aislamiento por estría, se incubaron dichas cajas en cámaras de anaerobiosis con Anaerogen® como catalizador por 72 horas a 37°C.

Finalizado el tiempo de incubación se realizó nuevamente una evaluación de las colonias beta hemolíticas y de bacilos Gram positivos esporulados, y se estimó la pureza de la colonia teniendo como indicador las características similares en la coloración de Gram.

En caso de no observar características similares y homogéneas que permitieran determinar que la colonia este pura, se realizaron nueva siembras mediante la técnica de aislamiento por estría en Agar Sangre al 5% e incubación en anaerobiosis, para lograr la purificación de la cepa (figura 6).

3.4.4 Caracterización bioquímica

Se realizó la identificación bioquímica mediante el uso de Kits comerciales de tipificación microbiológica (API 20A®), realizando una suspensión de las colonias después de una incubación de 18 a 24 horas, concentrada en medio líquido correspondiente al patrón de McFarland 3® (9×10^8 mo/mL).

3.4.5 Recuento de Clostridium spp en las muestras

En solución salina estéril (9 ml) se disolvieron 10 gramos de muestra de suelo, posteriormente se realizaron 4 diluciones seriadas en base diez, agregando 1 mililitro de la dilución anterior en 9 mililitros de solución salina estéril. De cada dilución se sembraron 0,1 mililitros en superficie en agar reinforced *Clostridium* media® por duplicado. Se homogenizó y posteriormente se incubaron por 48 horas a 37°C en condiciones de anaerobiosis agregando el catalizador comercial Anaerogen ® a las cámaras de anaerobiosis. A las 48 horas se realizó el conteo de colonias de las cajas que presentaron crecimiento y pudieron ser contadas y reportada la concentración obtenida en cada una de las muestras de los suelos analizados en UFC/g de muestra analizada (Unidades formadoras de colonia por gramo).

Figura 6. Diagrama de procesamiento de muestras



3.5 MEDICIONES DASOMÉTRICAS DE LOS ARBOLES

El componente forestal correspondería a árboles de Sauce (*Salix alba*) sembrados en línea recta y actuando a título de cercas vivas.

Este componente arbóreo fue evaluado dasométricamente (10% del total del componente forestal de cada finca experimental) con el fin de que diera lugar a determinar sus implicaciones en las variaciones climáticas y el efecto sombra en el respectivo agroecosistema

Se procedió a realizar medidas dasométricas de los árboles en las fincas de sistemas silvopastoriles, bajo el criterio de lograr la estimación métrica y espacial de la masa forestal, entendida como el conjunto de árboles que conviven e interactúan en un espacio común. Enfatizando en las variables que permitan observar el comportamiento del efecto sombra, como indicador a correlacionar con variables climáticas y la presencia de clostridios en el suelo.

3.6 VARIABLES CLIMATOLÓGICAS

Las variables climatológicas: precipitación, temperaturas máximas y mínimas y humedad relativa, se registraron directamente en campo con la ayuda de equipos (USB Datalogger, Pluviómetro Walmur, EXTECH INSTRUMENTES CORPORATION®) en cada uno de los predios durante todos los días de la fase experimental y luego se promediaron los meses.

3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con la información recolectada en el campo, se procedió a elaborar tablas de variables, que posteriormente se analizaron por medio de tablas de frecuencias y tablas de estadísticas descriptivas. Estos listados se utilizaron para depurar inicialmente la información. Una vez se obtuvo la base de datos depurada, se realiza un análisis de frecuencias, para una variable específica (Londoño, 1996; Dean et al., 1992).

Se determinaron los tipos y concentraciones de UFC/g de clostridios encontrados en las fincas y se pondero en el respectivo sistema silvopastoril o tradicional.

Con los resultados obtenidos se procesó la información en forma analítica (Martínez & Martínez, 1997; Dean et al., 1992).

En el caso de las variables cuantitativas, se evaluó su distribución normal y a partir de esta y en atención al número de muestras, aplica pruebas estadísticas de correlación que permiten validar las observaciones.

CAPITULO IV. RESULTADOS

4.1 OBJETIVO ESPECIFICO 1. CARACTERIZAR LOS PREDIOS DEL MARCO MUESTRAL DE LOS SISTEMAS DE PRODUCCIÓN TRADICIONALES Y SILVOPASTORILES, DEL MUNICIPIO DE SAN MIGUEL DE SEMA (DEPARTAMENTO DE BOYACA)

Siguiendo la metodología del enfoque de sistemas señalada en el capítulo anterior y definida la muestra, se entró a concretar físicamente las fincas objeto de observación para los sistemas tradicional y silvopastoril, que tuviesen características ecofisiográficas similares.

4.1.1 Criterios para la selección de fincas por sistema

A) Los criterios seguidos para la elección de las fincas con sistema silvopastoril, fueron:

- Especies forrajeras y sistema de pastoreo
- Contar con antecedentes positivos de muerte de animales asociadas al síndrome de muerte súbita
- Reseña de la especie arbórea presente en los sistemas silvopastoriles(SAUCE).

Figura 7. Ubicación Fincas evaluadas en el Municipio de San Miguel de Sema.



Fuente: Google Maps 2013

El sauce presente en los sistemas silvopastoriles, pertenece a la familia de las saliceas (*Salix alba*) o sauco blanco; esta especie crece muy bien cerca de los ríos, arroyos y en general en presencia de abundante agua. El árbol en los sistemas seleccionados cumple la función de cerca viva dispuesta en línea y es culturalmente reconocido por sus propiedades para retener agua en los suelos y terapéuticas, siendo la percepción de los ganaderos encuestados que la presencia del árbol en la pradera cumple la función de cerca viva y contribuye a evitar el encharcamiento excesivo de las praderas.

Nombre científico: *Salix alba*.

Procedencia de la semilla: Europa.

Fecha de establecimiento: 60 años aproximadamente.

Sistema de siembra: En línea recta.

Distancia de siembra: 3 metros.

B) En el caso de los sistemas tradicionales los criterios básicos fueron:

- Especies forrajeras y sistema de pastoreo
- Contar con antecedentes positivos de muerte de animales asociadas al síndrome de muerte súbita

Tabla 1. Distribución de fincas por sistema

Fincas en Sistema Silvopastoril	Fincas en Sistema Tradicional
La Bonita	El Diamante
Berlín	La pradera
Nueva Zelanda	El Silencio

La tabla 1 nos ilustra las fincas silvopastoril y tradicional durante el año de estudio.

Figura 8. Fotografía de árboles sauce distribuidos en línea.



En la figura 8 se puede apreciar la aplicación de los criterios previstos en cuanto a ubicación y similitudes de una y otra de las fincas en el respectivo sistema tradicional o silvopastoril.

4.1.2 Fincas objeto de estudio

Con relación a la temática de caracterización los resultados son:

4.1.2.1 Fincas en sistemas silvopastoriles

A) Finca Nueva Zelanda

Localización: coordenadas N 5° 38' 06.9" y W 73° 48' 0.8"

Área. Total de 14 hectáreas

Figura 9. Foto satelital de la finca Nueva Zelanda de sistema silvopastoril



El pasto que predomina en la finca, es el kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) de siembra natural sin fertilizar y por el alto material de materia orgánica que posee el suelo no hay una fertilización química. El ganado que conforma el hato en la finca Nueva Zelanda es Holstein puro, el promedio de producción de leche diaria es de 15 litros por vaca.

Los parásitos que causan problemas son moscas del genero *Stomoxys calcitrans*, *Haemotobia irritans* y eventualmente *Musca doméstica* y los parásitos internos *Oesophagostomum dentatum*, *Cooperia spp*, *Trichostrongylus spp*, *Bonustomum spp* y strongilidos

El resumen de los componentes del componente pecuario y animal de todas las fincas de estudio se encuentra en la tabla

Tabla 2. Datos obtenidos de las medidas dasométricas de uno de los segmentos arbolados de la finca Nueva Zelanda.

DAP*	Número de árboles	Área basal(m ²)**	Volumen(m ³)***	Sombra%
0-9	18	0,56	0,01	11,00
10-19	3	30,76	0,23	23,00
20-29	2	46,16	0,18	22,50
30-39	10	4,62	0,02	35,00
40-49	2	147,51	3,09	35,00
50-59	3	218,41	5,19	21,00
60	3	1020,20	20,70	18,00

*DAP: Diámetro Altura al Pecho;**Área Basal: $(\pi/4)*DAP^2$; ***(Volumen: AB*Altura Comercial*Factor de forma)

B) Finca Berlín

Localización: coordenadas N 5° 30' 0.3" y W 73° 44' 13.1"

Área. 33 hectáreas.

Figura 10. Foto satelital tomada a la finca Berlín de sistema silvopastoril



Fuente: Google Maps 2013

La finca Berlín es una de las más grandes en cuanto su componente pecuario y animal, su producción de leche está por en promedio de 20 litros de leche diarios, el sistema de refrigeración que posee hace que le paguen mejor su producción.

La falta de un esquema sanitario adecuado causa que se presenten casos de muerte súbita de algunos animales y también parasitismo por endo y ecto parásitos, factores a los que los que los productores asumen ser los responsables de la reducción de la producción de leche y las ganancias de peso en los animales.

Tabla 3. Datos obtenidos de las medidas dasométricas de uno de los segmentos arbolados de la finca

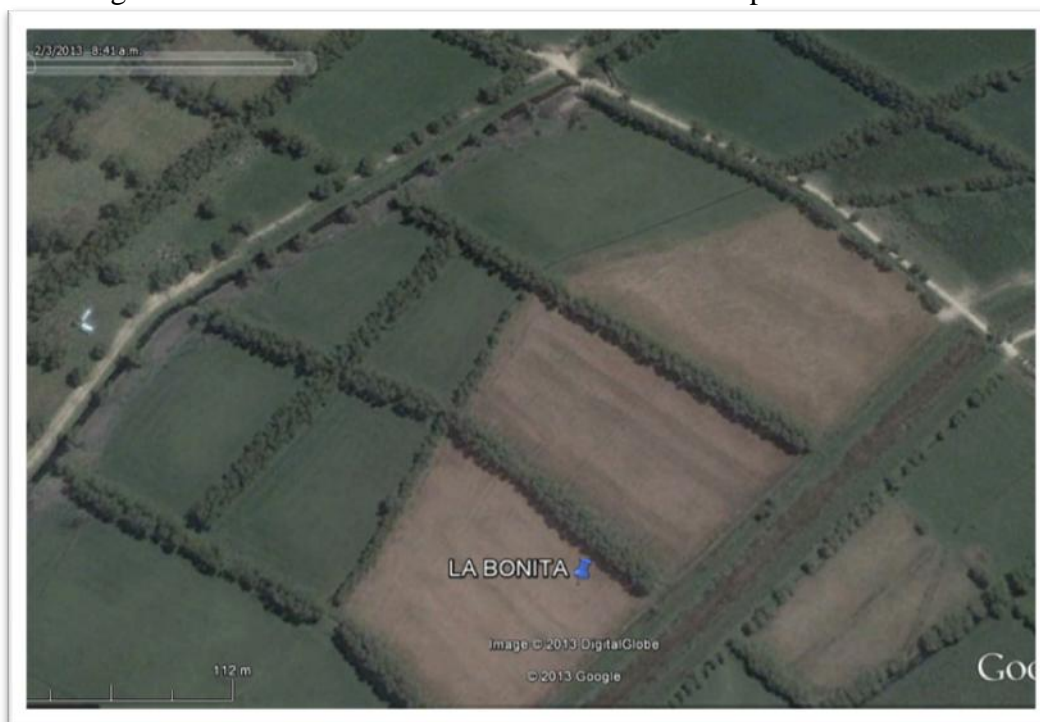
DAP*	Número de árboles	Área basal(m ²)**	Volumen (m ³)***	Sombra
10-19	2	0,25	0,01	35,00
20-29	2	0,52	0,01	55,00
30-39	10	0,87	0,03	57,50
40	2	1,54	0,04	60,00

*DAP: Diámetro Altura al Pecho;**Área Basal: $(\pi/4)*DAP^2$; ***(Volumen: AB*Altura Comercial*Factor de forma)

C) Finca La Bonita

Localización: coordenadas N 5° 29' 51.3" y W 73° 44' 53.2" Área. 33 hectáreas.

Figura 11. Fotografía tomada a la finca la Bonita de sistema silvopastoril



Fuente: Google Maps 2013

El pasto establecido en la finca la bonita es el (pennisetum clandestinum) kikuyo, pastoreo es de tipo rotacional, la plaga que invade las pastura de kikuyo es la *Collaria* spp.

El ganado que tiene la finca la bonita es de raza Holstein, con una producción de leche de 20 litros diarios, los índices sanitario presente en la finca son las moscas hematófagas (*Haemotobia irritans*, *Stomoxys calcitrans*), los parasitos presentes en el sistema son (*Cooperia*, *Moniezia*, *Trychostrongylus*).

Tabla 4 . Datos obtenidos de las medidas dasométricas de uno de los segmentos arbolados de la finca

DAP*	Número de arboles	Área basal **	Volumen (m ³)***	Sombra
0-9	2	0,02	0,02	15
10-19	4	0,00	0,00	3,75
20-29	13	0,00	0,00	26,15
30-39	18	1,12	2,27	31
40-49	7	1,60	2,36	19,28
50-59	5	2,31	3,45	30,00
60	8	5,77	5,72	25,00

*DAP: Diámetro Altura al Pecho;**Área Basal: $(\pi/4)*DAP^2$; ***(Volumen: AB*Altura Comercial*Factor de forma)

4.1.2.1.1 Aspectos comunes en la caracterización de estos sistemas son:

- La especie arbórea, presente está constituida por árboles que según las medidas dasométricas corresponde a arboles adultos, distribuidos en línea con la función de actuar como cercas vivas y que no reciben manejo alguno, salvo podas de ramas laterales que a criterio de los ganaderos interfieren con el crecimiento de los pastos.
- El efecto sombra en los arreglos esta correlacionado a criterio de los productores en proporcionar confort climático a los animales en el momento de mayor elevación de la temperatura durante el día.
- El efecto de interacciones de los arboles con las praderas no está claramente definido, más se observa que el vigor de las pasturas es más homogéneo en las áreas de influencia del efecto

sombra y cobertura de las copas de los árboles, atribuido presumiblemente a los reportes de literatura en cuanto a: mayores niveles de agua en el suelo, mayores cantidades de materia orgánica y ciclaje de nutrientes, microclima por el efecto sombra y actuar como barreras rompe vientos con los consecuentes aumentos de humedad relativa.

- La adopción de tecnologías en las mismas es deficiente y no cuentan con registros que permitan predecir el comportamiento general del sistema.

4.1.2.1.2 Mediciones de Sombra en el Sistema Silvopastoril

Partiendo del conocimiento que ya se tiene en cuanto a la influencia e interacciones positivas y negativas que se dan al interior de los sistemas agroforestales, en el trabajo se buscó tratar de identificar si la estructura y funcionamiento del sistema tenía alguna relación con la presencia de clostridios. Al no contar con metodologías que dieran luces al respecto, se procedió a revisar las metodologías utilizadas para identificar y cuantificar interacciones en sistemas de árboles en líneas o cercas vivas, y a partir de allí y con base en un indicador conocido como Densidad Lineal, entrar a plantear el cómo llegar a conocer el efecto de la proyección de la sombra-finca, siendo la presente una primera aproximación al respecto.

Los criterios propuestos para este efecto por Somarriba y Calvo (2001) son:

“Un segmento es una sección de la plantación lineal de árboles a cuyos lados se mantienen constantes actividades del uso del suelo.

Densidad lineal o Densidad árboles de la finca (una medida del grado de división interna de la finca y de la relación perímetro-superficie) se obtiene dividiendo la longitud total de plantaciones lineales (m) entre la superficie total de la finca (ha). La densidad lineal se expresa en metros de plantación lineal por hectárea de superficie, en nuestro caso la denominaremos densidad arboles”

La estimación se realizó siguiendo los siguientes algoritmos:

1. La sombra se proyecta sobre la superficie en atención a la posición del sol y un azimut.
2. Considera cuatro medidas básicas:
 - a) Área de la plantación o parcela demostrativa (a_t).
 - b) Número de árboles (n) en a_t .
 - c) El diámetro de las copas promedio (d) o los diámetros de copa de cada árbol (d_i) y.
 - d) La eclosión promedio de las copas (o) o la eclosión de la copa de cada árbol (o_i)
3. El cálculo es:
 - a) Con el diámetro de copa (d o d_i) calculamos el área de proyección vertical de la copa (a o a_i) suponiendo en forma circular [$a = d^2 * (\pi/4)$].
 - b) Ajustamos el área de la proyección de la copa con el factor de oclusión de la copa (o u o_i) para estimar el área “tapada” por árbol, ($p.e.a * o$)

- c) Estimamos la superficie tapada en toda la plantación o parcela de muestra (b) expandiendo el área por árbol a toda la población arbórea ($b=n*a*o$), y
- d) Dividimos el área de “b” entre el área total de la plantación o parcela (a!) y lo expresamos en porcentaje [p.e $100*(b/a!)$.]

Siguiendo los planos de las fincas silvopastoriles y a partir de los datos obtenidos en muestras de las líneas de árboles (100 metros), se midieron las variables de los árboles, se tabularon los datos y se estimó el área de sombra proyectada por los arboles por finca, con los siguientes resultados:

Tabla 5. Ponderación de la sombra finca Nueva Zelanda con base en la densidad arboles

Finca Nueva Zelanda						
Segmen tos	Metros Segmen tos	Radio Promed io	Área Sombra M2 x Factor de Oclusión	% Área Sombra ha	Área Finca Ha	Densidad Arboles/ha
4	1004,34	118,76	24823.37	2,48	14	71,74

La finca Nueva Zelanda se registraron mediciones de cuatro segmentos para un total de 1004,34 metros lineales, el área de sombra en M2 están en el rango de 5538,15 y 7052,90 metros, el % de sombra es de 2,48 ha para la finca, encontrándose una densidad de 71,74 árboles por hectáreas.

