

## 1. INTRODUÇÃO

A criação de ruminantes é uma atividade de relevante importância sócio-econômica para o Brasil. Os bovinos, caprinos e ovinos representam uma das principais fontes protéicas para a população, sendo que a produção de carne, lã, leite e derivados vêm crescendo a cada ano para atender a demanda do mercado consumidor. O país tem o maior rebanho bovino comercial do mundo, os indicadores econômicos da pecuária estão subindo ano após ano e retornaram os investimentos na produção animal (ANUALPEC, 2003).

No Brasil grande parte da criação ainda é feita em regime de pasto ou parcial, o que leva a constantes infecções por parasitos presentes nas pastagens (ANUALPEC, 2003; PADILHA, 1996).

Dentre os parasitos, os nematóides gastrintestinais constituem um sério problema na criação de ruminantes, devido ao impacto que causam na produção de carne e leite e aos altos custos das medidas de controle (HONER e BIANCHIN, 1987; WALLER e LARSEN, 1993). As perdas econômicas mundiais anuais causadas pela infestação por nematóides gastrintestinais são estimadas em milhões de dólares (TORINA *et al.*, 2004).

Nas últimas décadas, grandes avanços foram feitos no controle de nematóides parasitos de animais domésticos, com desenvolvimento de novas moléculas para uso específico como anti-helmínticos. Grande parte das drogas disponíveis possui um amplo espectro de ação e um alto nível de segurança (WALLER, 1997). Entretanto, nos últimos anos houve um aumento expressivo no número de relatos de cepas de nematóides de várias espécies, resistentes aos diversos compostos disponíveis. Somado a este fato, temos a crescente tendência do mercado consumidor, por produtos livres de resíduos químicos e que não causem danos ao meio ambiente (GRONVOLD *et al.*, 1996; SUAREZ, 2002).

Estes fatores têm levado ao desenvolvimento de pesquisas de alternativas para o controle destes parasitos. Diversos métodos alternativos para o controle das nematodioses gastrintestinais de ruminantes têm sido pesquisados: manejo de pastagens (BRUNDSON, 1980), seleção de animais geneticamente resistentes (FRISCH e VERCOE, 1984), desenvolvimento de

vacinas (EMERY, 1996) e controle biológico utilizando fungos nematófagos (GRONVOLD *et al.*, 1993; ARAÚJO *et al.*, 1996), sendo este último considerado um dos mais promissores (LARSEN, 1999). Esses fungos são os organismos antagonistas de nematóides mais estudados, reduzindo efetivamente populações de nematóides presentes na pastagem (WALLER e LARSEN, 1993).

Segundo GRONVOLD *et al.* (1996), o controle biológico descreve situações em que um antagonista (parasita, parasitóide, predador ou patógeno) é aplicado no ambiente para diminuir populações de pragas (parasitos) para densidades subclínicas ou manter as populações destes em níveis não prejudiciais, não atuando diretamente sobre os estágios parasitários no hospedeiro, concentrando suas ações sobre hospedeiros intermediários, paratênicos, vetores e estágios larvais de vida livre, diminuindo as fontes de infecção para os hospedeiros finais.

O controle biológico de nematóides parasitos em rebanhos visa estabelecer uma situação em que os animais em regime de pasto sejam expostos a um baixo nível de larvas infectantes que não causem danos, mas assegurem o desenvolvimento de imunidade natural adquirida (THAMSBORG *et al.*, 1999). No Brasil, poucos grupos de pesquisa mantêm estudos nesta área, entretanto, os resultados obtidos até o momento indicam que esta pode se tornar uma promissora forma de controle de parasitos gastrintestinais de ruminantes.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Gastreenterite verminosa de ruminantes**

A maior parte dos animais criados a campo apresenta parasitismo por uma ou mais espécies de helmintos, sendo que os nematóides da ordem *Strongylidea* são os mais importantes. O parasitismo, entretanto, nem sempre é sinônimo de doença, pois geralmente, a maioria dos animais do rebanho se encontra em boas condições de saúde. Isto ocorre pelo fato dos hospedeiros terem mecanismos imunológicos que permitem manter a população de endoparasitos sob controle (AMARANTE, 2005).

Este equilíbrio pode ser alterado por diversos fatores tais como o clima, o nível nutricional, a raça, idade e o estado fisiológico dos animais (COOP e KYRIAZAKIS, 1999). Muitas vezes, o rompimento do equilíbrio é produzido pela ação do próprio homem através de medidas indevidas de manejo e utilização incorreta de medicamentos antiparasitários (AMARANTE, 2001).

O ciclo biológico de grande parte dos nematóides gastrintestinais pode ser dividido em duas fases principais. A primeira fase é a infecção do hospedeiro (fase parasitária), quando o parasito adulto localiza-se em algum segmento do sistema gastrintérico e a segunda refere-se à fase de vida livre que se inicia com a liberação de ovos na pastagem através das fezes. Ocorre então a eclosão dos ovos, com subsequente desenvolvimento das larvas de primeiro estágio (L<sub>1</sub>) em larvas infectantes (L<sub>3</sub>) em aproximadamente sete a quatorze dias. A sobrevivência e o desenvolvimento das larvas requerem condições ambientais apropriadas que também influenciam a migração das larvas dos bolos fecais para as pastagens. Estas infectam seus hospedeiros principalmente por via oral.

No Brasil, as larvas infectantes das principais espécies de nematóides parasitos estão disponíveis nas pastagens praticamente durante o ano todo, servindo de fonte de infecção contínua para os animais (LIMA, 1989). Estudos realizados em diversas regiões têm demonstrado uma maior prevalência dos gêneros *Cooperia*, *Haemonchus*, *Oesophagostomum*, *Trichostrongylus*, *Trichuris* e *Bunostomum* em bovinos (FURLONG *et al.*, 1985; GIRÃO *et al.*, 1985; BIANCHIN *et al.*, 1990; LIMA *et al.*, 1990; ARAÚJO *et al.*, 1992a; HONER e VIEIRA BRESSAN, 1992). No que se referem aos pequenos ruminantes os diversos levantamentos efetuados até o momento têm demonstrado uma maior prevalência dos gêneros *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Strongyloides*, *Cooperia*, *Bunostomum*, *Oesophagostomum*, *Trichuris* e *Skjabinema* (CHARLES, 1991; CHARLES, 1995; ECHEVARRIA, 1996; AMARANTE *et al.*, 1997; RAMOS, *et al.*, 2004).

As conseqüências das helmintoses gastrintestinais estão relacionadas ao número e espécies de larvas a que o animal é exposto e a quantidade de parasitos que se estabelecem em seu trato gastrintestinal. Por outro lado, o grau de infecção por nematóides gastrintestinais adquiridos pelos animais é

dependente de uma série de fatores que muitas vezes se inter-relacionam. Estes incluem os efeitos diretos e indiretos de condições climáticas que podem determinar a taxa de infestação da pastagem, comportamento de pastejo dos animais, infecções prévias e estado fisiológico dos animais (WALLER, 2005).