Tabla 6. Ponderación de la sombra finca Berlín con base en la densidad arboles

Finca Berlín						
Segmento s	Metros Segment os	Radio Promed io	Área Sombra M2 x Factor de Oclusión	% Área Sombra ha	Área Finca Ha	Densidad Arboles/ha
13	3922,01	151.0	132860.6	13.29	33	118,85

En esta finca se midieron 13 segmentos correspondientes a 3922,01 metro lineales, el promedio de la sombra de los segmentos medidos ocupan una área de 13,29 hectáreas para el total de 33 hectáreas que tiene la finca, la finca se encuentra una densidad de 118,85 árboles por hectárea.

Tabla 7 . Ponderación de la sombra finca La Bonita con base en la densidad arboles

Finca La Bonita						
Segmentos	Metros Segmentos	Radio Promedio	Área Sombra M2 x Factor de Oclusión	% Área Sombra ha	Área Finca Ha	Densidad Arboles/ha
70	5992,72	42.8	342,91	7,32	36	166,46

La finca la bonita cuenta todos los segmentos medidos equivalente a 5992,72 metros lineales, con promedios de sombra de 1076.88 M2 esta finca por su cantidad de árboles es la que más sombra le aporta al sistema, la cantidad de sombra que aporta los arboles nos cubre un área de 7,32 hectáreas de sombra que tiene la finca, la densidad es 166,46 árboles establecidos en el sistema.

4.1.2.2 Fincas de sistema tradicional

A) Finca El Prado

Localización: coordenadas N 5° 30' 17,1" y W 73° 30' 40.54"

Área: nueve hectáreas.

Figura 62. Foto satelital tomada a la finca El Prado de sistema Tradicional



Fuente: Google Maps 2013

El inventario ganadero se ve afectado por la muerte súbita que se presenta en la finca, su raza es Holstein, su producción de leche está por encima de los 15 litros diarios.

B) Finca El Silencio

Localización: coordenadas N 5° 30' 15.6" y W 73° 42' 40.7"

Área.: 5 hectáreas

Figura 13. Foto satelital tomada a la finca El Silencio de sistema Tradicional



Fuente: Google Maps 2013

La raza de ganado bovino que predomina en la finca el silencio es Holstein, con promedios de 15 litros de leche diaria, observándose la presencia de endoparásito y ectoparásitos en la finca.

C) Finca Diamante

Localización: coordenadas N 5° 36' 46.6" y W 73° 45' 46.6"

Área: 50 hectáreas

Figura 14. Fotografía tomada a la finca El Diamante de sistema tradicional



Fuente: Google Maps 2013

Este hato es de muy buena genética, se maneja en pastoreo rotacional y su producción de leche está en promedio de 20 litros de leche diarios.

Tabla 8. Componente pecuario y animal de las fincas de estudio.

Finca	Componente pecuario						Componente animal					
	Nombre del pasto	Cobertura	Clasificación	Pastoreo	Insecto plaga	Población total	Raza	Vacas en producción	Vacas horas	Novillas de vientre	Novillas de levante	Parásitos presentes
Nueva Zelanda	Kikuyo (<i>Pennisetum clandestinum</i>)	Buena	Natural	Rotacional	<i>Collaria spp</i>	39	Holstein	15	6	8	10	<i>Haemotobia irritans</i> , <i>Stomoxys calcitrans</i> y <i>ypgi</i>
Berlín	<i>Pennisetum clandestinum</i> 90% y <i>Lolium multiflorum</i> 10%	Buena	Pastura natural – mejorada	Rotacional	<i>Collaria spp</i>	127	Holstein	63	12	27	25	<i>Haemotobia irritans</i> , <i>Stomoxys calcitrans</i> , y parásitos gastrointestinales (<i>Monoxia spp</i> y <i>Strongyloides</i>)
La bonita	Kikuyo (<i>Pennisetum clandestinum</i>)	Buena	Pastura natural	Rotacional	<i>Collaria spp</i>	73	Holstein	45	5	8	15	<i>Haemotobia irritans</i> , <i>Stomoxys calcitrans</i> , <i>ypgi</i> (<i>Cooperia</i> y <i>Trychostrongylus</i>).
El prado	Kikuyo (<i>Pennisetum clandestinum</i>)	Buena	Pastura natural	Rotacional	<i>Collaria spp</i>	25	Holstein	12	3	4	6	<i>Haemotobia irritans</i> , <i>Stomoxys calcitrans</i> y parásitos gastrointestinales
El silencio	Kikuyo (<i>Pennisetum clandestinum</i>)	Buena	Pastura natural	Rotacional	<i>Collaria spp.</i>	13	Holstein	7	1	1	4	<i>Haemotobia irritans</i> , <i>Stomoxys calcitrans</i> y parásitos gastrointestinales
El diamante	Kikuyo (<i>Pennisetum clandestinum</i>)	Buena	Pastura natural	Rotacional	<i>Collaria spp.</i>	106	Holstein	65	10	23	10	<i>Haemotobia irritans</i> , <i>Stomoxys calcitrans</i> y parásitos gastrointestinales

Aspectos comunes en la caracterización de estos sistemas tradicionales de explotación bovina son:

- En todas las fincas el manejo de praderas es rotacional, con esporádicas incorporaciones de fertilización y renovación de praderas, las mismas que son afectadas regularmente por *Collaria* spp., y la consecuente repercusión en disponibilidad de forraje para los animales.
- La adopción de tecnologías en las mismas es deficiente y no cuentan con registros que permitan predecir el comportamiento general del sistema.

4.2 OBJETIVO ESPECIFICO 2. “AISLAR, IDENTIFICAR Y CUANTIFICAR UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS DE BACTERIAS PATOGENAS DEL GENERO *Clostridium* ENCONTRADAS EN CADA SISTEMA PRODUCTIVO (TRADICIONAL Y SILVOPASTORIL), A PARTIR DE MUESTRAS DE SUELOS” E INFERIR SUS RELACIONES CON VARIABLES CLIMATICAS”

4.2.1 Muestreo de suelos, procesamiento de las muestras de suelos, aislamiento y purificación de cepas clostridiales y caracterización y cuantificación unidades formadoras de colonias.

Los procedimientos seguidos en estos procesos son los descritos para los mismos en el aparte de metodologías, siendo nuestro interés en particular caracterizar las colonias de clostridios y cuantificar las unidades formadoras de colonias como potenciales factores de riesgo de enfermedades clostridiales, se detallan estos dos últimos procedimientos así:

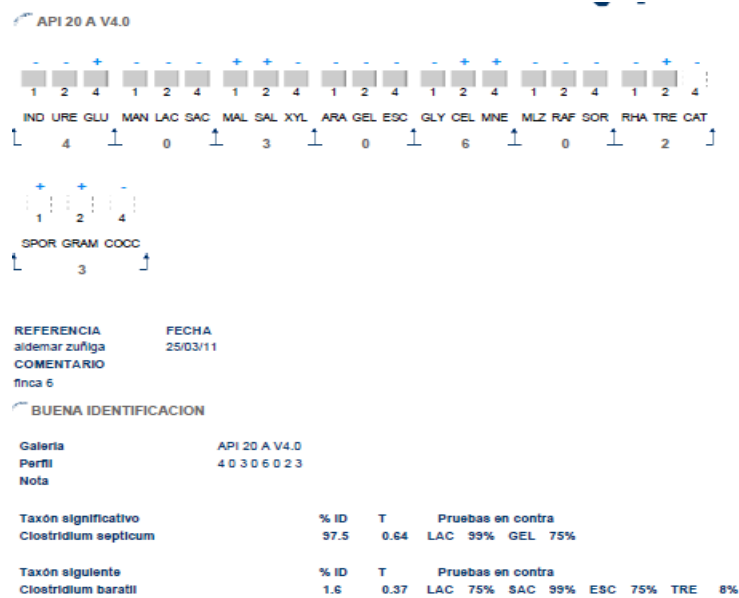
4.2.2 Caracterización e identificación de bacterias

Se realizó la identificación bioquímica mediante el uso de Kits comerciales de tipificación microbiológica (API 20A®), realizando una suspensión de las colonias después de una incubación de 18 a 24 horas, concentrada en medio líquido correspondiente al patrón de McFarland 3® (9×10^8 células /mL). (Figura 15 y 16).

Figura 15. Pruebas bioquímicas colorimétricas para determinar la especie de *Clostridium spp.* aislada en la finca el Prado con su respectivo formato de registro de datos



Figura 16. Identificación bioquímica obtenida por el procesamiento de los datos con el software API-Web® para la finca El Prado.



Nota: Los resultados obtenidos de las otras fincas a partir del análisis de las muestras mediante el software API 20 se anexan al final del trabajo. (Ver Anexo 2.)

4.2.3 Presencia y recuento de unidades formadoras de colonias

En solución salina estéril (9 ml) se disolvieron 10 gramos de muestra de suelo, posteriormente se realizaron 4 diluciones seriadas en base diez, agregando 1 mililitro de la dilución anterior en 9 mililitros de solución salina estéril. De cada dilución se sembraron 0,1 mililitros en superficie en agar reinforced *Clostridium* media® por duplicado. Muestras homogéneas se llevaron a incubadora por 48 horas a 37°C en condiciones de anaerobiosis agregando el catalizador comercial Anaerogen ® a las cámaras de anaerobiosis. A las 48 horas se realizaron los conteos de colonias en las cajas de Petri que mostraron mayor volumen de crecimiento y cuyas características morfológicas dieran lugar a ser contadas.

Se reportan las concentraciones obtenidas en cada una de las muestras de los suelos analizados en UFC/g de muestra analizada (Unidades formadoras de colonia por gramo). En la tabla se presentan los resultados consolidados que indican la identificación bioquímica de *Clostridium* spp., correspondiente a la temporada seca del primer muestreo (junio 2010) y en la tabla se presentan los resultados de la identificación bioquímica de *Clostridium* spp., correspondiente a la temporada seca del segundo muestreo (Febrero de 2011).

Tabla 9. Resumen de características de cultivo de las muestras en épocas seca

Sistema	Finca	Gram	Hemólisis en agar sangre	Verde de malaquita	Tipo de clostridium	% de certeza	UFC/gr	Temporada
Productivo								
Tradicional	El Diamante	+	Alfa	Esporas subterminales, bacilos cortos	<i>C. beijerinckii</i>	95,5%	48000	primera seca
	Silencio	+	Beta	Esporas subterminales, bacilos largos	<i>C. botulinum</i>	99,40%	60000	primera seca
	El prado	+	Beta	Esporas terminales	<i>C. septicum</i>	97,5%	93000	primera seca
Silvopastoril	Berlín	+	Beta	Esporas terminales	<i>C. septicum</i>	99,9%	22000	primera seca
	Nueva Zelanda	+	Alfa	Esporas subterminales, bacilos largos	<i>C. beijerinckii</i>	95,50%	37000	primera seca
	La Bonita	+	Beta	Esporas terminales y subterminales, bacilos largos	<i>C. botulinum</i>	90,40%	23000	primera seca
Tradicional	El Diamante	+	Alfa	Esporas subterminales, bacilos largos	<i>C. beijerinckii</i>	90%	30000	segunda seca
	Silencio	+	Beta	Esporas terminales	<i>C. perfringens</i>	96%	1200000	segunda seca
	El prado	+	Alfa	Esporas subterminales, bacilos largos	<i>C. beijerinckii</i>	93,60%	760000	segunda seca
Silvopastoril	Berlín	+	Alfa	Esporas subterminales, bacilos largos	<i>C. beijerinckii</i>	96%	130000	segunda seca
	Nueva Zelanda	+	Alfa	Esporas subterminales, bacilos largos	<i>C. beijerinckii</i>	90%	280000	segunda seca
	La Bonita	+	Alfa	Esporas subterminales, bacilos largos	<i>C. beijerinckii</i>	96%	50000	segunda seca

Resultado Bioquímico: Clases de clostridios identificados.

% de Certeza: Es el % de clostridios que tuvo en cuenta por encima de 90% de que es la bacteria identificada.

UFC/g: Cantidad de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo.

A partir de los resultados de la temporada seca del primer muestreo se pudo evidenciar en todas las muestras, bacterias del genero *Clostridium spp*, con más del noventa por ciento de certeza. La presencia de *Clostridium spp*, altamente patógenos (*C. botulinum* y *C. septicum*), se encontraron en los sistemas tradicionales (Silencio y El prado) y en sistemas silvopastoriles (Berlín y La Bonita). En el resto de las muestras de los predios evaluados (El Diamante y Nueva Zelanda) se logró aislar *Clostridium spp* medianamente patógenos (*C. beijerinckii*).

En los resultados del primer muestreo de la temporada de lluvias, se logró identificar la presencia de los *Clostridium spp*. Los clostridios patógenos que se encontraron fueron (*C. botulinum* y *C. septicum*), el primero de ellos asociado a un predio con sistema Tradicional (Silencio) y el segundo asociado a un sistema silvopastoril (Nueva Zelanda). En las restantes muestras, se encontraron bacterias del género *C. beijerinckii*, medianamente patógeno, en para los predios El diamante y El Prado del sistema tradicional y en Berlín del sistema silvopastoril; al igual que *C. bifermentans*, patógeno, en la finca la Bonita del sistema silvopastoril.

En la temporada seca de Febrero 2011, solamente se logró aislar un *Clostridium* altamente patógeno, *C. perfringens* en la finca El Silencio con sistema tradicional; en las restantes fincas de uno y otro sistema se identificaron *C. beijerinckii* mediante patógeno.

Tabla 10. Resumen de características de cultivo de las muestras en épocas seca

Sistema	Finca	Gram	Hemólisis en agar sangre	Verde de malaquita	Tipo de clostridium	% de certeza	UFC/gr	Temporada
Productivo								
Tradicional	El Diamante	+	Alfa	Esporas subterminales, bacilos cortos	<i>C. beijerinckii</i>	94%	13000	primera lluvias
	Silencio	+	Beta		<i>C. botulinum</i>	96.5%	30000	primera lluvias
	El prado	+	Alfa	Esporas subterminales, bacilos cortos	<i>C. beijerinckii</i>	99.9%	28000	primera lluvias
Silvopastoril	Berlín	+	Alfa	Esporas subterminales, bacilos cortos	<i>C. beijerinckii</i>	96.1%	30000	primera lluvias
	Nueva Zelanda	+	Beta	Esporas terminales	<i>C. septicum</i>	98.4%	1200000	primera lluvias
	La Bonita	+	Gama	Esporas centrales y subterminales	<i>C. bifermentans</i>	96%	760000	primera lluvias
Tradicional	El Diamante	+	Beta	Esporas subterminales, bacilos largos	<i>C. botulinum</i>	96%	3100	segunda lluvias
	Silencio	+	Alfa	Esporas subterminales, bacilos cortos	<i>C. beijerinckii</i>	96.5%	1600	segunda lluvias
	El prado	+	Gama	Esporas centrales y subterminales	<i>C. bifermentans</i>	78%	2900	segunda lluvias
Silvopastoril	Berlín	+	Beta	Esporas terminales	<i>C. septicum</i>	99%	8700	segunda lluvias
	Nueva Zelanda	+	Alfa	Esporas subterminales, bacilos cortos	<i>C. beijerinckii</i>	99.9%	3500	segunda lluvias
	La Bonita	+	Beta	Esporas subterminales, bacilos largos	<i>C. botulinum</i>	96%	11000	segunda lluvias

En las muestras de los sistemas silvopastoriles de la temporada de lluvias del segundo muestreo se logró identificar *C. botulinum* altamente patógeno en el predio, El Diamante del sistema tradicional, y para el sistema silvopastoril se encontraron *C. botulinum* altamente patógeno en La Bonita, *C. septicum*, y *C. bifermentans* en la finca el Prado, que son considerados como patógeno, *C. beijerinckii* que es considerado como medianamente patógenos encontrándose en las fincas El Silencio y El Prado del sistema tradicional respectivamente y *C. beijerinckii* en la finca Nueva Zelanda del sistema silvopastoril.

En general los promedios de Concentración de *Clostridium spp.*, en suelos durante la temporada de lluvias del 2011, variaron con respecto a la de 2010, siendo menores en esta última.

La siguiente tabla resume y relaciona las unidades formadoras de colonia en números absolutos,

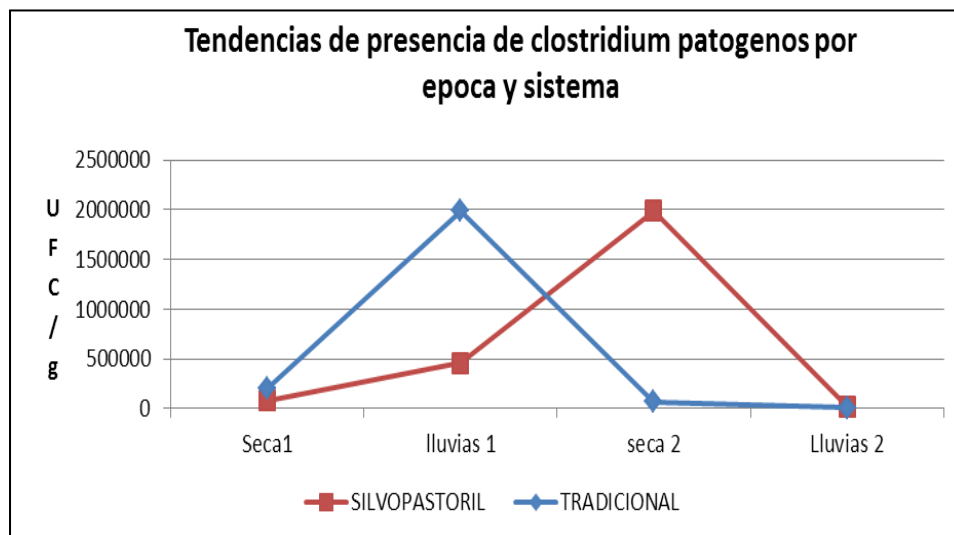
Tabla 11. Resumen del recuento de UFC/g en números absolutos por periodo durante la fase experimental.

SISTEMA	Estación	Seca1	Lluvias 1	Seca 2	Lluvias 2
	Finca				
TRADICIONAL	El diamante	48000	13000	30000	3100
	El Silencio	60000	30000	1200000	1600
	El prado	93000	28000	760000	2900
SILVOPASTORIL	Berlín	22000	30000	130000	8700
	Nueva Zelanda	37000	1200000	280000	3500
	La bonita	23000	760000	50000	11000

4.2.4 Análisis de la concentración y distribución del tipo de *Clostridium spp.* Encontrado por época, tipo y sistema de producción

4.2.4.1 Tendencias de la presencia de *clostridium spp* patógenos por época y sistema

Figura 17. Tendencias de la presencia de *clostridium spp* patógenos por época y sistema



Al observar la tendencia cuantitativa de las colonias de *Clostridium spp*, se encontró: que se presenta una distribución no normal. Observando la distribución de las UFC/g por sistema y temporada se puede observar una tendencia al crecimiento más marcado en el tránsito de la primera época seca (junio), a la primera época de lluvias a favor del sistema tradicional. En el tránsito de la primera época de lluvias (noviembre), la segunda época seca (febrero), se observa que se mantiene el crecimiento en el sistema silvopastoril y un decrecimiento marcado en el sistema tradicional, siendo la tendencia desde esta última época hacia la segunda de lluvias (mayo), decreciente en los dos sistemas, y más marcado en el tradicional.

4.2.4.2 Frecuencias de UFC/g por tipo de *Clostridium*, aislado y sistema de producción

Tabla 12. Frecuencias de UFC/g por tipo de *Clostridium spp*, aislado y sistema de producción

TIPO DE <i>Clostridium</i>	NIVEL DE PATOGENICIDAD	SISTEMA TRADICIONAL		SISTEMA SILVOPASTORIL	
		Frecuencia	UFC/g	Frecuencia	UFC/g
<i>C. botulinum</i>	Alta	3	90.010	2	34.000
<i>C. septicum</i>	Alta	1	93.000	3	2.092.000
<i>C. beijerinckii</i>	Media	6	996.160	6	527.350
<i>C. bifermentans</i>	Media	1	2.900	1	760.000
<i>C. perfringens</i>	Alta	1	1.200.000	0	0

Al observar el comportamiento en terminos de frecuencia, y por niveles de patogenicidad, la presencia de bacterias del género *Clostridium spp*. Aisladas, se encontró que en todos los periodos y sistemas estuvieron presentes bacterias de genero *Clostridium spp*; catalogados como patógenos y medianamente patógenos.

4.2.4.3 Validación estadística de las observaciones de UFC/g registradas durante la fase experimental

Distribución normal de las UFC/g. acumuladas por épocas de sequía y de lluvias por épocas de sequía y de lluvias

Tabla 13. Valores P para distribución normal de UFC/g. Acumuladas

Seca 1	Lluvias 1	Seca 2	Lluvias 2
0.463	0.120	0.009	0.082

Los valores P, con relación a un α 0.05, para determinar la distribución normal de las UFC/g, señalan valores según los cuales las épocas seca 1, lluvias 1 y lluvias 2 no se distribuyen normalmente, caso contrario para la serie de la época, seca 2.

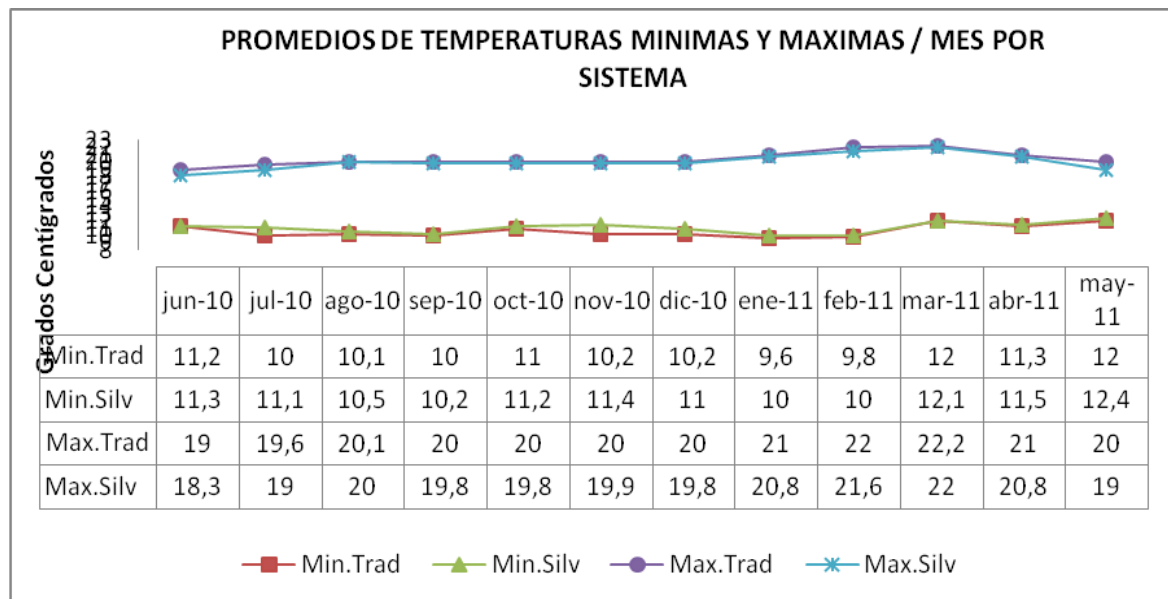
Una vez establecida la distribución de los datos de UFC/g, se procedió a aplicar pruebas estadísticas que permitieran encontrar significancias de asociación entre las mismos, concluyendo que a pesar de haber encontrado correlaciones, las mismas no son representativas por efecto del número de datos obtenidos.

4.3 COMPORTAMIENTO DE VARIABLES CLIMATICAS

4.3.1 Fluctuaciones de Temperatura

Se obtuvieron los datos de temperatura por finca y por sistema durante la fase experimental de 12 meses, encontrándose lo siguiente:

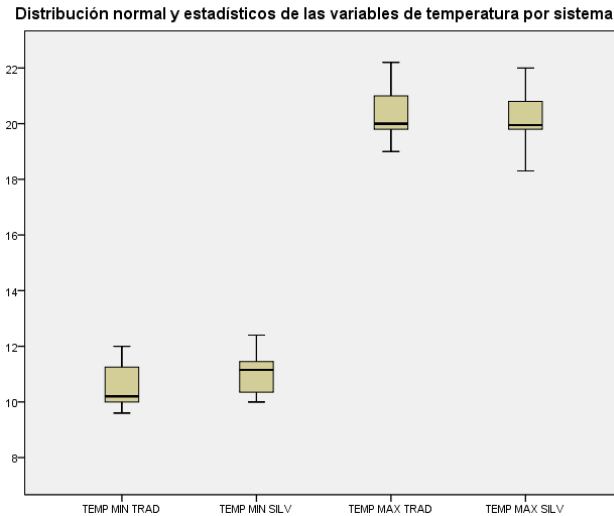
Figura 18. Fluctuaciones de Temperatura mínima y máxima mensual.



En la gráfica se puede apreciar que el comportamiento cuantitativo de las temperaturas mínimas y máximas de los sistemas observados, mantienen unas tendencias más o menos similares: estando las variaciones entre ellas para el caso de temperaturas mínimas mensuales para el sistema silvopastoril en un intervalo de ± 10 a $\pm 12,4^{\circ}\text{C}$, y entre $\pm 18,3^{\circ}\text{C}$ a $\pm 21,6^{\circ}\text{C}$. Sus temperaturas máximas. Para el sistema tradicional el intervalo de temperaturas mínimas mensuales estuvo entre $\pm 9,6$ a $\pm 11,3^{\circ}\text{C}$ y para las máximas de $\pm 19^{\circ}\text{C}$ a $\pm 22,2^{\circ}\text{C}$

Estadísticamente el análisis de temperaturas, mostró una distribución no normal y la prueba de hipótesis, mostró que existen diferencias entre las registradas tanto como mínimas, como máximas en los sistemas observados.

Tabla 14. Distribución normal y estadísticos de Fluctuaciones de Temperatura por sistema



SISTEMA/ EPOCA	Valores P para distribución normal	
	Temp Max	Temp Min
TRADICIONAL	0.423	0.005
SILVOPASTORIL	0.235	0.005

Los valores P. señalan distribuciones normales en las temperaturas mínimas y no normales en las máximas.

Tabla 15. Estadísticos descriptivos para temperatura

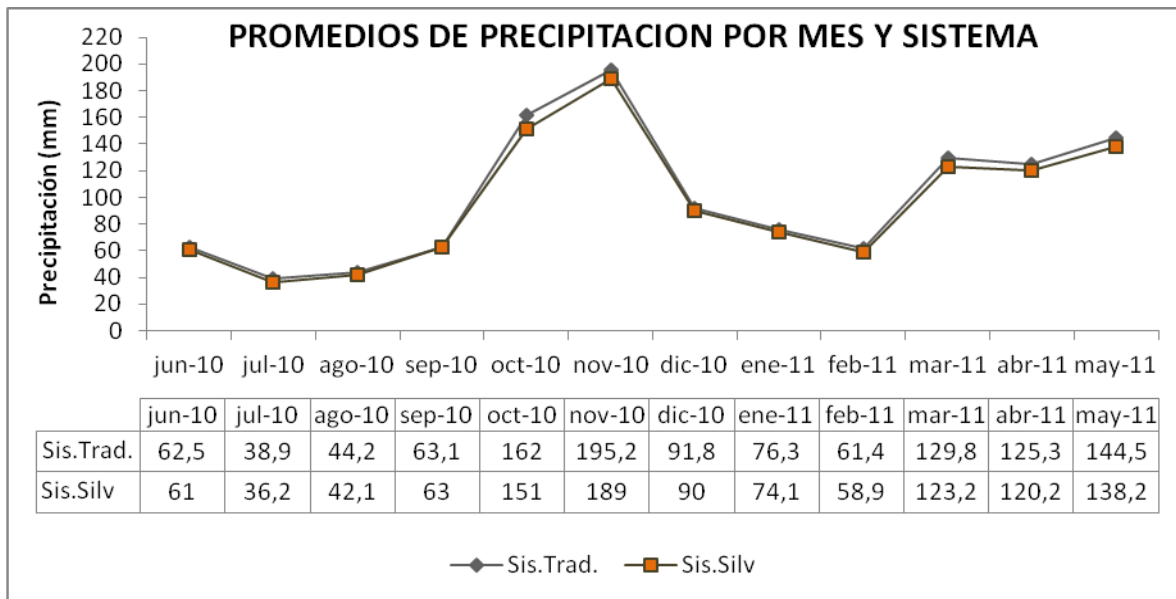
Estadísticos descriptivos						
	Dev. típ.	Varianza	Asimetría		Curtosis	
	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Error típico	Estadístico	Error típico
TEMP MIN TRAD	,8451	,714	,636	,637	-1,064	1,232
TEMP MAX TRAD	1,033	1,068	,665	,637	-,281	1,232
TEMP MIN SILV	,7728	,597	,121	,637	-,666	1,232
TEMP MAX SILV	1,0265	1,054	,194	,637	,225	1,232

Los estadísticos permiten predecir que el comportamiento de las temperaturas en el sistema silvopastoril son más homogéneas, con varianzas menores y asimetrías más estrechas, generando un microclima que bien puede favorecer la proliferación de clostridios.

4.3.2 Fluctuaciones de precipitación

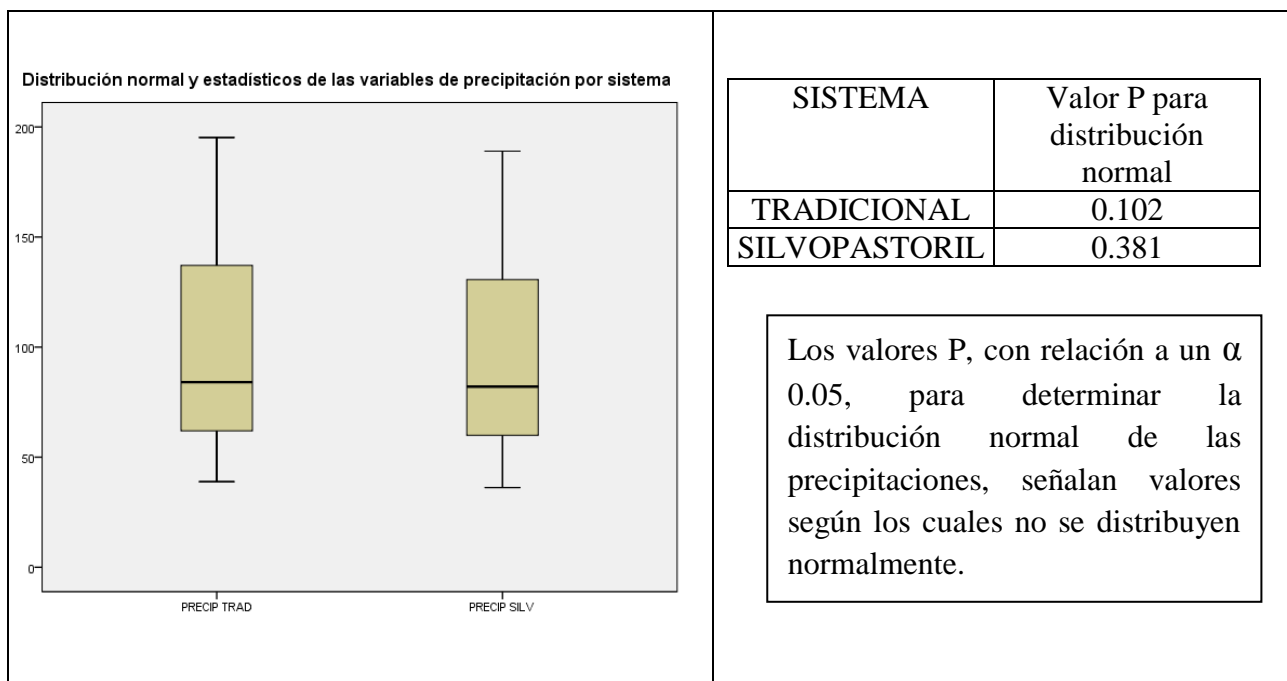
Se obtuvieron los datos de precipitación por finca y por sistema durante la fase experimental de 12 meses, encontrándose lo siguiente:

Figura 19. Fluctuaciones de Precipitación mensual por sistema



En la gráfica se aprecia que las precipitaciones en el sistema silvopastoril, estuvieron por debajo de las registradas en el sistema tradicional, efecto este debido a la interceptación de las lluvias por las copas de los árboles, siendo los rangos entre: ± 36 mm y ± 189 mm, en el sistema silvopastoril y ± 38 mm a ± 196 mm en el sistema tradicional.

Tabla 16. Distribución normal y estadísticos para distribución normal de precipitación por sistema



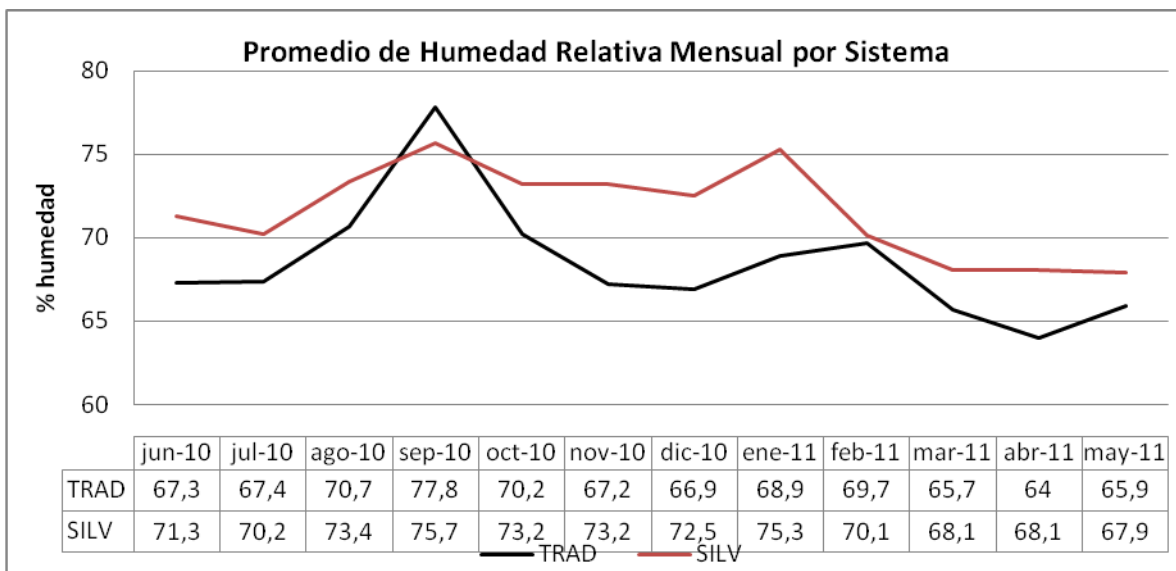
Estadísticos descriptivos						
	Desv. típ.	Varianza	Asimetría		Curtosis	
	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Error típico	Estadístico	Error típico
PRECIP TRAD	50,5847	2558,812	,582	,637	-,829	1,232
PRECIP SILV	48,115	2315,038	,589	,637	-,651	1,232

Los estadísticos permiten corroborar el comportamiento de la precipitación en el sistema silvopastoril con varianzas menos pronunciadas.

4.3.3 Fluctuaciones de humedad relativa

Los resultados de los datos de humedad relativa fueron tomados para cada sistema, semanalmente y tabulados mensualmente con el fin de unificar intervalos de registro de datos, encontrándose que los porcentajes promedio en cada sistema se comportan de manera diferente. Es de resaltar que el sistema silvopastoril alcanzó picos de humedad relativa hasta de un promedio mensual de 77,8 % mientras el sistema tradicional solamente un promedio mensual de 73,4 % .