As infecções parasitárias do rebanho geralmente são mistas e os efeitos patológicos causados pelos nematóides gastrintestinais são variados e dependem, dentre outros fatores, do tipo de migração e da localização final dos vermes (ARAÚJO e MADRUGA, 2001). Espécies do gênero *Ostertagia* estão associadas à destruição morfológica e funcional das glândulas gástricas do abomaso. A patologia principal provocada por *Haemonchus* é a hemorragia que surge na mucosa, nos locais onde o verme se fixa, que, juntamente com o hábito de hematofagia deste parasito levam a quadros de anemia. Algumas espécies dos gêneros *Cooperia* e *Trichostrongylus*, durante a penetração na superfície epitelial do intestino delgado, podem levar a ruptura da mucosa, resultando em perda de proteínas plasmáticas e atrofia das vilosidades, reduzindo a superfície de absorção de nutrientes e líquidos. Vermes do gênero *Oesophagostomum* migram profundamente na mucosa do intestino, provocando uma resposta inflamatória com formação de nódulos, podendo levar a quadros de colite ulcerativa, levando na fase final da doença ao desenvolvimento de anemia e hipoalbuminemia, devido à perda protéica e extravasamento de sangue através da mucosa lesada (URQUHART *et al.*, 1996).

## **2.2.Tratamento e Controle da Gastreenterite Verminosa dos Ruminantes**

A redução do número de larvas infectantes é um dos principais objetivos do controle das verminoses (PADILHA e MENDOZA-de-GIVES, 1996). Atualmente, diferentes métodos de controle da população de larvas na pastagem têm sido estudados. Esses podem ser classificados como químicos, imunológicos, de manejo e biológicos. Destes, o mais difundido é o controle químico através da aplicação de anti-helmínticos (JACKSON, 2004).

O método convencional de controlar nematóides parasitos de ruminantes domésticos é a utilização de drogas anti-helmínticas sintéticas (WALLER, 2005). Estas agem sobre as formas parasitárias estabelecidas no hospedeiro.

Tradicionalmente, em diversas regiões do mundo o controle dos nematóides gastrintestinais de ruminantes tem se baseado exclusivamente na utilização de drogas antiparasitárias de amplo espectro (CHARLES e FURLONG, 1996), visando à redução da contaminação das pastagens (BRUNDSON, 1980). Este método de controle possui boa eficácia, eliminando rapidamente muitos dos gêneros e espécies de nematóides parasitos de animais.

Durante a última década, os benzimidazóis e os endectocidas do grupo das avermectinas têm sido as drogas mais freqüentemente usadas (SUAREZ, 2002). O uso destas drogas anti-helmínticas reduz as perdas econômicas, apesar da maioria dos esquemas de controle em uso ser feita de forma empírica, com excessos ou subdosagens e aplicação em épocas inadequadas, sem se basear nos aspectos epidemiológicos da doença (CHARLES e FURLONG, 1996; WALLER *et al.*, 1996).

As estratégias de controle e o uso dos anti-helmínticos variam de acordo com a região. Esta variação nos programas de controle decorre das diferenças nos aspectos epidemiológicos da gastroenterite verminosa. Baseados em estudos epidemiológicos realizados no Brasil, três a quatro tratamentos preventivos são recomendados pra bovinos de corte ou leite em meses que variam de região para região (BIANCHIN, 1996; SUAREZ, 2002). Para pequenos ruminantes existem grandes variações nos esquemas de tratamentos preventivos, variando de uma região para outra e sistemas de criação (COSTA e VIEIRA, 1984; SANTIAGO *et al.*, 1976; PADILHA, 1996).

Durante os últimos 10-15 anos houve um aumento no interesse de desenvolvimento de novas alternativas para o controle de nematóides parasitos de animais de produção. O motivo para este aumento é multifatorial, mas a principal razão é o crescente desenvolvimento de resistência anti-helmíntica em diversas espécies de nematóides parasitos de ruminantes. Antes restritos aos parasitos de pequenos ruminantes, agora existe um aumento no número de relatos de resistência anti-helmíntica de nematóides parasitos de bovinos

(PINHEIRO e ECHEVARRIA 1990; VIEIRA e CAVALCANTE, 1999; FIEL *et al.*, 2001; PAIVA *et al.*, 2001, RANGEL *et al.*, 2005). Outras razões incluem aumento nos custos para o registro de novas drogas, pressão do mercado consumidor para produção de produtos livres de resíduos químicos e a crescente preocupação com o efeito das drogas antiparasitárias sobre o meio ambiente (HERD, 1996; WALLER, 1997; LARSEN, 2000).

Métodos alternativos de controle como a seleção de animais geneticamente resistentes, vacinas, manejo de pastagens e o controle biológico podem ser considerados como opções para num sistema integrado de controle, minimizando a necessidade da aplicação de anti-helmínticos.

A observação de resistência de certas raças ou indivíduos dentro de uma mesma raça às infecções helmínticas tem sido considerada uma alternativa de controle de verminoses (AMARANTE *et al.*, 1999; MURRAY, 1999).

A vantagem de se utilizar animais geneticamente resistentes é que, animais mais resistentes às infecções e aos seus efeitos, contribuiriam para reduzir a contaminação do ambiente. Além disso, haveria uma menor necessidade de tratamentos anti-helmínticos, retardando o surgimento de resistência (MILLER e GRAY, 1996).

Baseados no sucesso das vacinas com larvas atenuadas por irradiação dos vermes pulmonares de bovinos e ovinos *Dictyocaulus viviparus* e *D. filaria*, muitas tentativas foram feitas para produzir vacinas utilizando a mesma metodologia contra vermes gastrintestinais de ruminantes. O problema da quantidade de larvas, acondicionamento, vida de prateleira e viabilidade, representam importantes obstáculos para o desenvolvimento de vacinas comerciais com larvas irradiadas para o controle de nematóides gastrintestinais (EMERY *et al.*, 1996).

A atenção agora tem se voltado para produção de vacinas baseadas na seleção de diferentes antígenos (SIEFKER e RICKARD, 2000; KNOX e SMITH, 2001). Embora algum sucesso já tenha sido obtido com estas técnicas em alguns grupos de helmintos, não existe até o momento nenhuma vacina comercial disponível para o controle de nematóides gastrintestinais disponível no mercado.

Técnicas de manejo que visem diminuir a contaminação da pastagem com larvas infectantes representam um importante avanço no controle das verminoses, reduzindo o uso de antiparasitários para a profilaxia das helmintoses. As pastagens com baixa contaminação pelas larvas infectantes dos nematóides gastrintestinais beneficiam principalmente as categorias mais suscetíveis à verminose, como animais jovens e fêmeas no periparto (AMARANTE, 2004).

Entre as práticas de manejo de pastagens visando o controle de verminoses, destaca-se o sistema de rotação de pastagens, em que os animais são tratados com anti-helmínticos e transferidos para um novo piquete com infectividade menor (WALLER, 1996a).