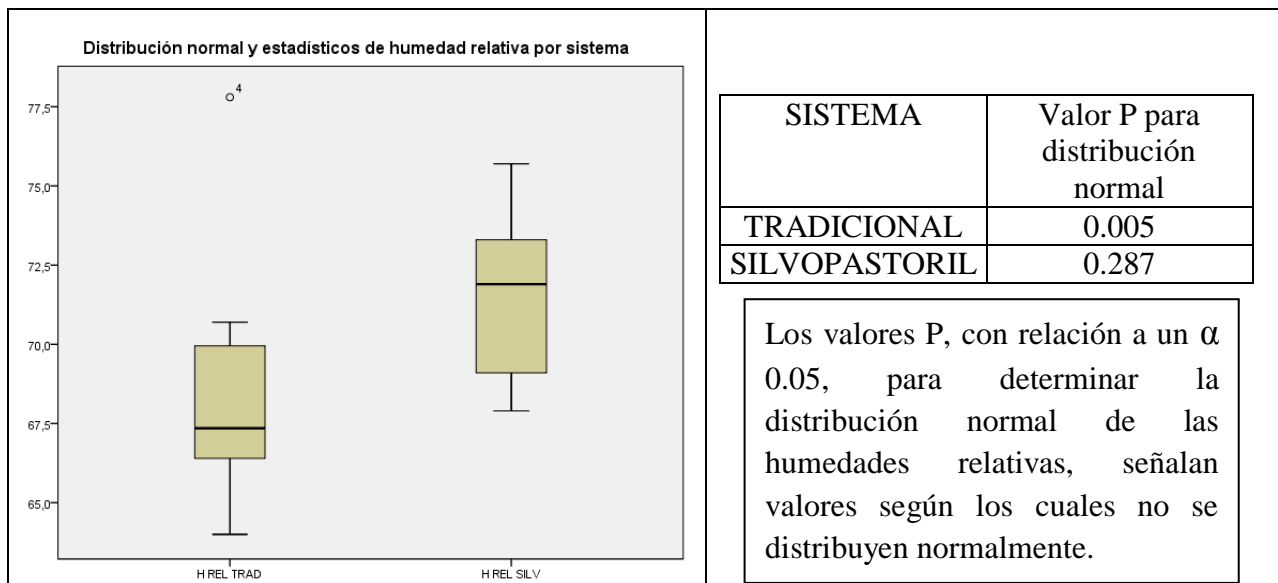
Figura 20 . Promedios mensuales del porcentaje de humedad relativa por sistema



En la gráfica se aprecia que la Humedad relativa en el sistema silvopastoril, estuvo por encima de los registros del sistema tradicional, efecto este debido a la presencia de menores temperaturas y mayores tiempos de precipitación del agua que debe hacer sus recorridos por las copas y doseles

de los árboles, siendo los rangos entre: $\pm 68\%$ y $\pm 76\%$ en el sistema silvopastoril y $\pm 66\%$ a $\pm 78\%$ en el sistema tradicional.

Tabla 29. Distribución normal y estadísticos para distribución normal de humedad relativa por sistema



Estadísticos descriptivos						
	Desv. típ.	Varianza	Asimetría		Curtosis	
	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Error típico	Estadístico	Error típico
H REL TRAD	3,5363	12,506	1,707	,637	4,141	1,232
H REL SILV	2,7329	7,469	-,022	,637	-1,236	1,232

Los estadísticos permiten corroborar el comportamiento de la humedad relativa en el sistema silvopastoril con varianzas menos pronunciadas y alta asimetría en sus valores a través del tiempo.

4.3.4 Correlaciones integradas de las variables climáticas por sistema

Tabla 18 2. Correlaciones entre variables climáticas por sistema

		Correlaciones							
Variables		TEMP MIN TRAD	TEMP MAX TRAD	PRECIP TRAD	H REL TRAD	TEMP MIN SILV	TEMP MAX SILV	PRECIP SILV	H REL SILV
TEMP MIN TRAD	Correlación de Pearson	1	-.072	.490	-.516	.892	.104	.480	-.712
	Sig. (bilateral)		.823	.106	.086	.000	.748	.114	.009
	Suma de cuadrados y productos cruzados	7,857	-.695	230,593	-16,965	6,408	.990	214,595	-18,087
TEMP MAX TRAD	Covarianza	.714	-.063	20,963	-1,542	.583	.090	19,509	-1,644
	Correlación de Pearson	-.072	1	.006	-.082	-.239	.918	.002	-.183
	Sig. (bilateral)	.823		.985	.800	.455	.000	.996	.568
PRECIP TRAD	Suma de cuadrados y productos cruzados	-.695	11,743	3,445	-3,303	-2,098	10,715	.927	-5,695
	Covarianza	-.063	1,068	.313	-.300	-.191	.974	.084	-.518
	Correlación de Pearson	.490	.006	1	-.370	.607	.196	.999	-.196
H REL TRAD	Sig. (bilateral)	.106	.985		.237	.036	.542	.000	.541
	Suma de cuadrados y productos cruzados	230,593	3,445	28146,937	-727,875	260,862	111,820	26754,085	-298,173
	Covarianza	20,963	.313	2558,812	-66,170	23,715	10,165	2432,190	-27,107
TEMP MIN SILV	Correlación de Pearson	-.516	-.082	-.370	1	.657	-.138	-.365	.734
	Sig. (bilateral)	.086	.800	.237		.020	.668	.243	.007
	Suma de cuadrados y productos cruzados	-16,965	-3,303	-727,875	137,563	-19,743	-5,525	-683,687	78,035
TEMP MAX SILV	Covarianza	-1,542	-.300	-66,170	12,506	-1,795	-.502	-62,153	7,094
	Correlación de Pearson	.892	-.239	.607	-.657	1	-.050	.600	-.707
	Sig. (bilateral)	.000	.455	.036	.020		.878	.039	.010
PRECIP SILV	Suma de cuadrados y productos cruzados	6,408	-2,098	260,862	-19,743	6,569	-.435	245,468	-16,418
	Covarianza	.583	-.191	23,715	-1,795	.597	-.040	22,315	-1,493
	Correlación de Pearson	.104	.918	.196	-.138	-.050	1	.192	-.285
H REL SILV	Sig. (bilateral)	.748	.000	.542	.668	.878		.549	.370
	Suma de cuadrados y productos cruzados	.990	10,715	111,820	-5,525	-.435	11,590	104,445	-8,780
	Covarianza	.090	.974	10,165	-.502	-.040	1,054	9,495	-.798
PRECIP SILV	Correlación de Pearson	.480	.002	.999	-.365	.600	.192	1	-.185
	Sig. (bilateral)	.114	.996	.000	.243	.039	.549		.564
	Suma de cuadrados y productos cruzados	214,595	.927	26754,085	-683,687	245,468	104,445	25465,423	-268,205
H REL SILV	Covarianza	19,509	.084	2432,190	-62,153	22,315	9,495	2315,038	-24,382
	Correlación de Pearson	-.712	-.183	-.196	.734	-.707	-.285	-.185	1
	Sig. (bilateral)	.009	.568	.541	.007	.010	.370	.564	
H REL SILV	Suma de cuadrados y productos cruzados	-18,087	-5,695	-298,173	78,035	-16,418	-8,780	-268,205	82,157
	Covarianza	-1,644	-.518	-27,107	7,094	-1,493	-.798	-24,382	7,469
	N	12	12	12	12	12	12		

** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* . La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

- Al hacer un cruce emparejado de variables climáticas entre los sistemas se observa que existe correlación entre:
 - Temperaturas máximas y mínimas en los dos sistemas
 - Temperaturas mínimas y humedad relativa en los dos sistemas
 - Temperaturas máximas y humedad relativa en los dos sistemas
 - Temperaturas mínimas y precipitaciones a favor del sistema silvopastoril

El análisis de correlación de Pearson, permite establecer una relación lineal entre las dos variables para establecer si existe una relación negativa o positiva (siendo perfectas o no), al estimarlos valores de la prueba que se realizó existen correlaciones positivas entre algunas variables sin importar sus unidades; para el caso de las variables temp min tra vs temp min silv hay una correlación positiva que se comportan de manera similar pero sin que los cambios de aumento en una afecten al otra, esto último está dado por los fenómenos de microclimas en los sistemas agroforestales, para la temp min silv vs la precip silv existe una correlación positiva y esta se debe seguramente a que los sistemas silvopastoril mantiene mejor humedad del ambiente y esta se traduce en menor aumento de temperatura por ese se correlaciona con la temperatura mínima y no con la máxima para el silvopastoril.

Las correlaciones de temperatura y humedad relativa se pueden ver influenciadas por el efecto sombra que en este caso, debido a los arreglos y las especies arbóreas encontrados en los predios silvopastoriles observado es importante, puesto que el índice de sombra promedio aunque fue de solamente 0.25 % / ha estimado., como no significativo en el efecto que pudiese tener con relación a la presencia y proliferación de clostridios.

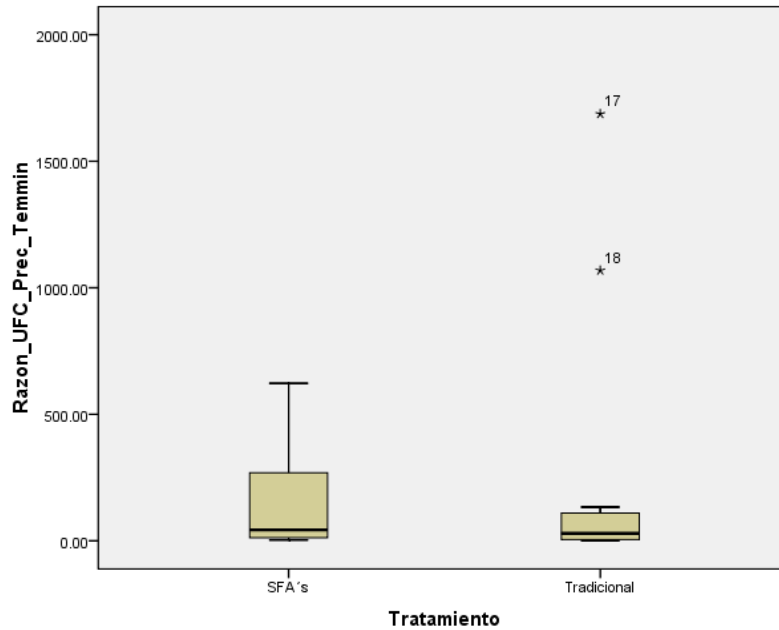
4.3.5 Correlaciones integradas entre UFC/ g y las variables climáticas

Análisis de unidades formadoras de colonia como variable respuesta. Una vez realizadas las observaciones el comportamiento de UFC/g. y de las variables climáticas analizadas, se procedió a establecer una función de razón que permitirá detectar los niveles de asociación o dependencia entre ellas, en el tiempo y en el espacio.

Se parte de un conjunto de observaciones a dos sistemas; Tradicional y Silvopastoril (SAFs) los que se revisan en el tiempo, y se observan variables de bloqueo como lo fueron: temperatura mínima, temperatura máxima, precipitación y humedad relativa, dentro de un conjunto fincas, de tal manera que se encuentra el efecto finca anidado en el efecto sistema, de otra parte en las observaciones en el tiempo se encuentra anidando las condiciones climáticas, que dentro de cada una de los momentos observadas están las condiciones precipitación, temperaturas máximas y mínimas que por las distancias consideradas entre las fincas son muy similares.

Dadas las condiciones de las observaciones se genera una variable consistente en la razón UFC/precipitación/temperatura mínima, en la que se considera el efecto que tiene la temperatura y la precipitación en las unidades de formadores de colonias con lo que se garantiza que el efecto climático se considere en el modelo de análisis propuesto.

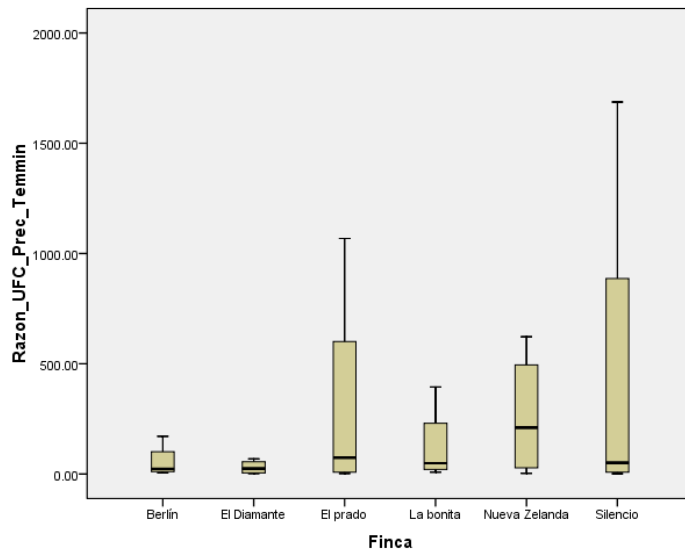
Figura 21. Distribución de la razón UFC/g. _ temperatura _ precipitación



Al igual que el efecto de las fincas puede tener una variabilidad interna que afecta las variables respuestas y como se encuentra cada una de las fincas en un sistema independiente estas variaciones pueden deberse a las configuraciones de dichas fincas, en manejo, forma del arreglo y funcionamiento.

Los valores de la variable respuesta a través de los dos sistemas muestran gráficamente que no existirán diferencias en las medidas de tendencia central, mientras que las dispersiones seguramente sean diferentes, las UFC no dependieron de las variables climáticas y así mismo tuvieron una distribución normal.

Figura 22. Distribución de la razón UFC/g. _ temperatura _ precipitación _ finca



El análisis gráfico dentro de las fincas sugiere que son en general diferentes en su dispersión, y no presentarían diferencias en las medidas de tendencia central. De esta forma es importante la comparación de la dispersión asociada a las fincas pertenecientes a los diferentes sistemas de pastoreo tradicional, puesto que las fincas de Silvopastoril (SAFs) son la Berlín, Nueva Zelanda y la Bonita, con valores muy cercanos entre las medidas de dispersión.

De otro lado se consideran que las observaciones de UFC pertenecientes a los tratamientos Silvopastoril (SAFs) y tradicional corresponden a un efecto aleatorio, por la forma existente en los arreglos de las fincas observados, por tal motivo los efectos aleatorios plantean el análisis de las diferencias de variabilidad a través de los diferentes sistemas de pastoreo tradicional.

Con base en este algoritmo, se realiza el siguiente análisis:

Tabla 19. Contraste de varianzas de la razón UFC/g. _ temperatura _ precipitación _ finca

Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error^a

Variable dependiente: Razon_UFC_Precipitación_tempmin

F	gl1	gl2	Sig.
4.048	5	18	.007

Contrasta la hipótesis nula de que la varianza error de la variable dependiente es igual a lo largo de todos los grupos.

Diseño: Intersección + FINCA + tratamiento + FINCA * tratamiento

Con lo que se rechaza la hipótesis nula; igualdad de la varianza a lo largo de los diferentes sistemas de pastoreo tradicional entre las fincas, con un valor de significancia de 0,007 que es menor que α 0,05, para un 95% de confianza. De lo anterior se infiere que existen diferencias significativas entre los sistemas agroforestales y los tratamientos, para la variabilidad de las unidades formadoras de colonias, considerando los diferentes valores de temperaturas y precipitaciones, para las lecturas observadas.

De esta manera se concluye en el presente caso, que los sistemas agroforestales estudiados de cada finca, debido a su estructura como arreglos en líneas perimetrales, poco homogéneos y no manejados, no brindan los elementos de juicio suficiente para argumentar su acción sobre la proliferación y la variabilidad de las UFC/g., dentro de las muestras observadas.

4.4 OBJETIVO 3: IDENTIFICAR POTENCIALES EVENTOS DE INFECCIÓN CLOSTRIDIAL EN LOS SISTEMAS DE PRODUCCIÓN

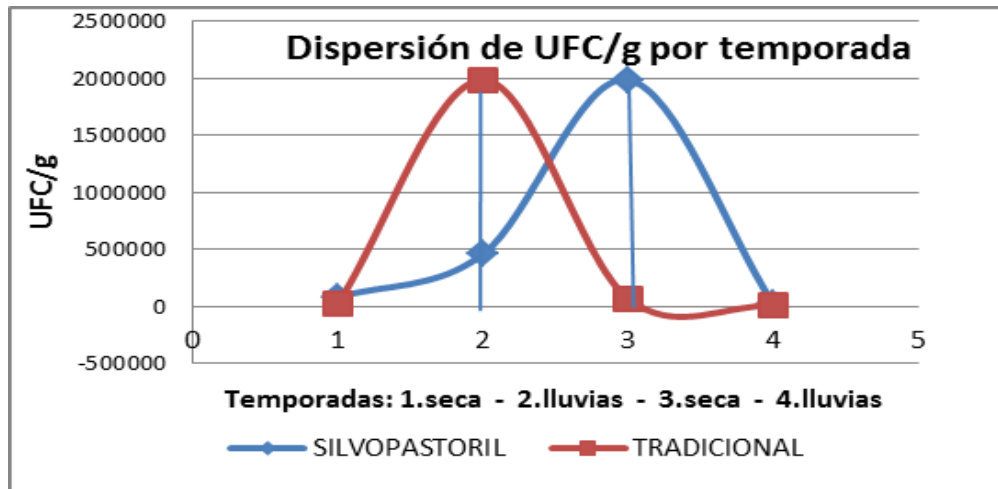
Con la información recolectada, en las fincas muestrales, se elaboró una base de datos, para obtener la información de análisis epidemiológico y establecer relaciones, entre los resultados obtenidos en los muestreos. Al resultado de este ejercicio se hizo el análisis macro para llegar a conclusiones sólidas debido al, de tal manera que se procedió a trabajar tablas por variables y de asociación de las mismas, para concluir, en este objetivo lo siguiente:

Tabla 20. Tabla de frecuencias de *Clostridium ssp*, patógenos, por tipo de *Clostridium* y sistema

Sistema tradicional			Sistema silvopastoril		
<i>Tipo de Clostridium</i>	Frecuencia	Nivel Patógeno	<i>Tipo de Clostridium</i>	Frecuencia	Nivel Patógeno
<i>C. botulinum</i>	3	Alto	<i>C. botulinum</i>	2	Alto
<i>C. septicum</i>	1	Alto	<i>C. septicum</i>	3	Alto
<i>C. beijerinckii</i>	6	Medio	<i>C. beijerinckii</i>	6	Medio
<i>C. bifermentans</i>	1	Medio	<i>C. bifermentans</i>	1	Medio
<i>C. perfringens</i>	1	Alto	<i>C. perfringens</i>	0	Alto

Independientemente del sistema y época de lluvias o sequía, se encontraron UFC/g de *Clostridium* patógenos, cuya presencia en atención a las frecuencias señaladas, es una alerta permanente.

Figura 23 Dispersión de UFC/g.



Observando las dispersiones de las UFC/g detectadas, se evidencia que los picos más altos de crecimiento están en los espacios de lluvias más largas de noviembre en el sistema tradicional, y en la época seca de febrero en el sistema silvopastoril.

Lo anterior orienta la adopción de una medida preventiva de vacunación, en ambos sistema de producción, pero que bien podría estar en un punto que cubra los dos sistemas, dependiendo del tiempo de protección que ofrezca la vacuna, seis meses o un año, respectivamente.

Tabla 21 Tabla de frecuencias de *Clostridium ssp.* por sistema, predio y tipo de *Clostridium*

Sistema de Producción	Predios	Tipo de <i>Clostridium</i> /Frecuencia				
		<i>C. botulinum</i>	<i>C. septicum</i>	<i>C. beijerinckii</i>	<i>C. bifermentans</i>	<i>C. perfringens</i>
Sistema Tradicional	El Diamante	1		3		
	Silencio	2		1		1
	El prado		1	2	1	
Sistema Silvopastoril	Berlín		2	2		
	Nueva Zelanda		1	3		
	La Bonita	2		1	1	
Total acumulado		5	4	12	2	1

Las frecuencias de distribución según los muestreos de UFC/g por tipo de *Clostridium*, señalan que independientemente del sistema, la permanencia del tipo de clostridium es repetitiva en los momentos de muestreo en la mayoría de los casos, lo que sugiere posibles comportamientos de proliferación cíclica del tipo de *Clostridium*.

Tabla 23 Variables de contraste y asociación

Sistema de Producción	Predios	Promedio UFC/g	No. Bovinos muertos	Vacunación* (Carbones)	Entierro de cadáveres	Nivel de Inundación (%) en un omento del estudio
Sistema Tradicional	Diamante	24000	0	Si	Si	20
	Silencio	330000	6	No	No	60
	Prado	300000	0	Si	Si	40
	Totales Sistema	560000	6			
Sistema Silvopastoril	Berlín	47000	0	Si	No	60
	N. Zelanda	380000	21	No	No	80
	Bonita	28000	6	Si	Si	50
	Totales Sistema	450000	29			

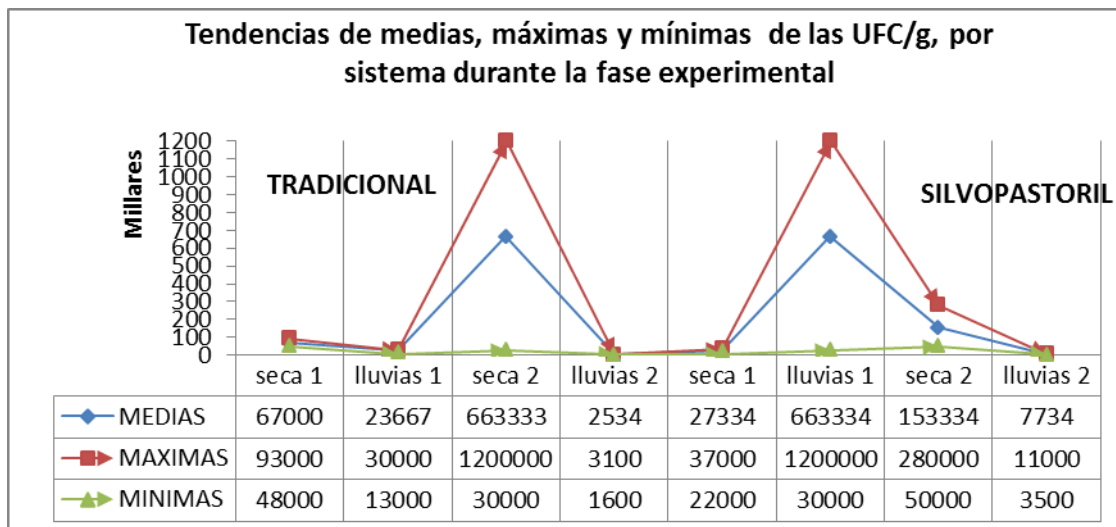
*En las fincas de estudio se utilizaba la vacuna triple HA (contiene células muertas e inactivadas de *Pasteurella multocida* y *C. chauvoei* y toxinas inactivadas de *C. septicum*).

En la anterior tabla se puede analizar que a mayor nivel de inundación es mayor el numero de animales dado por una cepa que seguramente no se vacunaba (*C. septicum*).

De la tabla 22 se puede inferir:

- La presencia de Clostridios es permanente en los dos sistemas e independientemente de épocas de lluvias o sequía, siendo cuantitativamente mayores en el sistema tradicional.
- Los niveles de inundación (% del área de los predios inundada), guardan una proporción directa con la cantidad del tipo de clostridium spp identificado, y el número de muertes; de tal manera que se podría inferir que los niveles de inundación que traen consigo disminución de los niveles de aireación de suelo y mayor disponibilidad de nutrientes disueltos en el agua, facilitan la emergencia y proliferación de los clostridios.
- La mortalidad observada durante la fase experimental, 33 animales en total, coincide con el muestreo de estación seca uno (junio, julio, agosto), momento en el que se registró la mayor cantidad de *Clostridium* spp, y de transición de lluvias a sequía, siendo este momento el mejor punto de referencia para implementar planes vacunales.
- La práctica de inmunización vacunal contra clostridios, si estaría cumpliendo su propósito, esto explicaría el caso del predio Nueva Zelanda, donde se registró el mayor número de muertes (21), y no se realizan prácticas de vacunación preventiva contra clostridios. Al igual que lo observado en el predio el silencio donde también murieron seis animales e igualmente no existen practicas vacunales contra clostridios.
- El observar protocolos inadecuados para la disposición de cadáveres de animales, víctimas del síndrome de muerte súbita, que bien pueden haber sido víctimas de enfermedades clostridiales, muestra cuadros paralelos de muerte de animales, lo que podría confirmar lo reportado en otras investigaciones en el sentido de que practicas indecuadas para la disposición de cadáveres, constituyen focos de proliferación e infestación clostridiales.

Figura 24. Tendencias de medias, máximas y mínimas de las UFC/g, por sistema durante la fase experimental



En la figura 23, se observa que las concentraciones máximas y medias de UFC/g, en uno y otro sistema tienen comportamientos distintos, de lluvias de noviembre a sequia de febrero en el sistema tradicional, mientras que en el silvopastoril es de seca de junio a lluvias de noviembre; estando los picos más altos de UFC/g, para el sistema tradicional en febrero y para el sistema silvopastoril en noviembre.

Lo anterior disposición de medias y máximos de UFC/g, permiten advertir momentos críticos de presencia de clostridios en los suelos que dan a lugar posibles infestaciones en los meses anteriores a febrero en el sistema tradicional y de noviembre para el sistema silvopastoril.

Figura 24. Precipitación, Humedad relativa y Temperaturas máxima y mínima Sistema Silvopastoril.

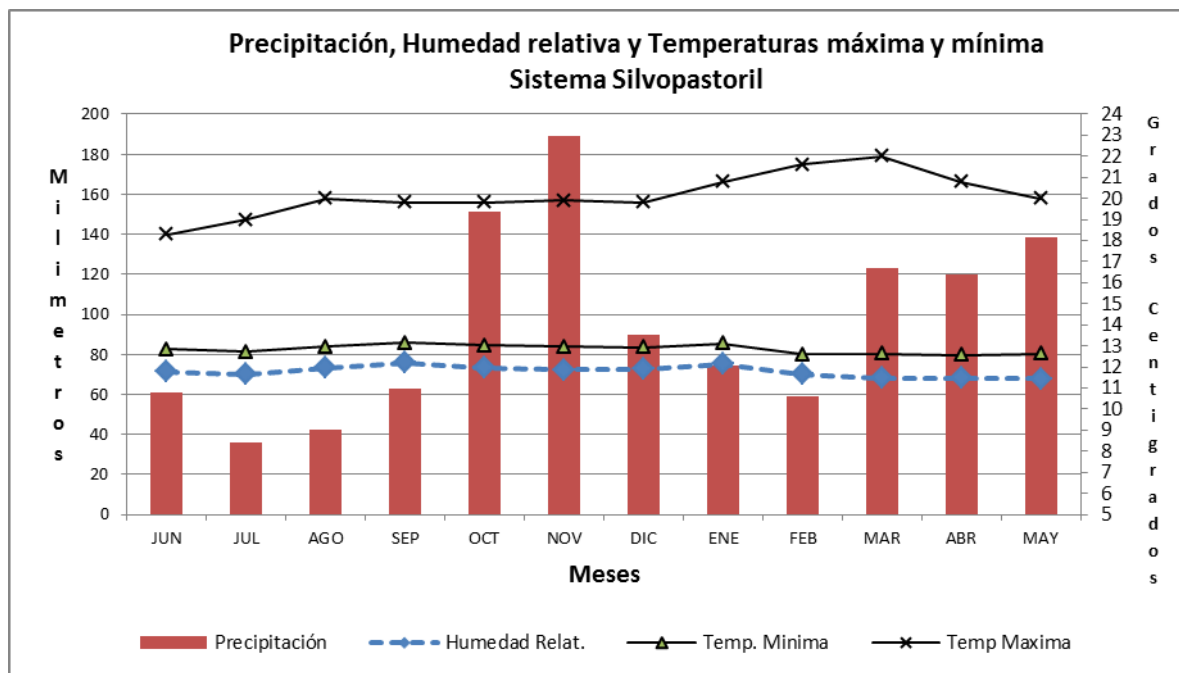
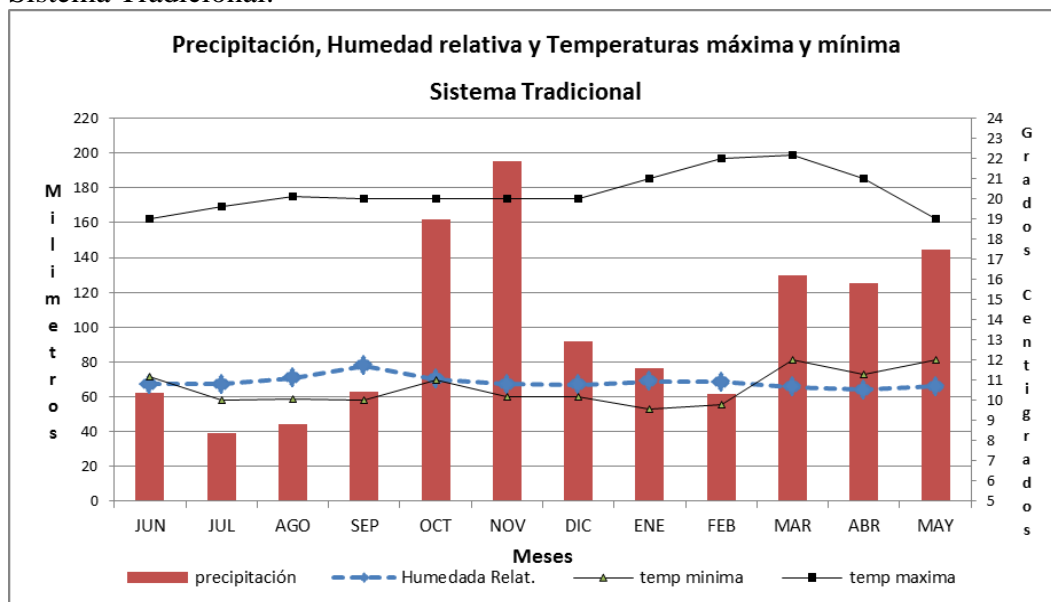


Figura 25. Precipitación, Humedad relativa y Temperaturas máxima y mínima Sistema Tradicional.



Si el comportamiento de crecimiento de las UFC/g es sostenido en los meses de noviembre a febrero en el sistema tradicional, esto coincidiría con las temporadas de lluvias largas y mayores niveles de precipitación; mas no se cumpliría en el sistema silvopastoril cuyo crecimiento de

UFC se da en el lapso de junio septiembre, meses en los cuales los niveles de precipitación son menores. Esto conduce a poner en tela de juicio la apreciación de que los tránsitos de lluvias a sequía son momentos críticos para la proliferación de clostridios presentes.

En otras palabras, estaríamos frente a una situación en la cual, parecería que el sistema silvopastoril, que si modifica las condiciones climáticas observadas, influye en la dinámica clostridial, sin embargo la prueba estadística de razón realizada en búsqueda de significancia de esta asociación no lo confirmó, quedando la incógnita de precisar con mayor número de datos y variables, los indicios aquí planteados. A pesar de esta situación, es prudente confirmar que la presencia de los clostridios es permanente y por lo tanto su control desde lo inmunológico también debe ser constante.

4.5 OBJETIVO 4: PROPONER ESTRATEGIAS DE MANEJO PARA LOS TIPOS DE *Clostridium* SPP, IDENTIFICADOS Y CARACTERIZADOS EN LOS SISTEMAS DE PRODUCCIÓN BOVINA TRADICIONAL Y SILVOPASTORIL.

El desarrollo de trabajo mostro que:

1. Independiente del sistema, predio y época del año, existen en el suelo de los predios estudiados cargas de UFC/g de *clostridium spp.* patógenos que bien pueden desencadenar infecciones y desarrollo de enfermedades en los animales de los hatos ahí presentes.
2. La tendencia a aumentar los niveles de las citadas colonias de *Clostridium spp.*, es más marcado en el tránsito de la primera época seca (junio) hacia la primera época de lluvias (noviembre), momento a partir del cual decrece pasando por la época seca 2 (febrero) y se mantiene con tendencia al ascenso hacia la época de lluvias 2 (abril – mayo), en el sistema tradicional; mientras que en el sistema silvopastoril la tendencia de crecimiento se extiende desde la época seca 1 (junio, pasando por la de lluvias 1 (noviembre) y alcanzar su máximo crecimiento en la época seca 2 (febrero), para decrecer en el tránsito hacia la época de lluvias 2 (abril – mayo).
3. Observando la dinámica de crecimiento de las UFC/g de *Clostridium spp.*, y el comportamiento de las variables climáticas dentro de los sistemas de producción se denota que esa dinámica poblacional de los clostridios, es impredecible desde lo biológico para corroborar lo sensible y complejo, y desde las practicas preventivas en la prudencia y celeridad para precisar los momentos de vacunación.
4. En cuanto a relaciones de crecimiento bacterial y variables climáticas, tal como se señaló en el objetivo anterior, queda mucho aun por precisar, y si bien se ha identificado que el tránsito de lluvias a sequía es el momento de activación clostridial, lo observado en los sistemas silvopastoriles, de la idea de que la dinámica de clostridium podría estar influenciadas por el sistemas as que bien podrían estar ligadas a la estructura y funcionamiento del sistema.

A partir de los resultados obtenidos con este trabajo, en el Municipio de San Miguel de Sema se realizaron dos talleres de capacitación dirigidos a ganaderos de la región, miembros del comité de ganaderos de Chiquinquirá y asistentes técnicos (75 asistentes en total), sobre manejo y recomendaciones frente a la presencia de clostridios como potenciales agentes para el desarrollo enfermedades clostridiales. Estos talleres se basaron en la comunicación de resultados y la socialización de las siguientes estrategias de control y prevención:

- Es prudente que después de la épocas de lluvias largas y en los casos de inundación, antes de pastorear las praderas se realicen prácticas de aireación y descompactación de los suelos, lo que permita de alguna manera romper las condiciones de anaerobiosis y que el efecto de temperatura solar actúe como bactericida.
- Se debe seguir un protocolo de manejo de cadáveres, sirviendo de una área en contar con un área cementerio, en la cual los animales se entierren a mínimo 2 metros de profundidad, y aplicando cal viva o alguna tipo de desinfectante (Hipoclorito 99% + ácido acético disponible y clausurando dicha área como zona de pastoreo.
- Establecer un estricto plan de vacunación, incorporando la inmunización contra clostridios, preferencialmente elaboradas con bacterinas especies patógenas presentes en la región.

CAPITULO V. METANALISIS Y DISCUSIÓN

5.1 INFLUENCIA DE LOS SISTEMAS EN LA PRESENCIA DE ESPECIES DE *Clostridium spp.*

Méndez, et al (2000), sostiene que los sistemas agroforestales (árboles en línea en los sistemas silvopastoriles) tiene influencia en: la reducción del stress calórico y una disminución en la temperatura en el potrero abierto que está bajo la influencia de la proyección de la sombra de la copa de los árboles, donde se presenta una reducción de temperatura entre 1 a 2° C, para sistemas silvopastoriles con arreglos basados en arboles de cobertura de copa densa, árboles dispersos y árboles en cerca viva o en línea; en el caso del presente trabajo se encontró que no existe una significancia estadística al respecto, pero aun así, hubo una disminución de la temperatura máximas en el sistema silvopastoril con árboles en cerca viva y utilizando la especie arbórea (*Salix Alba*), la cual presento un promedio de porosidad del 30%. Esta influencia de los árboles para mantener las condiciones de temperatura máximas y mínimas más homogéneas y que a la vez actúan como barreras para que las temperatura del suelo igualmente se mantengan más frescas, es una incógnita que queda por resolver en favor o en contra de los umbrales térmicos que requieren los clostridios para su activación metabólica.

Un aspecto asociado a la especie encontrada en los sistemas silvopastoriles (Sauce salix), es que desarrolla y crece de manera óptima en suelos ricos en nutrientes y con altas concentraciones de CO₂, lo cual suele estar relacionado con los ecosistemas con buenas fuentes de agua (Silvola y Ahlholm,, 1993). Estas condiciones del suelo no solo son óptimas para el crecimiento de este tipo de árboles; sino que también pueden estar propiciando condiciones favorables para el crecimiento de bacterias anaerobias como *Clostridium spp.*, pero al mismo tiempo modifican las condiciones de temperatura del suelo, tornándolas más bajas.

El disturbio registrado en cuanto a la ola invernal 2010-2011, donde se desbordo la laguna cercana permitió observar que la presencia de las aguas estancadas favorecen la floración hacia la superficie del suelo de clostridios, lo que coincide con lo reportado por Munangandu, *et al* 1996, quienes relatan que las inundaciones del rio Zambeze en el África durante las lluvias contribuyen a la propagación de esporas de clostridios por el agua del río.

Estudios de Yeager *et al*, 2005, concluyen que el suelo de los bosques que han sido afectados por fenómenos climáticos como las inundaciones o fueron objeto de incendios, tienden a disminuir la biomasa del suelo y la proporción de bacterias que fijan nitrógeno y oxidan el amonio, constituyéndose en ambientes favorables para la proliferación de *Clostridium spp* y *Paenibacillus sp*. En nuestro caso, al margen de la presencia de las inundaciones, se evidenciaron e identificaron poblaciones de *Clostridium spp*, en los sistemas observados, siendo más abundantes en aquellas predios cuyos niveles de inundación fueron más severos que en otras donde la inundación fue relativamente menor.