Do ponto de vista zootécnico, a rotação de pastagens é uma prática vantajosa, pois permite melhor aproveitamento das áreas destinadas ao pastejo. Contudo, se mal conduzida, esta prática pode trazer problemas às áreas de pastejo utilizadas em esquema de rotação. Estas geralmente permanecem sem animais por mais ou menos 30 a 40 dias. Este período de descanso da pastagem, na maioria das situações é muito curto para permitir redução significativa da contaminação da pastagem, pois as larvas infectantes de algumas espécies de helmintos podem sobreviver durante vários meses na pastagem (LIMA, 1989; AMARANTE, 2005).

O fato do sistema de rotação de pastagens permitir uma maior taxa de lotação, muitas vezes, pode levar a uma maior contaminação dos piquetes pelas fezes, expondo os animais a um grande número de larvas infectantes (STROMBERG e AVERBECK, 1999).

Outra alternativa que pode ser adotada com o objetivo de reduzir a contaminação da pastagem é o pastejo envolvendo diferentes espécies animais ou animais resistentes de uma mesma espécie. Este pode ser classificado como misto ou alternado.

O sucesso destes métodos se baseia dentre outros, na especificidade dos parasitos e na imunidade adquirida pelos animais adultos (WALLER, 1996a). Desta forma, quando uma larva infectante proveniente de nematóides de ovinos é posteriormente ingerida por bovinos ocorre a sua inviabilização.

### 2.3. Controle biológico

Durante o desenvolvimento no meio ambiente, os ovos e estádios larvares dos nematóides gastrintestinais são submetidos ao efeito de fatores abióticos, como temperatura, umidade, tensão de oxigênio, assim como fatores bióticos (fauna e flora coprófila). Para que haja continuidade do ciclo biológico, os estádios de vida livre necessitam superar as barreiras causadas por esses fatores, que influenciam o desenvolvimento e sobrevivência desses estádios no meio ambiente (WALLER e. LARSEN, 1993).

A identificação de agentes biológicos com ação antagonista sobre as fases de vida livre pode permitir o seu uso, integrado a outras medidas, para redução da contaminação das pastagens e conseqüentemente da população de nematóides parasitos dos animais criados extensivamente e, conseqüentemente, reduzir a dependência de produtos químicos utilizados como anti-helmínticos (PADILHA, 1996; WALLER, 1992).

São conhecidos até o momento, três principais grupos de organismos antagonistas de nematóides, que diferem entre si de acordo com seu modo de ação. Os predadores são organismos que predam nematóides e utilizam partes de seu corpo como nutrientes. Algumas espécies de predadores podem ser polípagas, consumindo um grande número de espécies de presas e outras olípagas, sendo, portanto, mais específicas. Um segundo grupo é composto por parasitas, que crescem juntamente com seus hospedeiros, obtendo deles os nutrientes necessários para seu desenvolvimento e multiplicação. Em contraste com os predadores, estes organismos são capazes de completar seu ciclo e aumentar sua biomassa em um único nematóide. O terceiro grupo de antagonistas contem um variado número de organismos que influenciam a sobrevivência dos nematóides por competição por espaço ou por produção de substâncias tóxicas aos nematóides (STIRLING, 1991).

Diferentes microrganismos têm sido relatados como antagonistas de nematóides. Entre os vários grupos de microrganismos que utilizam nematóides como fontes de nutrientes temos protozoários, turbelários, tartígrados, oligoquetas, insetos, ácaros, nematóides, vírus e bactérias (MANKAU, 1980; LISEK e NIGENDA, 1989; STIRLING, 1991; WALLER e

LARSEN, 1993; GRONVOLD *et al.*, 1996). A maioria dos organismos estudados permanece como curiosidades e somente algumas espécies de fungos e bactérias demonstram ter potencial para utilização em programas de controle biológico de nematóides (MENDOZA-de-GIVES, 1999).

A primeira descrição de um fungo predando nematóides foi feita em 1888 por Zopf (GRAY, 1988), entretanto JANSSON e POINAR (1986) relataram o encontro de uma peça de âmbar de milhões de anos atrás encontrada no México, contendo um fungo predador de nematóides parasitando um nematóide do gênero *Oligaphelenchoides atrebora*.

Diversos estudos de controle biológico utilizando fungos nematófagos têm demonstrado que este é um método promissor no controle de nematóides gastrintestinais de animais domésticos (LARSEN, 2000; ARAÚJO *et al.*, 2004a).

Os fungos nematófagos são antagonistas dos nematóides, presentes no ambiente, podendo ser isolados do solo (DIAS *et al.*, 1995), fezes frescas coletadas diretamente do reto de animais (MANUELLI *et al.*, 1999), ou bolos fecais em decomposição (MAHONEY e STRONGMAN, 1994; SAUMELL e PADILHA, 2000), com grande potencial para o biocontrole de parasitas de plantas e animais (STIRLING e SMITH, 1998; ARAÚJO, 1999). Estes microorganismos podem ser classificados de acordo com seu modo de ação nos seguintes grupos: ovicidas, endoparasitos, produtores de metabólitos tóxicos aos nematóides e predadores (BARRON, 1977; MANKAU, 1980).

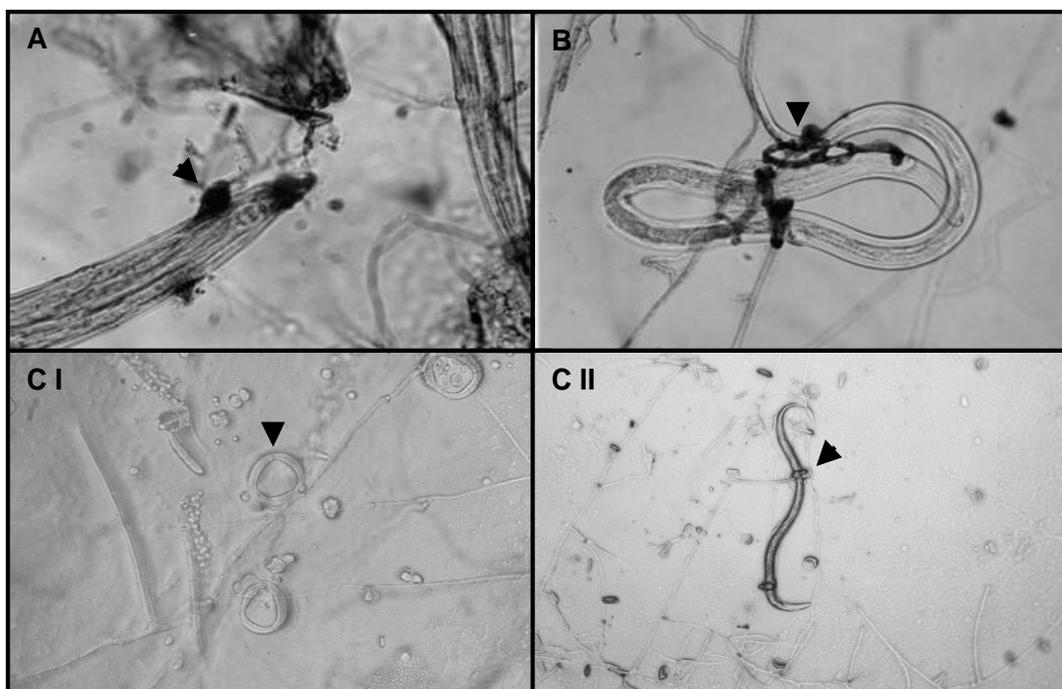
Os fungos com ação ovicida produzem hifas que se fixam aos ovos. Em seguida, forma-se uma dilatação no ponto de interação que danifica a casca do ovo, provavelmente através da ação de enzimas, facilitando a penetração. Em seguida, o fungo forma ramos de micélio no interior do ovo, consumindo o embrião. Hifas endógenas emergem do ovo e produzem conidióforos funcionando como fonte de conídios (PADILHA, 1996; MORGAN JONES e RODRIGUEZ CABANA, 1988). Devido ao fato de os ovos da maioria dos nematóides tricostrongilídeos se desenvolverem e eclodirem em cerca de 12-24 horas após sua eliminação no ambiente, a utilização dos fungos ovicidas sobre este grupo de parasitos pode ser inviável (PADILHA, 1996).