Se reporta que la presencia de *Clostridium perfringens* está asociada con sedimentos de suelos marinos o suelos con alto contenido de humedad, en cambio se encuentra en una baja

concentración en sedimentos de agua fresca o suelos en condiciones normales (Matches, Liston y Curran, 1974). Gamboa, et al en 2011, reportan la presencia de *C. perfringens* tipo A en los suelos, que son los causantes de cuadros gastrointestinales en los bovinos y que bien pueden inducir a la muerte de los animales; en este estudio solo se logró aislar de una muestra *C. perfringens*, en el sistema tradicional finca el silencio y donde se registraron seis casos de muerte de animales, donde se reportó en dos casos síntomas gastrointestinales previos que bien podrían estar asociadas a la presencia de este tipo de *clostridium spp.*

En cuanto la presencia de *Clostridium septicum* y *Clostridium botulinum* en el suelo, se tienen reportes de distintos autores, en lo que respecta a la asociación de estas bacterias con enfermedades en los bovinos (García y McKay, 1970; Miwa, 1975; RIVA, 1975; Hang'ombe *et al.*, 2000), pero ninguno de ellos establece una relación de sus hallazgos con sistemas agrosilvopastoriles, siendo hasta donde fue posible indagar, el presente estudio el que aborda la identificación de estos clostridios en este tipo de sistemas de producción.

En escenarios estrictamente forestales no intervenidos, y de las que se podría pensar están aisladas de prácticas contaminantes, Miwa, 1975, realizó aislamientos con altas cargas (10^4 a 10^6) de *Clostridium spp.*, reporte que amplía la concepción de estas bacterias a diferentes niveles de microambientes, presencia e interrelaciones cada vez más complejas de la dinámica en diferentes suelos y sistemas de estas bacterias.

5.2 CONCENTRACIÓN DE *Clostridium spp.* EN SUELO

Con los promedios de UFC/g. obtenidos por sistema y por época, al igual que integrados independientemente del sistema por épocas, se buscó establecer comparaciones de concentración con reportes de otras investigaciones, encontrando lo siguiente:

Tabla 35. Medias de concentración de UFC/g por época y sistema

	Sistema Tradicional	Sistema Silvopastoril	Smith <i>et al</i>
EPOCA SECA	180000	730000	270
EPOCAS LLUVIAS	74000	26000	3300000

En comparación con la concentración de UFC/g. reportada por Smith *et al.*, en 1968, la cual variaba de 270 en época seca a 3,300000 en época de lluvias, se puede contrastar que las concentraciones de bacterias encontradas en este trabajo, difieren de las reportadas para las épocas secas siendo mayores en los dos sistemas (todas las muestras en ambas épocas secas) y a favor del sistema silvopastoril, las concentraciones reportadas por Smith *et al.*, para las épocas de lluvias son mayores en comparación con este caso aunque son entre si más altas en el sistema tradicional. Sin embargo al comparar en los dos sistemas de producción con base en el estadístico mediana y a pesar de no encontrar diferencias significativas entre ellos, se puede identificar que en este caso las concentraciones de *Clostridium spp.*, son inferiores en el sistema silvopastoril en

la época de lluvias y mayores en las épocas secas . Igualmente se evidenció en este caso que estas concentraciones de UFC/g de *clostridium spp* encontradas, son independientes de las condiciones edafoclimáticas que se generen al interior de los sistemas, aunque sería conveniente ampliar la muestra y el análisis de variables como temperatura y composición química y biológica de los suelos y ciclos del agua, para precisar los efectos del sistema en la dinámica de bacterias.

Otro escenario presentan Ulacio *et al*, en 1998; quienes reportan que en ausencia de oxígeno en el sistema de suelo inundado, los organismos anaerobios estrictos y facultativos, se vuelven biológicamente activos, siendo la descomposición de la materia orgánica más lenta y menos fragmentada la que facilita dichos procesos; y comparan sus observaciones con las de De Datta, quien afirma que la causa principal para que exista una baja población microbiana en suelos inundados, se debe a que el metabolismo anaeróbico es por naturaleza menos eficiente que el aeróbico, para proveer energía que facilite la síntesis de nuevas células. Estas observaciones pueden explicar porque las concentraciones de *Clostridium spp*. en el suelo que estuvo inundado para este caso, no aumentaron significativamente en suelos de fincas inundadas en mayor proporción que otras menos afectadas en época de sequía después de las lluvias.

5.3 CORRELACIÓN DE VARIABLES CLIMÁTICAS CON LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS PERTENECIENTES AL GÉNERO *CLOSTRIDIUM SPP*.

En condiciones de laboratorio se ha evaluado la sobrevivencia de bacterias anaerobias del género *Clostridium spp*. para condiciones de temperatura; encontrando que estas bacterias sobreviven con rangos de temperatura que van desde 4 °C hasta 35 °C (Hoffmann y Justensen, 1980) y en campo se ha encontrado que los rangos están entre 10 °C a 40 °C .

La temperatura juega un rol importante en la esporulación de los *Clostridium spp*, la literatura indica que la temperatura óptima para el crecimiento para *Clostridium botulinum* es de 37 °C inclusive a 32.5 °C presenta un buen crecimiento observado a través de la formación de unidades de turbidez nefelométricas (10000 aprox); y para el caso de 14 °C temperatura muy cercana a la encontrada en este estudio es de 120 unidades turbidez nefelométricas (Grecz y Arvay, 1982).

En el presente estudio la temperatura promedio durante la fase experimental fue de 15.4°C para el sistema tradicional y 15,06° C, para el sistema silvopastoril aunque estos valores no son los óptimos para la proliferación bacteriana se encuentran entre el rango de crecimiento para estas bacterias reportados.

Existen factores asociados con la multiplicación explosiva de *Clostridium botulinum* y los brotes consiguientes de la enfermedad (botulismo), esos factores incluyen largos períodos de tiempo caluroso, áreas agrandadas de aguas estancadas poco profundas, la alcalinidad, la abundancia de invertebrados acuáticos, así como el agotamiento del oxígeno asociado con grandes cantidades de vegetación en descomposición, de estas condiciones se observaron el estancamiento de aguas y vegetación en descomposición en varios predios durante este estudio y que permiten plantear una hipótesis del aislamiento de *Clostridium botulinum* en tres sistemas agrosilvopastoriles y en tres sistemas tradicionales; es importante agregar que la multiplicación puede ocurrir en lodo o

vegetación en descomposición, o en su defecto en los microambientes creados a partir de la descomposición de partículas de materia fecal animal, esta última se vio en la encuesta donde la mayoría de las fincas de estudio no hacían manejo de excretas (Smith y Moryson, 1977)

Para el caso de *Clostridium perfringens* los umbrales de temperatura máxima están entre 43 °C y 46 °C, pues a los 46 °C se ha encontrado que se reduce de manera drástica su producción de esporas, cuyo óptimo térmico para esporular está en 37°C. (García, Rodríguez, y Labbe., 1992).

Ortiz, 2000, reporta que temperaturas bajas extrema como las que se suceden en el municipio de San Miguel de Sema, hacen que los *Clostridium spp*, se encuentran en forma vegetativa y no esporulen activamente.

Un efecto indirecto atribuido a la precipitación, sobre la presencia de los *Clostridium spp*, es que contribuye al aumento de las concentraciones de agua superficial en el suelo, de tal manera que se aumentan las condiciones anaerobias por disminución de O² libre en el suelo, pero al mismo tiempo se dan condiciones físicas para que los clostridios floten hacia la superficie. Desmarais, *et al*, 2002 reportan haber encontrado que se eleva el número de *E.coli* y *Clostridium perfringens* en sedimentos superficiales a lo largo de las orillas de los ríos, cerca al borde del agua, lo mismo que encontraron aumentos en colonias de *Clostridium perfringens* en muestras de subsuelos, en épocas secas posteriores a un periodo de lluvias intenso.

La mediana para precipitación fue menor en el sistema silvopastoril 82,05 milímetros, contra 84.5 milímetros en el sistema tradicional, fenómeno atribuido a la caída de gotas de agua sobre las copas y el follaje de los árboles, que disminuye directamente la caída suelo (2 milímetros en promedio), lo cual se traduce en menores niveles de encharcamiento en el suelo., esto se puede denotar en una menor concentración media de clostridios en el sistema silvopastoril durante las épocas de lluvias.

Bagge , *et al* en 2009, reportan que la intensidad del factor precipitación, conlleva a que bacterias como *C. chauvoei* que se encuentra en el suelo, puedan presentar una variación en su comportamiento en países estacionales, es así como lluvias fuertes pueden contribuir a la propagación de las esporas, el aumento y diseminación de las mismas, con la consecuente mayor disponibilidad de cargas bacterianas adheridas a los pastos y acceso a las mismas por parte del ganado.

5.4 EXPONER CON BASE EN LOS RESULTADOS ENCONTRADOS, LOS RIESGOS DE INFECCIONES CLOSTRIDIALES EN LOS SISTEMAS DE PRODUCCION TRADICIONAL Y SILVOPASTORIL.

Borroco (1998) y Ortiz (2008-2011), reportan que la topografía de los terrenos es un factor que interviene en la localización y concentración de clostridios, es así como en predios con suelos ondulados, se encontró mayores concentraciones en las partes bajas que en las partes altas, debido a que en las partes altas no se almacena agua fácilmente y la escorrentía de alguna manera ejerce una acción de lavado y arrastre de bacterias hacia las partes más bajas. Igualmente reportan

que la condición topográfica de suelos ondulados, actúa como barrera física para la localización de estas y otras bacterias, ya que en las partes altas la temperatura del aire disminuye, con la consecuente disminución de la temperatura en las aguas, elementos estos vitales en la actividad fisiológica de los clostridios; adicionalmente en las zonas bajas existe un mayor contenido de materia orgánica debido a que la inclinación de los suelos hace que el agua arrastre los nutrientes y la materia orgánica hasta decantarse en suelos más bajos, aumentando las concentraciones de materia orgánica en esas zonas, factor igualmente decisivo en la actividad metabólica de las bacterias

Es un factor importante de prevención diagnosticar las causas de muerte súbita de animales y en el caso de animales que mueren por enfermedades clostridiales, se requiere seguir un manejo especial de cadáveres, para que no se conviertan en un factor de riesgo; la mejor manera de disponer estos cadáveres es enterrar los animales a 2 metros de profundidad, preferiblemente sin haberlos abierto, recubriéndolos con cal viva y en un potrero lejano a los que usualmente pastorean otros animales, alejados de fuentes de agua y estén destinados exclusivamente para este fin. (FAO, 2010).

Ya que antes y después de las inundaciones la carga animal aumento en todas la fincas de estudio es necesario profundizar si existe una relación con la alta carga animal y los brotes de enfermedades clostridiales. La relación del número poblacional bovina en un predio y la presencia de *Clostridium spp*, no ha sido muy bien estudiada y es polémica entre los investigadores, sin embargo se sabe que la materia fecal de animales contiene bacterias del genero *Clostridium spp*. que son parte de la flora intestinal normal del bovino, pero que en el medio ambiente se vuelve una fuente de contaminación, ejemplo de esto es un estudio de Li , Sayeed y McClane (2007), quienes demuestran que las esporas de *C. perfringens*, así como sus células vegetativas están presentes en los suelos, esto podría indicar que las células vegetativas en los suelos reflejan la contaminación de los mismos en tiempos muy recientes y que las bacterias eventualmente esporuladas que seguramente proceden de ambientes de crecimiento deficientes, aprovechan las masas de estiércol como sustrato favorable para su desarrollo y activación. Teniendo en cuenta esta premisa entre más animales se concentran en una pradera, mayor va a ser la producción de materia fecal, con cargas de *Clostridium spp*, que esporularan y se multiplicarán en el suelo, y que una vez que encuentren las condiciones ideales de multiplicación pueden desarrollar brotes de enfermedades clostridiales.

Dentro de los sistemas productivos de ganaderías pequeñas y medianas, se suele contar con otras actividades secundarias como es la cría de aves en este caso dos fincas presentaban una pequeña explotación avícola , estas aves también son afectadas por las bacterias del genero *Clostridium spp*, especialmente por *Clostridium perfringens* tipo A, que les produce enteritis necrótica, la cual se transmite por vías horizontal y vertical. En cuanto a la vía horizontal la transmite el alimento o las camas de otras aves que anteriormente estuvieron contagiadas (Thanissery *et al*; 2010). Estos hallazgos son alertas para el manejo de aves y prácticas de fertilización con gallinazas; algunos autores afirman que las aves no necesariamente tienen que estar enfermas para poder contaminar el medio ambiente, puesto las aves sanas también tienen una carga de *Clostridium perfringens* de cerca 1×10^4 de bacterias por gramo de materia fecal. (Cesare *et al*, 2009). Esto indica en sí que las aves de corral sanas son una posible fuente de contaminación para los bovinos y así mismo también para la aves de *Clostridium perfringens*.

Teniendo en cuenta lo anterior McCrea y Macklin en el 2006, hicieron una comparación de diferentes rutinas de aseo de los corrales para tratar de controlar la prevalencia de *Clostridium perfringens*, ellos indican que el mejor protocolo para limpiar los corrales conlleva al lavado con agua a presión o lavado de una solución de 5 % de hipoclorito a presión más un tiempo de secado de 48 horas para disminuir la carga de bacterias del genero *Clostridium spp*.

Las deficiencias minerales en Colombia, son unos de los factores que afecta la producción de la ganadería en sabanas tropicales. La poca concentración de fosforo, cobre y cobalto en los suelos es muy común en varias zonas del país. (Benavides, 2004). Cuando existen deficiencias nutricionales principalmente de minerales necesarios para los bovinos empiezan a aparecer conductas como la alotrofagia, que consiste que los animales tratan de suplementar su dieta comiendo objetos extraños, esta se puede corregir a partir de un una buena suplementación con sal mineralizada con un 10% de fosforo y 18% de Calcio, es importante reconocer el hecho de que para cada región se debe formular una sal mineralizada cubriendo los requerimientos hasta donde sea posible de finca (Uribe, 1996).

Finalmente un tema de bastante discusión y que se de abordar en profundidad son los esquemas vacúnales frente a las especies de *Clostridium spp*, desde varios años atrás se tiene enterados a los productores de la importancia de la vacunación contra los llamados “carbones” pero esto no es suficiente cuando no se conoce la presencia y la prevalencia del tipo y especie de bacterias que pueden ser causales de las enfermedades en cada zona y lugar específicos. Ejemplo de esto es que en algunas zonas del sureste de Suecia, la pierna negra es considerada como una enfermedad endémica; el método de determinación de la prevalencia de las esporas de *C. chauvoei* en el pasto sirve en ese país como un indicador de riesgo hacia el carbunco sintomático, lo que permite a los ganaderos diseñar programas de vacunación específicos (Bagge, *et al*, 2009). En las fincas de estudio se observó que no existe un plan de vacunación uniforme así mismo la prevención por medio de la vacunación ha tenido en otras zonas del país una reducción de las tasas de mortalidad (Ortiz, 2000). Durante este estudio solo una finca (La bonita) presento muertes aun habiendo vacunado, en esta finca se aisló *C. botulinum* para el cual no se había vacunado.

Así como sucede en Suecia, en Colombia y con las líneas base aportadas por este y otros trabajos sobre el tema que han sido referenciados a lo largo de este documento, a partir de los aislamientos obtenidos de cepas nativas de *Clostridium spp*, seria recomendable aplicar bacterinas y toxoides, empleando material biológico específico.

CAPITULO VI. CONCLUSIONES

Se identificaron diferentes especies de bacterias del genero *Clostridium* spp., encontradas en muestras de suelo de sistemas de producción bovina tradicional y silvopastoril en predios del municipio de San Miguel de Sema, (Departamento de Boyacá) los cuales no presenta diferencias entre sí.

El efecto de sombra proyectada en los árboles de *Salix alba*, no tiene influencia, por tanto no afecta la fenología de los pastos así como el microclima de los suelos y el hábitat natural de *Clostridium* spp.

En la caracterizaron microbiológica de *Clostridium* en los dos sistemas de producción, se encontraron cepas patógenas representadas por *Clostridium septicum*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* y medianamente patógenas como *Clostridium bifermentans*.

En ambos sistemas existe tendencias similares a encontrar un aumento en el número de UFC (unidades formadores de colonias) de *Clostridium* spp, en la transición de las épocas de invierno a verano.

No hay relación alguna entre los factores edafo-climáticos y los aislamientos de bacterias del genero *Clostridium* hallados en ambos sistemas de producción. Determinando que no existen factores de protección asociados a la presencia de clostridios.

Para el manejo y control de la Clostridiosis se propone seguir estrategias preventivas en las que se incluye, el establecimiento de un esquema de vacunación específico para la zona, adicionalmente, capacitación de personal técnico acerca del manejo de las enfermedades clostridiales y finalmente, la aplicación de protocolos de manejo de cadáveres bovinos

El aumento de la concentración de clostridios en el suelo no se puede asociar directamente al sistema de producción siendo que en las épocas seca el sistema silvopastoril tuvo una mayor concentración media pero no lo fue así en la época de lluvias, sería apropiado seguir evaluando el efecto sistema en la concentración de clostridos bajo diferentes tipos de arreglos silvopastoriles y diferentes tipos de árboles puesto el presente estudio, permiten modelar nuevos proyectos de investigación tendientes a conocer el complejo comportamiento de las bacterias del genero *Clostridium* spp bajo diferentes condiciones productivas.

6.1 RECOMENDACIONES

Se debe dar continuidad a la investigación que aporte nuevos conocimientos sobre las relaciones entre bovinos, árboles, *Clostridium*, suelos y microambientes en sistemas de producción bovina, en estos y otros agroecosistemas del país, recogiendo información cíclica y replicas, que permitan armonizar e inferir con mayores niveles de precisión los datos y las observaciones aquí entregadas.

Para posteriores estudios se recomienda, recomendamos seguir evaluando el efecto de los sistemas silvopastoriles para otro tipo de patologías ligadas a factores ambientales, al igual que verificar la caracterización de las cepas aisladas con métodos de biología molecular, con miras a producir inmunizantes específicos.

Se recomienda que al finalizar la época de lluvia y en casos de inundación se realice prácticas de aireación, des compactación de los suelos, y actividades que rompan las condiciones de anaerobiosis antes de pastoreo de las praderas.