Outro grupo, denominado fungos endoparasitos, infecta os nematóides através de seus esporos. A infecção pode ocorrer através da adesão do esporo à cutícula do nematóide ou através da ingestão. Ocorre então, a germinação do esporo que se difunde pela cavidade corpórea do nematóide, cresce e absorve o conteúdo do nematóide. Estes fungos, com poucas exceções, são parasitos obrigatórios, de difícil cultivo *in vitro* e, portanto, pouco práticos para serem utilizados em programas de controle biológico de nematóides (LOHMAN e SIKORA, 1989; WALLER e LARSEN, 1993).

Algumas espécies de fungos podem destruir nematóides, por meio de toxinas (NORDBRING-HERTZ, 1988) e algumas espécies de fungos podem produzir metabólitos com efeitos ovicidas (WALLER e FAEDO, 1993). Fungos do gênero *Pleurotus* liberam substâncias denominadas nematotoxinas produzidas por células secretoras encontradas em intervalos ao longo das hifas, imobilizando nematóides (BARRON e THORN, 1987).

A maioria das espécies nematófagas está classificada como fungos predadores de nematóides. Estes produzem um extenso sistema de hifas, e ao longo delas são produzidas estruturas denominadas armadilhas que capturam os nematóides. Segundo GRAY (1988) são conhecidos seis tipos de armadilhas:

- hifas adesivas não modificadas ou não diferenciadas;
- ramificações hifais anastomosadas formando redes tridimensionais - Figura1 (B);
- ramificações adesivas, que formam redes simples ou bidimensionais;
- nódulos adesivos - Figura 1 (A);
- anéis constritores Figura 1 (C I) (CII);
- anéis não constritores.



**Figura 1** - (A) larva de nematóide trichostrongilídeo capturada por armadilha do tipo nódulos adesivos; (B) larva de nematóide trichostrongilídeo presa em armadilha do tipo redes adesivas tridimensionais; (C I) anéis constritores em superfície de placa de ágar-ágar; (C II) larva de *Strongyloides westeri* capturada em anel constritor.

Grande parte dos estudos com fungos nematófagos para o controle de nematóides parasitos de animais têm se concentrado em espécies predadoras (LARSEN, 1999). Estes fungos possuem grande variação na sua capacidade predatória sobre nematóides, mas são os mais freqüentemente isolados, apresentando facilidades de cultivo em laboratório e maior potencial de comercialização (ARAÚJO, 1999). Apesar do grande número de espécies de fungos, a maioria dos estudos com fungos nematófagos têm se concentrado em espécies predadoras pertencentes aos gêneros *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* e *Monacrosporium* (LARSEN, 2000).

### 2.3.1. Interação fungo nematóide

Diversos fatores podem estar envolvidos nos processos de formação dos diferentes tipos de armadilha. Estas podem ser produzidas em resposta a estímulos provocados pelos movimentos dos nematóides (JANSSON e NORDBRING-HERTZ, 1980) e substâncias excretadas pelos nematóides (NORDBRING-HERTZ, 1988), escassez de água e nutrientes (BALAN e GERBER, 1972) ou espontaneamente em algumas espécies de fungos, (ARAÚJO *et al.*, 1992b). O processo de captura dos nematóides pelos fungos, inicia-se com a atração dos nematóides pelas armadilhas, ou substâncias orgânicas e inorgânicas como o CO<sub>2</sub> (BARRON, 1977) e ácido siálico (JANSSON e NORDBRING-HERTZ, 1984) seguida da apreensão nas armadilhas.

Após a apreensão do nematóide, a cutícula deste é lesada e penetrada por um bulbo, sendo então o nematóide destruído e seu conteúdo absorvido pelo fungo (DRECHSLER, 1937).

Alguns estudos de microscopia eletrônica sugerem que a adesão do fungo à cutícula do nematóide é mediada por polímeros extracelulares (NORDBRING-HERTZ, 1988), entretanto, grande parte dos estudos ultraestruturais da interação fungo-nematóide foram feitos com nematóides de vida livre e fitonematóides (NORDBRING-HERTZ e STALHAMMAR-CARLEMALM, 1977; WIMBLE e YOUNG, 1984). Diferenças na suscetibilidade de nematóides de vida livre, parasitos de animais e plantas a diferentes espécies de fungos já foram observadas em diversos estudos. GOMES *et al.* (1999) observaram que fungos do gênero *Monacrosporium* predam preferencialmente nematóides de vida livre em comparação com fitonematóides e nematóides parasitos de bovinos, sendo que este fato se repetiu quando se utilizou diferentes isolados de várias espécies de fungos do gênero *Arthrobotrys* (GOMES *et al.*, 2000, 2001). Muitas vezes estas diferenças podem ser feitas mesmo com isolados diferentes de mesma espécie (ARAÚJO *et al.*, 1993).

Estudos sugerem que algumas diferenças antigênicas presentes na cutícula dos nematóides ou nos diferentes isolados de mesma espécie poderiam resultar em diferentes eficácias de predação.

Os mecanismos de adesão e destruição não têm sido bem caracterizados em interações de fungos e nematóides parasitos de animais domésticos, sendo esta caracterização de grande importância, podendo afetar substancialmente a habilidade de um fungo capturar nematóides, tendo implicações na seleção do isolado a ser utilizado em programas de controle biológico (MENDOZA-de-GIVES *et al.*, 1999).

As primeiras pesquisas sobre a atividade de fungos nematófagos sobre nematóides parasitos de animais datam do início do século passado, quando pesquisadores franceses publicaram artigos demonstrando haver atividade de algumas espécies de fungos sobre larvas de nematóides parasitos de animais em condições de laboratório e a campo (PANDEY, 1973).

Desde os primeiros testes, diversos ensaios experimentais, com diferentes espécies de fungos com variados mecanismos de ação sobre diferentes espécies de nematóides parasitos de diversas espécies animais, foram realizados.

PARNELL e GORDON (1963) estudaram o efeito de *Acrostalagmus* sobre larvas de *Haemonchus contortus*, observando redução no número de larvas infectantes em culturas fecais de ovinos.

O efeito antagonista de dez isolados de fungos predadores dos gêneros *Arthrobotrys*, *Dactylaria*, *Monacrosporium* e *Trichothecium* sobre larvas de *Ostertagia ostertagi* e *Trichostrongylus axei* foi observado em um estudo *in vitro* por PANDEY (1973). Neste estudo, as espécies produtoras de redes adesivas e ramos adesivos se mostraram predadoras mais eficientes do que as produtoras de anéis constritores e nódulos adesivos.

GRONVOLD *et al.* (1985), observaram reduções de 99% no número de larvas infectantes em coproculturas, ao inocularem 2500 conídios de *Arthrobotrys oligospora* por grama de fezes contendo ovos de *Cooperia* sp.

NANSEN *et al.* (1986) relataram atividade predatória de isolado da espécie *Arthrobotrys oligospora* sobre larvas do nematóide trichostrongilídeo *Cooperia oncophora* e de nematóides de vida livre *Rhabditis wohlgemuthi* e

*Panagrellus redivivus*. As larvas de *Cooperia* permaneceram ativas por até 20 h após serem capturadas nas armadilhas, enquanto os nematóides de vida livre foram rapidamente invadidos e destruídos pelo fungo.

NANSEN *et al.* (1988), avaliaram a interação entre o fungo *A. oligospora* e estádios pré-parasitários de *Cooperia oncophora*, *C. curticei*, *H. contortus*, *Ostertagia ostertagi*, *D. viviparus*, *Cyathostoma* spp., *Oesophagostomum dentatum*, *O. quadrispinulatum*, *Nematospiroides dubius* e os nematóides de vida livre *P. redivivus* e *R. wohlgemuthi*. A espécie de nematóide *Dictyocaulus viviparus* demonstrou uma fraca capacidade de induzir a produção de armadilhas. Por outro lado, todos os outros nematóides induziram a formação de grandes quantidades de armadilhas e foram rapidamente capturados.

LARSEN e NANSEN, (1991) estudando a atividade de *Pleurotus pulmonarius* sobre estágios pré-parasitários de *O.ostertagi*, *Cooperia oncophora*, *Oesophagostomum quadrispinulatum* e *Cyathostoma* sp., observou intenso efeito paralisante do fungo sobre as larvas.

A atividade *in vitro* de um isolado de *Monacrosporium ellypsosporum* sobre larvas de *Haemonchus placei* foi avaliada por ARAÚJO *et al.* (1992b), que observou uma alta eficácia no controle das larvas infectantes.

MENDOZA-de-GIVES *et al.* (1992) observaram redução de 92,3% no número de larvas de *H. contortus* por *A. robusta* após sete dias de interação em placas de Petri contendo ágar extrato de milho.

ARAÚJO *et al.* (1993), em estudo *in vitro*, testando diferentes espécies de isolados fúngicos do gênero *Arthrobotrys* obtidos de solos brasileiros, obtiveram reduções significativas no número de larvas de *H. placei* em placas de Petri, contendo ágar-água, tratadas com mil conídios de cada isolado.

A capacidade predatória de isolados das espécies *A. conoides* e *A. oliigospora* sobre larvas infectantes de *H. contortus*, foi avaliada por MENDOZA-de-GIVES *et al.* (1994). O isolado de *A. oligospora* demonstrou efetividade predatória máxima de 35,87% sobre *H. contortus*, enquanto *A. conoides*, predou 93,7% das larvas.

ARAÚJO *et al.* (1994) avaliaram a atividade predatória de seis isolados de *A. musiformis*, isolados de solos de diferentes regiões do Brasil, observando

reduções no número de larvas de *H. placei* por todos os isolados e diferenças na eficácia entre os isolados.

BIRD e HERD (1995) avaliaram o efeito da adição de esporos de *A. oligospora* e *D. flagrans* a coproculturas de eqüinos, observando reduções de 95,8% e 93,9% no número de larvas de ciatostomíneos, respectivamente, quando foram adicionados 100 esporos por ovo.

Testes realizados por CHARLES *et al.* (1996), com o fungo endoparasito *Harposporium anguillulae*, demonstraram que a adição de 300.000 esporos do fungo por grama de fezes causou uma redução de 99,5% no número de larvas infectantes de *H. contortus* em coproculturas de ovinos.

ARAÚJO (1998) avaliou a atividade predatória *in vitro* de dois isolados de *Arthrobotrys robusta*, um isolado de *Arthrobotrys conoides* e um de *A. musiformis* sobre larvas infectantes de *Cooperia punctata*. Um dos isolados de *A. robusta* apresentou capacidade predatória superior aos outros isolados.

CHANDRAWATHANI *et al.* (1998) estudaram o potencial predatório de *A. oligospora* sobre larvas de *Strongyloides papillosus* em culturas de fezes de bovinos e observaram redução de 99,6% no número de larvas das culturas tratadas com 2000 conídios por grama de fezes.

Em trabalho avaliando a habilidade predatória *in vitro* de *A. robusta* e *Monacrosporium gehyropagum* sobre larvas de *S. papillosus*, GONZALEZ CRUZ *et al.* (1998), observaram que *M. gehyropagum* predou 93,1% das larvas, enquanto *A. robusta* predou somente 32,3% das larvas.

CASTRO *et al.* (1999) conduziram um ensaio experimental, avaliando a habilidade predatória de *M. thaumasium* sobre estágios pré-parasitários de ciatostomíneos de eqüinos. Mil conídios do isolado fúngico foram adicionados a coproculturas contendo 1250 ovos por grama de fezes. O número de larvas nas culturas de fezes tratadas foi 97% menor que nas culturas controle.

MOTA *et al.* (2000), avaliaram a eficácia predatória *in vitro* de um isolado de *A. robusta* e um de *M. thaumasium* sobre larvas infectantes de *H. contortus* de caprinos, observando que os dois isolados foram capazes de predação as larvas, entretanto o isolado de *Monacrosporium* mostrou-se mais eficiente.

SANTOS *et al.* (2001), relataram reduções acima de 90% no número de larvas de ciatostomíneos recuperadas de coproculturas de eqüinos tratadas com 500 esporos por grama de fezes.