A su vez se recomienda el uso de protocolos específicos de manejo de cadáveres, vacunar para clostridiosis en las épocas que anteceden a la temporada de lluvias, particularmente dirigido al control de especies de *Clostridium* patógenas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Assis S., Cola J., Megumi M., Couto L & Melido R. (2003). Activiade microbiana do solo em sistemas agrofloretais, monoculturas, mata natural e área desmatada. Sociedade de investigações florestais SIF, 27, 1 -3
- Assis, R., Filho, E., Lobato, F., Carvalho, A., Ferreira, P & Carvalho, A.(2005). Surto de Carbúnculo Sintomático em Bezerros. Santa Maria. Ciência Rural, 35, n.4, 945-947.
- Assis, R., Lobato, F., Dias, L., Uzal, F., Martins, N & Silva, N. (2001). Producción y Evaluación de Conjugados Fluorescentes para Diagnóstico de Mancha y Gangrena Gaseosa. Revista de medicina Veterinária, 82, n.2, 68-70.
- Bautista, L. (1998). Diseños de muestreo estadístico. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Bagge E., Lewerin, S y Johansson, K. (2009). Detection and identification by PCR of *Clostridium chauvoei* in clinical isolates, bovine faeces and substrates from biogas plant, Acta Veterinaria Scandinavica, Vol 51, 1-9.
- Benetti M. (2008). Carbúnculo sintomático em bovinos. Tesis de grado. Facultad de Medicina Veterinaria Universidade castelo Branco.
- Bennets, H., Beck, A. & Harley R. (1948). The pathogenesis of “falling disease”. Australian Veterinary . J. 24:237-244.
- Benavides E. (2004). Causas de muerte súbita en bovinos en pastoreo en las sabanas de América tropical. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 17:2. 182 - 192.
- Blood, D.C.; Radostits, O.M. & Henderson, J.A. (1986). Medicina Veterinaria. Traducción de la Sexta Edición Inglesa . México: Nueva Editorial Interamericana.
- Brown, C., Baker, D & Barker I. (2007). The alimentary system. En M, Maxie,. Jubb, Kennedy and Palmer’s Pathology of domestic animals (pp 771). Ohio: Elsevier,
- Cavalheiro, A & Trindade, D. (1992). Os minerais para bovinos e ovinos criados em pastejo. Porto Alegre: Ed. Sagra-DC Luzzatto,
- Carvalho, G., Nunes, L., Bragança, H. y Porfirio L. (2008). Principais plantas tóxicas causadoras de morte súbita em bovinos no estado do Espírito Santo – Brasil. Archivos de zootecnia, 58 , 87 – 98.
- Cesare ,A., Borilova ,G., Svobodova , I., Bondioli ,V y Manfreda, G. (2009) *Clostridium perfringens* occurrence and ribotypes in healthy broilers reared in diferente european countries. Poultry Science, 88 ,1850–1857
- Giraldo, L. (2000). Sistemas silvopastoriles para la ganadería en Colombia. Medellín, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- DeGroot, B. (1994) Sudden death syndrome of feeder cattle: a proposal for a new approach. Proc. Am. Assoc. Bovine Pract, 26:140.
- Desmarais, T., Solo, H y Palmer, C. (2002). Influence of soil on fecal indicator organisms in a tidally influenced subtropil enviroment. Journal of ecophysiology, 68 , 1165- 1172
- Dean, A.; Dean, J.; Burton, A. & Dicker, R. (1992). Epi Info, versión 5. Epidemiología con

- microordenadores. Division of Surveillance and Epidemiology. Epidemiology Program Office. Center for Disease Control. Atlanta, Georgia 30333. U.S.A. Traducido por: Fernández M., J.C. departamento de Evaluación de la Salud, Sevilla (España). 243 p.
- Dierks, R. (1981) Bovine Rabies. En: Miodrag R & McIntyre I. Eds. Diseases of Cattle in the Tropics. Current topics in Veterinary Medicine and Animal Science. (pp 107-121). London, England: Martinus Nijhoff Publishers
 - Dutra, I., Weiss, H., Weiss, H. y Dobereiner, J. (1993). Diagnóstico do botulismo em bovinos no Brasil pela técnica de microfixação de complemento. Pesquisa Veterinária Brasileira, 13, 83-86.
 - Escobar R., M. C. (1993). Microbiología del suelo. Medellín: Universidad de Antioquia.
 - FAO (2010) Manual de campo para el reconocimiento y atención de enfermedades del rebaño. Dirección de sanidad animal. Lima – Perú.
 - Farrell, M & Altieri (1999). Agroecología, Bases científicas para una agricultura sustentable. Montevideo : Editorial Nordan–Comunidad
 - Fedegan, Subgerencia de Salud y Bienestar Animal (2010). Censo nacional de predios y bovinos 2009
 - Fernandes, N & Macruz, R.. (1964). Toxicidade da "corona", *Mascagnia pubiflora* (Juss.) Griseb. (Malpighiaceae). Arq. Inst. Biol. Anim, 31, 1-4.
 - Fonseca J., Ortiz, D. & Martínez, R. (2010). Aislamiento e identificación bioquímica de *Clostridium* spp patógenos presentes en muestras de suelos de predios ganaderos afectados por la ola invernal del 2010 en el municipio de Mosquera, Cundinamarca (Colombia). Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 24, 406.
 - Flórez, T., González, E., Hernández, Z., A., Herrera, V., Londoño, F., López, H., Mazuera, M., Mejía, V., Ramírez, C., Rojas, L., Torre, Y. & Vasco U. (1994). Curso Modular de Epidemiología Básica. Facultad Nacional de salud Pública , Universidad de Antioquia..
 - Gamboa, M., Mau, S y Rodriguez, E. (2011). Caracterización molecular y resistencia antimicrobiana de aislamientos de *Clostridium* perfringens de diferentes orígenes de Costa Rica, Revista Biología tropical, 59, 1479- 1485
 - Garibello, J. (2003). Restauración de Ecosistemas a partir del manejo de la vegetación, Guía metodológica, Colombia :Ministerio de Medio Ambiente.
 - Gasque R. (2008). Enciclopedia bovina. Mexico D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México.
 - Gava, R., Cristani, J., Branco, D., Neve, A., Mondadori & Souza, R (1997). Mortes súbitas em bovinos causadas pela ingestão de *Mascagnia* sp (Malpighiaceae) no estado de Santa Catarina. Pesqui. Vet. Bras., 18, 16-20.
 - García , J ., Rodriguez, M., & Labbe , R. (1992). Influence of Elevated Temperature on Starch Hydrolysis by Enterotoxin-Positive and Enterotoxin-Negative Strains of *Clostridium* perfringens Type A. Applied and environmental microbiology, 58, 326-330
 - García, M & McKay, K. (1970). Pathogenic microorganisms in soil: old problem in a new perspective. Journal comp. Medicine, 34, 105 - 110
 - Grecz, N & Arvay, L (1982). Effect of Temperature on Spore Germination and Vegetative Cell Growth of *Clostridium botulinum*. Applied and environmental microbiology, 43, 331-347

- Globe (2005). Protocolo de humedad relativa. Consultado el 20 de abril de 2013 http://www.globeargentina.com.ar/guia_del_maestro_web/atmosfera/investigacion_de_la_atmosfera_por_contenido/protocolodehumedadrelativa.pdf
- Glock R.D & DeGroot B.D. (2008). Sudden death of feedlot cattle. *Journal of animal science*, 76, 315 – 319.
- Gomes, J. (2011). Género *Clostridium spp.* Microbiología Clínica Veterinaria VET 3225, Área de bacteriología 2011-2. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS. Consultado el 24 de noviembre de 2011: <http://www6.ufrgs.br/labacvet/files/Clostridium201102.pdf>
- Grecz, N & Arvay, L (1982). Effect of Temperature on Spore Germination and Vegetative Cell Growth of *Clostridium botulinum*. *Applied and environmental microbiology*, 43, 331-347
- Gutiérrez, B & Fierro, L (2006). Diagnóstico y diseño participativo en sistemas agroforestales. Manual y Guías de Campo, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA. Mosquera, Colombia: Produmedios.
- Hang'ombe, B., Isogai, E., Lungu, J., Mubita, C., Nambota, A., Kirisawa, R., Kimura, K & Isogai, H. (2000). Detection and characterization of *Clostridium* species in soil of Zambia. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 23, 277- 284
- Haraguchi, M (2003). Plantas tóxicas de interesse na pecuária. Centro de pesquisa e desenvolvimento de sanidade animal. Consultado el 22 de octubre: http://www.biologico.sp.gov.br/docs/bio/v65_1_2/haraguchi.pdf
- Hatheway, C (1990). Toxigenic Clostridia. *Clinical Microbiology Reviews* 3, 66 - 98.
- Hatheway, C (1988). Botulism. En: Balows, A.; Hausler Jr., W.J.; Ohashi, M. & Turano, A. *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases* (pp. 111-133)., New York :Springer-Verlag.
- Henderson, H & Geasler, M. (1986). Effect of environment and housing on the performance of feedlot cattle under midwest conditions. *Am.Soc. Am.Sci*, 33(489).
- Hindson, J & Agnes, C (2000). *Manual of Sheep Diseases*. Scotland: Winter Blackwell Science
- Hoffmann, S & Justesen, T. (1980). Effect of temperature, humidity and exposure to oxygen on the survival of anaerobic bacteria. *Journal med microbial*, 13 ,609-612
- ICRAF (1997). Redefining Agroforestry – an opening Pandora's box?. *Agroforestry today*. Vol 9 (1- 5).
- Jiménez F., Collinet J & Mazariego M (1998). Recuperación de suelos degradados con *Gliricidia sepium* o gallinaza en la microcuenca del río Las Cañas, El Salvador. *Agroforestería de las américas*, 5,10-16.
- Jubb, K. (1985). The Nervous System. En: Jubb, K, Kennedy, P & Palmer N. Eds. *Pathology of Domestic Animals*. (pp 292-296). Academic Press.
- Kriek, N., Odendaal, M & Hunter, P (1994). *Clostridium perfringens* type D enterotoxaemia. En: Coetzer, J., Thomson, G & Tustin, R.(Eds.). *Infectious diseases of livestock with special reference to Southern Africa* (p.1315-1322.). Oxford: Oxford University. p.1315-1322.
- Kleinbaum, D., Kupper, L & Morgenstern, H. (1982). *Epidemiologic research- Principles and quantitative methods*. Belmont, CA: Lifetime Learning Publications.

- Krishnamurthy L. & Ávila (1999). Agroforestería básica. Serie de textos básicos para la Formación Ambiental. México: PNUMA. Oficina regional para América Latina y el Caribe.
- Li, J., Sayeed, S & McClane, B. (2007). Prevalence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* isolates in Pittsburgh (Pennsylvania) area soils and home kitchens. *Applied and environmental microbiology*, 73 , 7218- 7224
- Lobato, F., Moro, E & Umehara, O. (2000). Avaliação da resposta de antitoxinas beta e épsilon de *Clostridium perfringens* induzidas em bovinos e coelhos por seis vacinas comerciais no Brasil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 52, 313- 318.
- Londoño F. (1996). Metodología de la Investigación Epidemiológica. Medellín (Colombia) : Editorial Universidad de Antioquia. Yuluka Salud Pública
- Lundgren O & Raintree B. (1983). Sustained agroforestry. En: Nestel B. Agricultural research for development: Potentials and challenges in Asia. The Hague. The Netherlands.
- Marcato P. (1990). Anatomía e Histología Patológica especial de los mamíferos domésticos. España: Interamericana, Mc Graw Hill.
- Maas, J (2008). Sudden death in cattle. University of California. Consultado el 20 de octubre de 2011: http://www.vetmed.ucdavis.edu/vetext/INF-BE_cca/INF-BE_cca08/cca0811-sudden-death.pdf
- Mahecha, L., Pelaez, F., & Gallego, L. (2002). Situación actual de la ganadería de carne en Colombia y alternativas para impulsar su competitividad y sostenibilidad. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 15, 213-225.
- Mahecha L., Rosales M., Molina C. & Molina E (2002). Evaluación de un sistema silvopastoril de pasto estrella, Leucaena y algarrobo forrajero, a través del año, en el Valle del Cauca. En: Memorias VI Seminario Internacional sobre sistemas agropecuarios sostenibles. 28-30 de octubre. CIPAV y FAO. Cali, Colombia.
- Matches, J., Liston, J & Curran, D. (1974). *Clostridium perfringens* in the environment. *Applied microbiology*, 28, 655- 660.
- McCrea, B & Macklin, K (2006). Effect of Different Cleaning Regimens on Recovery of *Clostridium perfringens* on Poultry Live Haul Containers. *Poultry Science* , 85, 909–913.
- Medina M. (2000). Rabia paratífica bovina. Universidad nacional autónoma de México. 9 p. consultado el 20 de octubre de 2011: http://fmvzenlinea.fmvz.unam.mx/file.php/67/Unidad_4/Rabia_paratifica_bovina.pdf
- Méndez, J., Návar, J & Gonzáles, V. (2008). Análisis de tendencias de precipitación (1920-2004) en México. *Investigaciones geográficas*, 65, 38-5.
- Mendez, E., Beer, J. Faustino, J. & Otalora, A. (2000) Plantaciones de árboles en línea.
- Minami J, Katayama S, Matsushita O, Matsushita C & Okabe A. (1997). Lambda-toxin of *Clostridium perfringens* activates the precursor of epsilon-toxin by releasing its N- and C-terminal peptides. *Microbiol Immunol.* 41, 527-535
- Miwa, T. (1975). Clostridia in soil of the Antarctica. *Japanese journal of medical science & biology*, 28, 201-213
- Morris W.E. & Fernández M.E (2009). Toxinas de *Clostridium perfringens*. *Revista argentina de microbiología*, 41. 251 -260.
- Munangandu, H., Muyoyeta, P., Mweenw, A & Kida, H (1996). Bovine clostridial infections in Zambia. *Japanese journal of veterinary research*, 44, 175-178.
- Nair R. (1985). Classification of agroforestry systems. *Agroforestry Systems*, 3, 97-128.

- Nair, R (1993). An introduction to agroforestry. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic.
- Niilo L.(1987). Toxigenic characteristics of *Clostridium perfringens* type C in enterotoxemia of domestic animals. Can. J. Vet. Res, 51: 224-228.
- NRC (1996). Nutrient Requirements of Beef Cattle. Washington, DC: National Research Council, National Academy Press
- Nunes, J.A (2005). “Carbúnculo Sintomático (Manqueira)”. Consultado el 22 de octubre de 2011 <http://www.limousin.com.br/pages/artigos>
- Ortiz D. & Benavides E (2000). Las neurotóxicas tipo c y d de *Clostridium botulinum* son responsables de parte de la mortalidad de bovinos afectados por el síndrome neuroparalítico en cuatro fincas de la Orinoquia colombiana. Revista de medicina Veterinaria. 2, 9 – 20.
- Ortiz O & Benavides, O (2002). Hallazgos histopatológicos en bovinos naturalmente afectados por el síndrome neuroparalítico en la Orinoquia colombiana. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. 15 , 107-114.
- Ortiz D. y Villamil L.C. (2008). Bacterias anaerobias del suelo responsable de la muerte súbita bovina en sabanas tropicales: investigaciones realizadas en Colombia. Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria ,9, 102 – 112.
- Ortiz; D., Villamil; L & Martínez E. (2010). Aislamiento y caracterización molecular de bacterias anaerobias asociadas al suelo en zonas ganaderas con problemas de muerte súbita. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. Universidad de Antioquia, 24., 406.
- Ortiz Ortega, D. (2012). Aislamiento y caracterización molecular de clostridios asociados al suelo en zonas ganaderas de Colombia con problemas de mortalidad en bovinos (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia).
- Otte, J. (1991). El diseño de investigaciones epidemiológicas. Proyecto Colombo Alemán, Introducción de un sistema de asistencia técnica integral pecuaria, GTZ, ICA, UNISALLE.. Santafé de Bogotá; Colombia: Centro Internacional de Capacitación en Desarrollo Pecuario.CICADEP
- Palmer, G., Rurangirwa, F., Kocan, K & Brown, W (1999). Molecular basis for vaccine development against ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. Parasitol. Today. 7, 281-286.
- Panciera, R & Williams, D (1986). Sudden death syndrome of feeder cattle. Food Animal Practice 2. Philadelphia: W. B. Saunders Co.
- Parra, J., Olarte, L., Barrera, J & Acevedo, L (1996). Diagnóstico y alternativas de control al problema de la mortalidad bovina en un área del departamento del Vichada. CORPOICA, 113
- Payne, D., Williamson, E., Havard, H., Modi, N & Brown, J. (1994) . Evaluation of a new cytotoxicity assay for *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. FEMS Microbiol Lett 116, 161-167.
- Payne., D., Williamson, D & Titball, R. (1997). The *Clostridium perfringens* epsilon-toxin. Rev Med Microbiol; 8, 28-30.
- Pelzer K.D. & Currin N. (2009). Zoonotic diseases of cattle. Virginia cooperative extensions. Publication 400 – 460. Consultado el 20 de octubre de 2011: http://pubs.ext.vt.edu/400/400-460/400-460_pdf.pdf
- Pezo, D & Ibrahim M. (1999). Sistemas silvopastoriles, Colección de módulos de enseñanza agroforestal, módulo de enseñanza No. 2, Turrialba, Costa, Rica: CATIE.