Um isolado fúngico de *A. cladodes*, isolado de amostras de solo no Irã por ESLAMI *et al.* (2005) demonstrou atividade predatória sobre larvas de *H. contortus*. A eficácia predatória foi dependente da dose de conídios do fungo adicionada às culturas de fezes de ovinos. O percentual de redução do número larvas variou de 41,71%, observado nas coproculturas que se adicionaram  $1 \times 10^3$  conídios por grama de fezes a 94,96%, quando se adicionaram  $1 \times 10^5$  conídios por grama de fezes.

PARAUD *et al.* (2005) avaliaram a habilidade de *D. flagrans* em predar larvas de primeiro estágio de *Muellerius capillaris* de caprinos. Nas placas inoculadas com o fungo e L<sub>1</sub> de *M. capillaris* não foi observada a presença de armadilhas do fungo. Quando as L<sub>1</sub> foram semeadas em placas juntamente com larvas infectantes de *H. contortus* e *T. colubriformis* houve a formação de armadilhas, entretanto, as larvas de *Muellerius* não foram predadas, demonstrando a ineficácia do fungo sobre esta espécie de nematóide.

A utilização do controle biológico com fungos nematófagos baseia-se na redução de larvas infectantes na pastagem e, em conseqüência, o melhor local para ação destes microorganismos tem mostrado ser os bolos fecais eliminados, onde a grande maioria dos nematóides de importância para os animais de rebanho passa desde os estágios de ovo até a forma infectante, antes de migrar para a pastagem (LARSEN, 1999; MOTA, 2002).

A forma mais prática de utilização dos fungos predadores é a administração oral de material fúngico como micélio, conídios e clamidósporos. Após a passagem do material fúngico através do trato gastrintestinal, ocorre a colonização do bolo fecal e a predação e destruição das larvas infectantes dos nematóides. Entretanto alguns isolados fúngicos não resistem à passagem pelo trato gastrintestinal dos animais (LARSEN *et al.*, 1992) devido à destruição das suas estruturas fúngicas durante os processos digestivos (HASHMI e CONNAN, 1989).

Diversos trabalhos têm obtido resultados promissores no controle de nematóides parasitos de animais, através do fornecimento de clamidósporos e

conídios de diversas espécies de fungos (WALLER *et al.*, 1994; WOLSTRUP *et al.*, 1994; LARSEN *et al.*, 1995a; ARAÚJO *et al.*, 1998). WALLER *et al.* (1994) demonstraram que fragmentos de micélio de fungos dos gêneros *Arthrotrrys* e *Monacrosporium* foram incapazes de sobreviver à incubação em líquido ruminal a 39° C. Entretanto ARAÚJO *et al.* (1999), em teste *in vivo* avaliando isolados brasileiros dos mesmos gêneros isolou material fúngico das fezes dos animais tratados com micélio.

A passagem de diferentes estruturas fúngicas pelo trato gastrintestinal de diferentes espécies animais, tem sido alvo de diversos estudos realizados.

Um isolado de *A. oligospora* foi capaz de crescer e manter atividade predatória sobre larvas de nematóides após passagem pelo trato gastrintestinal de asininos (SOPRUNOV, 1958).

HASHMI e CONNAN (1989) relataram a passagem natural de *A. oligospora* pelo trato gastrintestinal bovinos em pastejo e que, a administração de dezesseis milhões de conídios de esporos do fungo, semanalmente, por três meses, resultaram na redução de 51% a 62% do número de larvas infectantes na pastagem.

PELLOILE (1991) observou redução no número de larvas em culturas de fezes de ovinos tratados com 500 g de material fúngico de *Duddingtonia flagrans* crescidos em semente de milho, em comparação com as culturas de ovinos não tratados.

LARSEN *et al.* (1992) realizaram um estudo para avaliar a sobrevivência e atividade predatória de isolados fúngicos das espécies *A. oligospora*, *A. superba* e *D. flagrans* cultivados em grãos de cevada após passagem pelo trato gastrintestinal de bovinos. Em bolos fecais de bovinos tratados separadamente com dois isolados *Arthrotrrys* e seis isolados de *D. flagrans*, foram observadas reduções no número de larvas infectantes entre de 61-93%, quando comparados com os bolos fecais de bovinos não tratados. Nas coproculturas de bovinos tratados com sete destes isolados, a redução do número de larvas recuperadas variou de 76-99%.

GRONVOLD *et al.* (1993) observaram redução de larvas infectantes de *O. ostertagi* no bolo fecal de bezerros, alimentando os animais com grãos de

cevada onde havia sido cultivado o fungo *D. flagrans*, porém quando se avaliou o fungo *A. oligospora*, não foram observadas reduções significativas.

WOLSTRUP *et al.* (1994), administraram por via oral um isolado de *D. flagrans* a bezerros infectados artificialmente com *O. ostertagi*, diariamente nos dois primeiros meses de pastejo. A pastagem utilizada pelos bezerros tratados com o fungo possuía menos larvas infectantes e o número de ovos por grama de fezes destes bezerros era menor.

WALLER *et al.* (1994), utilizando ovinos, observaram que *A. oligospora*, *A. oviformis* e *Geniculifera eudermata* foram capazes de passar pelo trato gastrointestinal dos animais, sem perder capacidade predatória sobre larvas infectantes de *H. contortus*.

LARSEN *et al.* (1995a) avaliaram a eficácia de um isolado de *D. flagrans* sobre ciatostomíneos em coproculturas, após a administração de diferentes concentrações de clamidósporos a eqüinos. Reduções significativas no número de larvas infectantes foram observadas nas coproculturas dos animais tratados com  $10^6$  e  $10^7$  por quilo de peso vivo.

Em outro estudo, LARSEN *et al.* (1995b), forneceram clamidósporos de *D. flagrans* em grãos de cevada, a bezerros nos dois primeiros meses de pastejo, e observaram redução no número de larvas infectantes de nematóides tricostrongilídeos na pastagem e no número de parasitos adquiridos do grupo tratado indicada pelos valores de pepsinogênio plasmático.

ARAÚJO *et al.* (1998) administraram dois milhões de conídios de um isolado de *A. robusta*, via oral, duas vezes por semana, durante quatro meses, a bezerros infectados com nematóides parasitos gastrintestinais de bovinos. No grupo tratado foi observada redução de 53,81% no OPG e 70,45% no número de vermes recuperados à necropsia dos animais traçadores.

ARAÚJO *et al.* (1996) testaram a capacidade de dois isolados fúngicos da espécie *A. musiformis* e um da espécie *A. robusta*, de passar pelo trato gastrointestinal de bezerros e manter atividade predatória sobre larvas de *H. placei*. Após administrar aos animais  $20 \times 10^6$  de conídios de cada isolado, divididos em quatro doses, com intervalos de 3 h entre as aplicações, somente no grupo tratado com *A. robusta* obteve-se o isolamento do fungo, quando foi observada a predação de larvas infectantes de *H. placei*.

O fornecimento diário de clamidósporos do fungo *D. flagrans* produzidos em grãos de cevada, por quatro meses, a ovinos criados extensivamente resultou em redução da carga parasitária de *Nematodirus spathiger*, *N. battus*, *Ostertagia* spp. e *Trichostrongylus* spp. (GITHIGIA *et al.*, 1997).

MENDOZA-de-GIVES *et al.* (1998), observaram redução de 88% no número de larvas infectantes de *H. contortus* em coproculturas de ovinos após administração oral de 11.350.000 clamidósporos de *D. flagrans*.

FERNANDEZ *et al.* (1999), avaliaram a eficácia de  $10^6$  e  $5 \times 10^5$  clamidósporos de um isolado de *D. flagrans* sobre *O. ostertagi* de bezerras em pastagens com diferentes taxas de lotação. Os resultados demonstraram que, com altas taxas de lotação, houve uma menor recuperação de larvas das pastagens dos grupos tratados em relação ao grupo controle, independente da dose de clamidósporos administrada. Na pastagem submetida a uma baixa taxa de lotação, não foi possível detectar efeito relacionado à dose administrada.

KNOX e FAEDO (2001) realizaram um experimento para determinar os efeitos do fornecimento de *D. flagrans* crescidos em grãos de cevada a ovinos da raça Merino e observaram redução significativa na contagem do número de ovos por grama de fezes (OPG), entretanto não houve diferenças estatisticamente significativas no número de vermes recuperados nas necropsias dos animais dos grupos tratados e controle.

CHANDRAWATANI *et al.* (2002) testaram um isolado fúngico de *D. flagrans* isolado de amostras de fezes frescas de ovinos na Malásia. Após administrarem  $9 \times 10^6$  clamidósporos de *D. flagrans* por animal por dia, foram observadas reduções de até 90% no número de larvas infectantes em coproculturas onde predominavam larvas de *H. contortus*.

PEÑA *et al.* (2002) observaram reduções de 76,6% a 100% no número de larvas de *H. contortus* em fezes de ovinos após o fornecimento de dosagens variando de  $2,5 \times 10^4$  a  $5 \times 10^5$  clamidósporos por animal.

MELO *et al.* (2003) observaram redução de 79,24% no número de larvas de *H. contortus* recuperadas de coproculturas de caprinos estabelecidos, 24 horas após a administração de  $9 \times 10^6$  conídios de *M. thaumasium* divididos em três administrações com intervalos de uma hora.

Em experimento realizado na Zona da Mata de Minas Gerais, ARAÚJO *et al.* (2004b), testaram em bezerros criados extensivamente, a eficácia de uma formulação peletizada em alginato de sódio de *M. thaumasium* e da formulação associada a tratamentos anti-helmínticos, observando não haver diferenças no OPG de animais tratados somente com a formulação contendo o fungo e daqueles tratados com a associação de anti-helmíntico e formulação fúngica, concluindo que nas condições avaliadas, a utilização da formulação tornou os tratamentos anti-helmínticos desnecessários.

Em outro experimento, na mesma região, reduções de 88,8% no OPG e maior ganho de peso foram observados por ALVES *et al.* (2003) em bovinos tratados com a formulação.

O desenvolvimento de processos de produção de fungos nematófagos é um dos passos necessários para o emprego desta forma de controle tornar-se uma realidade prática no controle integrado de nematóides parasitos, porém, dificuldades técnicas no cultivo de alguns fungos nematófagos, têm prejudicado as pesquisas sobre as potencialidades destes microorganismos (VAN GUNDY, 1985).

Em grande parte dos estudos desenvolvidos até o momento, conídios e clamidósporos são produzidos em cultivos do fungo em substratos sólidos como grãos e farelos de cereais, bagaço de cana, casca de café e esterco bovino (DIAS e FERRAZ, 1993; MACHADO e CAMPOS, 1997). Estes sistemas apresentam limitações como alterações bioquímicas sofridas pelos grãos ao longo do ano, problemas com contaminação e longo período de incubação, o que os torna muitas vezes inviáveis comercialmente e difíceis de adaptar a produção em escala industrial. PAPAIVIZAS *et al.* (1984), consideraram a produção de massa fúngica em meios líquidos como a melhor forma de se produzir micélio e conídios de organismos para o controle biológico. WALLER (1996b) sugeriu que esta forma de produção poderia facilitar a formulação e administração desses microorganismos, se adaptando melhor aos sistemas de produção em larga escala. Até o momento a produção de fungos predadores de nematóides em meios líquidos foi pouco estudada.

Um dos grandes desafios na implementação dos fungos nematófagos em programas de controle biológico é o desenvolvimento de formulações fúngicas economicamente viáveis e de fácil aplicação.

Algumas preparações comerciais de fungos predadores foram desenvolvidas e empregadas no controle de fitonematóides, entretanto, por problemas de controle de qualidade e baixa eficácia, foram pouco utilizadas. Os produtos Royal 300<sup>®</sup> e Royal 350<sup>®</sup> foram desenvolvidos na França (CAYROL *et al.*, 1978; CAYROL e FRANKOWSKI, 1979) para o controle de fitonematóides. CAMPOS (1992) relata que diversas espécies de fitonematóides foram eficientemente controladas com formulação a base do fungo *Paecilomyces lilacinus* com nome comercial de Bioact<sup>®</sup>. Uma alternativa para veiculação de fungos tem sido o alginato de sódio (WALKER e CONNICK, 1983; FRAVEL *et al.*, 1985; SALGADO e CAMPOS, 1993; MELO e SANHUEZA, 1995; ARAÚJO *et al.*, 1999; CAMPOS, 2002). Segundo LEWIS e PAPAVIDAS (1987), esta tecnologia seria apropriada para veiculação de agentes de biocontrole, reduzindo a população do patógeno e estimulando a proliferação do antagonista.

No Brasil esta formulação tem obtido bons resultados em condições laboratoriais e a campo (ALVES *et al.*, 2003; ARAÚJO *et al.*, 2004b).

Com esta formulação foi observada sobrevivência dos fungos nos péletes à temperatura de 4 °C por até 40 meses, e à temperatura ambiente por aproximadamente 4 meses (STIRLING e MANI, 1995), o que torna esta formulação bastante promissora.

Em estudos com massa micelial de *A. robusta* encapsulada em alginato de sódio e fornecida oralmente a bezerros estabulados ARAÚJO *et al.* (2000) obtiveram reduções significativas de larvas infectantes de nematóides tricostrongilídeos.

A administração de material fúngico incorporado em suplementos minerais tem sido estudada na Austrália. Estas formulações contendo clamidósporos do fungo *D. flagrans* têm obtido resultados promissores (WALLER e FAEDO, 1996).

A utilização de dispositivos intra-ruminais para liberação controlada de clamidósporos de *D. flagrans*, por períodos prolongados têm sido testada.

WALLER *et al.* (2001b) observaram esporos viáveis em fezes de ovinos que receberam um dispositivo com este mecanismo.