- Phillippo, M., Humphries, W., Atkinson, T., Henderson, & Garthwaite, P. (1987). The effect of dietary molybdenum and iron on copper status, puberty, fertility and oestrus cycles in cattle. *J. Agric. Sci.* 22, 109 - 321.
- Picco, S., Abba, M., Mathiolo, G., Rosa, D., De Luca, J & Dulout, F. (2004) . Association between copper deficiency and DNA damage in cattle. *Mutagenesis*, 19, 453.
- Pierson, R., Jensen, R., Lauerman, L., Saari, D., Braddy, M., McChesney, M & Horton D. (1976) . Sudden deaths in yearling feedlot cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 169, 527–529.
- Radostitis O, Gay , C, Blood, D & Hinchcliff, K (1999). *Veterinary Medicine*. 9th ed. London: . W Saunders
- Ramírez, C., Mattioli G., Tittarelli C., Giuliadori M. & Yano H. (1998). Cattle hypocuprosis in Argentina associated with periodically flooded soils. *Livestock Product. Sci.* 55, 47-52.
- Reyes G., Villamil J., Ariza S., Cediell B., & Romero P. (2004). *Salud Pública Veterinaria en Colombia. Pasado, Presente y Futuro*. Organización Panamericana de la Salud: Moosn Creative Publicidad.
- Ristic M. (1980). *Anaplasmosis En: Amstutz HI, editor. Bovine medicine and surgery Vol.1. Sta. Bárbara (Ca): American Veterinary publications Inc.*
- Robles C.A. (1998). *Enfermedades clostridiales del ganado*. Instituto nacional de tecnología agropecuaria.
- Ruiz A. (2002). *Fijación y almacenamiento de carbono en sistemas silvopastoriles y competitividad económica en Matiguas, Nicaragua*. Tesis Mag Sc. CATIE. Turrialba, Costa Rica..
- Ruiz, V., Save, R & Biel, C. (2012). *Comparación de dos variables climáticas: temperatura y precipitación, registradas en dos Estaciones Agro meteorológicas del norte de Nicaragua en el período 2009-2011*. Estación experimental. Consultado el 20 de abril de 2013 en http://www.farem.unan.edu.ni/tropisecco/not_variables_climaticas.html
- Russo R. (1994) . *Los sistemas agrosilvopastoriles en el contexto de una agricultura sostenible*. Agroforestería de las Américas. Abril-junio.
- Sánchez, M. (1998). *Sistemas agroforestales para intensificar de manera sostenible la producción animal en Latinoamérica tropical*. Roma:
- Sánchez S. (1990) . *Patología del sistema nervioso*. En: Sánchez San Martín R. Ed. *Patología Sistémica Veterinaria*. México, D.F: FMVZ UNAM
- Santos, H., Ferri, M & D'Assumpção, W. (1975). *Levantamento de plantas tóxicas para bovinos suspeitas de serem tóxicas no estado de Minas Gerais*. EPAMIG. Belo Horizonte MG.
- Silveira, D.; Souza, A & Mesquita, A (1995). *Enterotoxemia em bovinos: uma enfermidade de importância emergente*. *Bol. Téc. Inf. Rhodia Mérieux*, 2, 1-4.
- Silvola, J & Ahlholm, U. (1993). *Effects of CO2 concentration and nutrient status on growth, growth rhythm and biomass partitioning in a willow , Salix phylicifolia (alba)*, *Oikos*, 67, 227 – 234
- Sherley, M. (2004). *The traditional categories of fluoroacetate poisoning signs e symptoms belie substantial underlying similarities*. *Toxicol. Letters*, 151, 399-406.
- Smith, G & Morison, C. (1977) . *A comparison of the distribution of Clostridium botulinum in soil and in lake mud*. *J Hyg* , 78 , 39- 41.
- Smith L & Holdema L. (1968) . *The Patogenic Anaerobic Bacteria*. Springfield, Illinois. United States: Charles C Thomas Publisher.

- Smith, L. (1975) . Common mesophilic anaerobes, including *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani* in 21 soil specimens. *Applied microbiology*, 29, 590- 594
- Somarriba, E. (1998). ¿Qué es agroforestería?. En Jiménez, F. ; Vargas, A (Eds). Apuntes de clase del curso corto: Sistemas Agroforestales. CATIE, Turrialba, Costa Rica. Serie Técnica. Manual Técnico.
- Somarriba, E. y Calvo. (2001). Criterios propuestos para el efecto de la sombra.
- Somarriba, E. (2002) Estimación visual de la sombra en cacaotales y cafetales, *Agroforesteria de las Americas* 9, 86-94.
- Canjura, E. Sánchez, V., Krauss, U., & Somarriba, E. (2002). Reproducción masiva de *Verticillium* sp., hiperparásito de la roya del café, *Hemileia vastatrix*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 66, 274.
- Suttle, N (1991). The interactions between copper, molybdenum, and sulphur in ruminant nutrition. *Annu. Rev. Nutr.* 11,121-140.
- Thanissery ,R., McReynolds , J., Conner ,D., Macklin ,K., Curtis ,P & Fasina, Y. (2010). Evaluation of the efficacy of NuPro yeast extract in reducing intestinal *Clostridium perfringens* levels in broiler chickens. *Poultry Science*, 89 ,2380–2388
- Torres, J., Castro, R & Grande , D. (2008). Cercas de uso pecuario en la cuenca del rio la antigua, México. *Inventario florístico y costos de construcción*, *Zootecnia tropical*, 26, 279-283
- Torres M. Miranda J & Martínez, M.(1995). Caracterización de lesiones histopatológicas en encéfalos de bovinos positivos a rabia paralitica bovina en el estado de Yucatán. *Revista Biomen*, 6, 200 -206.
- Tokarnia, C. (1987) . Síndrome de la caída del ganado. En: “Memorias IV Seminario Internacional de Medicina Bovina” (Glasser, H. & Benavides, E., eds.). Asociación Colombiana de Médicos Veterinarios y Zootecnistas, ACOVEZ, 95-99.
- Tokarnia, C. Döbereiner J. y Peixoto P.(2000). *Plantas tóxicas do Brasil*. Editora Helianthus. Rio de Janeiro: Editora Helianthus
- Tokarnia, C., Canella, C & Döbereiner J. (1961). Intoxicação por um "tingui" (*Mascagnia rígida*) em bovinos no Nordeste do Brasil. *Arq. Inst. Biol. Anim*, 4, 203-215.
- Tokarnia, C. & Döbereiner, J (1986). Intoxicação por *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae) em bovinos no Brasil. *Pesqui. Vet. Bras.*, 6, 73-92.
- Tokarnia, C., Döbereiner, J & Peixoto, P (1994). Aspectos clínico-patológicos complementares da intoxicação por algumas plantas tóxicas brasileiras. *Pesqui. Vet. Bras.*, 14, 111-122.
- Toro R. Ortiz D. & Ossa J. (2007). Detección de *Clostridium chauvoei*. En musculo fijado en formol utilizando la técnica ELISA indirecto y un anticuerpo monoclonal. *Revista de investigación*, julio – diciembre, 7, 163 – 169.
- Thrusfield, M. (2005). *Veterinary Epidemiology*. Third Edition. Oxford,Great Britain: Editorial Blackwell Publishing Ltd
- Ulacio, D., Nass, H., Pineda, J & Carrasco, A. (1998). Viabilidad de *Rhizoctonia solani* Kuhn AG1-IA bajo condiciones de inundación. *Microflora asociada al patógeno en tejido de Oryza sativa*. *Bioagro*, 10, 40 – 47.
- Uribe, A. (1996). La identificación de la causa etiológica. La prevención y el tratamiento de una enfermedad responsable de la mortalidad de bovinos en los departamentos de Meta, Vichada y Casanare. Informe final FEDEGAN, 132.

- Van Soest P (1982) . Nutritional ecology of the ruminant, Corvallis: O&B Books.
- Vannelli, S. A., & Uzal, F. A. (1996). Clostridium septicum detection by the peroxidase-antiperoxidase (PAP) technique, in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue of sheep [gas gangrene]. Archivos de Medicina Veterinaria, 28.
- Wilkinson K & Elevitch C. (2000) . Multipurpose windbreaks: Design and especies for Pacific Islands. En: Agroforestry Guides for Pacific islands. Permanent Agriculture Resources. 31
- Wiersum, K(1997): "Indigenous exploitation and management of tropical forest resources: an evolutionary continuum in forest-people interactions." Agriculture, ecosystems & environment 63, 1-16.
- Yeager, C., Northup, D., Grow,C., Barns,S & Kuske,C. (2005) . Changes in Nitrogen-Fixing and Ammonia-Oxidizing Bacterial Communities in Soil of a Mixed Conifer Forest after Wildfire. Applied and environmental microbiology , 71 , 2713–2722.
- Young A. (1990). Agroforestry for soil conservation.Wallingford, UK: CAB International.

- Presencia de excrementos de lombriz de tierra: Alta _____ Media _____ Baja _____
- Poros (Sacar un terrón de tierra de los primeros 10 cms): Abundantes _____ Medianos _____ Escasos _____
- Textura del suelo (Cualitativa en campo. Marcan con X): Arcilloso _____ limoso _____ franco _____, Arenoso _____ Franco arcilloso _____ Franco Arcillo limoso _____ otro, Cual? _____
- Presencia de plantas indicadoras de fertilidad del suelo (Marcan con X):
- helechos: Abundantes _____ Medianos _____ Escasos _____
- leguminosas: Abundantes _____ Medianas _____ Escasas _____
- platanillos: Abundantes _____ Medianos _____ Escasos _____
- Otras: cuál? _ Abundantes _ Medianos _ Escasos _____
- Profundidad efectiva (Cuantitativa en campo. Marcan con X): Muy superficial (0-25cm) _____ Superficial (25-50cm) _____ Profunda (50-100cm) _____ Muy profunda (100-150cm) _____

10. En bovinos se presentan enfermedades agudas que producen muertes repentinas, que afectan generalmente animales en muy buena condición corporal. ¿En ésta finca se han presentado casos de muertes de animales con éstas características?

Si

No

10.1. Cuántos animales se han muerto? _____

10.2. En qué época se mueren? _____ (Especifique mes o meses del año)

10.4. ¿En su criterio cuáles son las especies mas afectadas? _____

10.5 Hay evidencia de traumas o lesiones penetrantes en los animales afectados

Si

Localización _____

No

11. Historia reciente de actividades de manejo en los animales muertos _____ (Si o No)

CASTRACIÓN _____

DESCORNE _____

TOPIZA _____

OTROS _____

12. Consumo de objetos o material extraños, pica o malacia?

Si De que tipo _____

No

13. Signos clínicos en animales enfermos

Si

No

14. Descríbalos: _____

15. ¿Cómo dispone de los animales muertos?

Entierra _____

Vende _____

No hace nada, los zamuros se los comen _____

Quema _____ Otros _____

III. Descripción de la finca

16. La Topografía de la finca es:

Plana

Ondulada

17. ¿La finca tiene áreas inundables? Área de inundación (%)

Nota: Sí su respuesta es sí por favor especifique el porcentaje

Si

No

Porcentaje _____

IV. Manejo de Praderas

18. ¿Ara o subsola los potreros? Cada cuanto (mes)

Si ¿Cada cuánto? _____

No

19. ¿Posee riego la finca?

Si

No

20. Los pastos presentes en la finca son:

21. El sistema de Pastoreo es:

22. ¿Cada cuánto hace rotación de potreros? _____ días

23. ¿Abona las praderas?

Si

No

24. Producto(s) empleado(s) _____

V. Población Animal

25. La raza predominante es _____

26. Población de animales en la finca:

Terneros _____

Terneras _____

Novillas _____

Novillos _____

Vacas en Producción _____

Vacas horras _____

Toros _____

Total bovinos _____

Total ovinos _____

Total Equinos _____

Total Caninos _____
Total Porcinos _____
Total Aves _____
Otros _____

VI. Manejo Animal

27. Los animales de reemplazo se levantan y se crían en la finca

Si

No

28. Suministra sales mineralizadas

Si

No

29. Frecuencia _____

30. Marca _____

31. Bultos al mes _____

32. Otros Suplementos _____

VII. Plantas Tóxicas

33. ¿Hay plantas tóxicas?

Si

No

34. ¿Cuáles existen en la finca?

35. ¿Asocia la presencia de plantas tóxicas con el problema de mortalidad?

Si

No

VIII. Pesticidas

36. ¿En la finca se utilizan pesticidas?

Si

No

37. ¿Asocia el uso de pesticidas con el problema de mortalidad?

Si

No

IX. Manejo Sanitario

38. Vacunas

Aftosa _____

Carbónes o Rayo _____

Brucelosis _____

Rabia _____

Botulismo _____

Otras _____

Cuales _____

39. Compra Animales _____ Procedencia _____

40. Venta de animales _____ Causa _____

41. Manejo de excretas SI _____ NO _____

X. Observaciones

Nombre del responsable _____

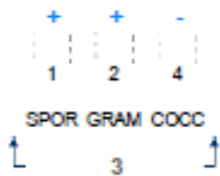
Firma _____

ANEXO 2.

RESULTADOS: CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS CLOSTRIDIUM POR FINCAS OBSERVADAS

2.1 FINCA LA BONITA

API 20 A V4.0



REFERENCIA FECHA
 ALDEMAR 6/04/11
 COMENTARIO
 F1

PERFIL INACEPTABLE

Galería API 20 A V4.0
 Perfil 5 4 3 7 6 0 2 3
 Nota

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra							
<i>Clostridium beijerinckii/butyricum</i>			IND	1%	LAC	95%	XYL	97%	GEL	10%
			RAF	80%						

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra							
<i>Clostridium clostridioforme</i>			IND	0%	LAC	77%	XYL	91%	GEL	5%
			MLZ	75%	RAF	94%	RHA	86%		

2.2. FINCA EL SILENCIO

API 20 A V4.0



REFERENCIA FECHA
25/03/11

COMENTARIO

IDENTIFICACION ACEPTABLE EN EL GENERO

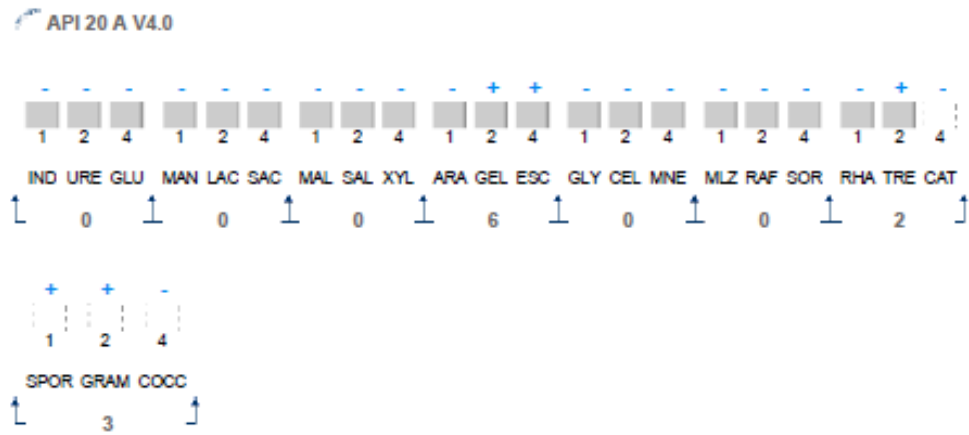
Galería API 20 A V4.0
Perfil 0 0 0 6 4 0 0 3
Nota ESPECIE ALTAMENTE PATOGENA

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
<i>Clostridium bifementans</i>	46.8	0.51	IND 90%	GLU 75%	ESC 6%	
<i>Clostridium botulinum/sporogenes</i>	32.6	0.49	ESC 20%	MNE 1%		
<i>Clostridium difficile</i>	10.2	0.43	GLU 99%	MAN 80%	MLZ 83%	

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra	
<i>Clostridium spp</i>	9.8	0.29	ESC 5%	MNE 0%

Pruebas complementarias(s)	LIPASA	LECHE(D)	PYG+BILIS	LECHE(C)
<i>Clostridium bifementans</i>	-	+	-(+)	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	-	+(-)	-
<i>Clostridium botulinum</i>	+(-)	+(-)	+(-)	+(-)
<i>Clostridium sporogenes</i>	+	+	-(+)	-

2.3. FINCA EL DIAMANTE



REFERENCIA: aidemar zufiga
 FECHA: 25/03/11
 COMENTARIO: finca 5

IDENTIFICACION PRESUNTIVA

Galeria: API 20 A V4.0
 Perfil: 0 0 0 6 0 0 2 3
 Nota: ESPECIE ALTAMENTE PATOGENA

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra	
Clostridium botullinum/sporogenes	99.4	0.79	ESC 20%	
Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra	
Clostridium spp	0.5	0.29	ESC 5% TRE 0%	
Pruebas complementarias(s)	LECHE(C)	ProA	PYG-BILIS	STAR.(HID)
Clostridium botullinum	+(-)	0%	+(-)	+(-)
Clostridium sporogenes	-	82%	-(+)	-

2.4. FINCA BERLIN

API 20 A V4.0



REFERENCIA: aldemar zuñiga
FECHA: 25/03/11

COMENTARIO: finca 7

PERFIL DUDOSO

Galería: API 20 A V4.0
Perfil: 5 2 3 6 6 0 2 3
Nota:

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra
<i>Clostridium septicum</i>	99.9	0.46	IND 0%
Taxón sugulente	% ID	T	Pruebas en contra
<i>Clostridium paraprutificum</i>	0.1	0.0	IND 0% SAC 92% GEL 0% TRE 21%

2.5. FINCA EL PRADO

API 20 A V4.0



REFERENCIA: aidemar zufiga
 FECHA: 25/03/11
 COMENTARIO: finca 8

PERFIL DUDOSO

Galería: API 20 A V4.0
 Perfil: 40 16 0 0 3 3
 Nota: ESPECIE ALTAMENTE PATOGENA

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra	
<i>Clostridium botulinum/sporogenes</i>	99.9	0.37	ESC 20% RHA 0%	
Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra	
<i>Clostridium septicum</i>	0.1	0.0	LAC 99% SAL 94% CEL 76% MNE 99% RHA 1%	
Pruebas complementarias(s)	LECHE(C)	ProA	PYG+BILIS	STAR.(HID)
<i>Clostridium botulinum</i>	+(-)	0%	+(-)	+(-)
<i>Clostridium sporogenes</i>	-	82%	-(+)	-

2.6 NUEVA ZELANDA

API 20 A V4.0



REFERENCIA FECHA
 aldemar zuñiga 25/03/11
 COMENTARIO
 finca 11

BUENA IDENTIFICACION

Galería API 20 A V4.0
 Perfil 5 6 7 7 7 2 3 3
 Nota

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra							
<i>Clostridium beijerinckii</i> /butyricum	99.9	0.44	IND	1%	GEL	10%	RHA	25%		
Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra							
<i>Clostridium clostridioforme</i>	0.1	0.0	IND	0%	GEL	5%	GLY	0%	MLZ	75%
Pruebas complementarias(s)	GMB	PYG+BILIS								
<i>Clostridium beijerinckii</i>	-	-(-)								
<i>Clostridium butyricum</i>	+	+								