Os estudos em controle biológico têm como meta, encontrar um isolado de fungo capaz de sobreviver à passagem pelo trato gastrintestinal, colonizar o bolo fecal e agir de forma eficaz sobre as larvas infectantes, ser fácil de produzir em larga escala, possuir capacidade de sobreviver ao período de armazenamento e não causar efeitos deletérios sobre o ecossistema onde está sendo aplicado (GOMES, 1998).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

- Estudar a utilização de isolados brasileiros de fungos nematófagos no controle biológico de nematóides parasitos gastrintestinais de ruminantes, analisando aspectos inerentes à interação fungo-nematóide, e eficácia em testes com animais estabulados e a campo.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a atividade predatória *in vitro* de isolados brasileiros de fungos nematófagos dos gêneros *Arthrobotrys*, *Duddingtonia*, *Monacrosporium* e *Nematoctonus* sobre larvas infectantes de *Strongyloides papillosus*.
- Estudar os processos de interação de fungo predador da espécie *Duddingtonia flagrans* e larvas infectantes de *Haemonchus contortus*, através de microscopia eletrônica de varredura procurando evidenciar os processos envolvidos na adesão, penetração e destruição dos nematóides dos gêneros *Haemonchus contortus*.
- Comparar a eficácia predatória do fungo *Duddingtonia flagrans* sobre L3 de *Haemonchus contortus* e *Strongyloides papillosus* de caprinos, após a passagem de micélio, conídios, e clamidósporos desta espécie pelo trato gastrintestinal de caprinos estabulados.
- Testar formulação do fungo *Monacrosporium sinense* em péletes de alginato de sódio no controle a campo de nematóides parasitos gastrintestinais de bovinos.

#### 4. CAPÍTULO 1

---

**Atividade predatória *in vitro* dos fungos nematófagos *Arthrobotrys*, *Duddingtonia Monacrosporium* e *Nematoctonus* spp sobre larvas infectantes de *Strongyloides papillosus*.**

---

#### 4.1. RESUMO

Experimento “*in vitro*” foi realizado para avaliar a atividade predatória de isolados fúngicos das espécies *Arthrobotrys conoides*, *A. cladodes*, *A. musiformis*, *A. oligospora*, *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium appendiculatum*, *M. sinense*, *M. thaumasium* e *Nematoctonus robustus* sobre larvas infectantes de *Strongyloides papillosus*. Uma suspensão de 1000 larvas infectantes de *Strongyloides* foi gotejada sobre placas de Petri contendo os fungos crescidos em superfície de ágar-água. Houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre todos os isolados e o grupo controle. Os resultados demonstraram que pode haver variações na capacidade predatória de diferentes espécies e entre isolados fúngicos de uma mesma espécie sobre *S. papillosus* e indicam que o controle biológico utilizando fungos nematófagos é um método possível de controle de *S. papillosus*.

## 4.2. ABSTRACT

An *in vitro* experiment was carried out to assess the predatory activity of fungus isolates of the species *Arthrobotrys cladodes*, *A. conoides*, *A. musiformis*, *A. oligospora*, *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium appendiculatum*, *M. sinense*, *M. thaumasium* and *Nematoctonus robustus* on infecting *Strongyloides papillosus* larvae. Suspensions of 1000 infecting *Strongyloides papillosus* larvae were transferred to Petri dishes where a colony of nematophagous fungi was previously grown. There was a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) among all the isolates and the control group. The results showed that there are variations in the predatory capacity of different species and among fungi isolates of the same species on *Strongyloides papillosus* and indicated that biological control using nematophagous fungi may be a useful control method for *Strongyloides papillosus*.

### 4.3. INTRODUÇÃO

Os nematóides da espécie *Strongyloides papillosus* são importantes parasitos gastrintestinais de ruminantes, principalmente em regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo capazes de desenvolver ciclos reprodutivos tanto parasitários quanto de vida livre. A fase parasitária é composta exclusivamente por fêmeas que produzem ovos larvados por partenogênese. Em condições de alta umidade e temperatura este nematóide pode se multiplicar intensamente no ambiente (CHANDRAWATHANI *et al.*, 1998; URQUHART *et al.*, 1996).

As infecções por este parasito podem levar ao desenvolvimento de diarreia, perda de apetite, retardo no crescimento e em alguns casos morte súbita (TAIRA *et al.*, 1992; PIENNAR *et al.*, 1999).

Uma das formas alternativas amplamente pesquisadas no controle das verminoses de ruminantes tem sido o controle biológico através de fungos nematófagos. Apesar do grande número de estudos de controle biológico de nematóides parasitos gastrintestinais, pouco é conhecido sobre a atividade destes fungos sobre *Strongyloides papillosus*.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade predatória *in vitro* de isolados brasileiros de fungos nematófagos dos gêneros *Arthrobotrys*, *Duddingtonia*, *Monacrosporium* e *Nematoctonus* sobre estágios de vida livre de *Strongyloides papillosus*.

## 4.4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.4.1. Isolados fúngicos

Dezessete isolados fúngicos dos gêneros *Arthrobotrys*, *Duddingtonia*, *Monacrosporium* e *Nematoctonus* (Tabela 1) foram mantidos em tubos de cultivo contendo Corn Meal Agar (CMA) 2%, em refrigerador a quatro °C e em ausência de luz. Esses fungos foram isolados de amostras de solos e bolos fecais de ruminantes de diferentes regiões do Brasil.

**Tabela 1** – Espécies e origem dos isolados utilizados nos testes de predação *in vitro* das larvas de *Strongyloides papillosus*

FUNGO	ISOLADO	FONTE
<i>Arthrobotrys conoides</i>	I40	Solo
<i>A. cladodes</i>	CG719	Desconhecida
<i>A. oligospora</i>	C1	Fezes bovinas
	C2	Desconhecida
<i>A. musiformis</i>	A1	Fezes Bovinas
	A2	Fezes Bovinas
	A3	Fezes Bovinas
<i>A. robusta</i>	I31	Solo
	B1	Fezes bovinas
<i>Duddingtonia flagrans</i>	CG722	Fezes caprinas
	CG768	Fezes caprinas
<i>Monacrosporium sinense</i>	SF53	Solo
	SF139	Solo
<i>M. thaumasium</i>	NF34A	Solo
<i>M. appendiculatum</i>	CGI	Solo
<i>Nematoctonus robustus</i>	D1	Fezes bovinas
<i>Arthrobotrys</i> sp.	D2	Fezes bovinas

#### 4.4.2. Obtenção de larvas infectantes de *Strongyloides papillosus*

Fezes de um caprino Saanem macho com 8 meses de idade foram coletadas com auxílio de uma bolsa coletora de saco de algodão. Coproculturas com 20 g de fezes foram confeccionadas em copos plásticos através da mistura de vermiculita com fezes na proporção de 2:1 e água destilada. Após a homogeneização do material, as coproculturas foram incubadas em incubadora a 25 °C por cinco dias. As larvas infectantes foram recuperadas através do método de Baermann. Para eliminação de sujidades e recuperação das larvas ativas, estas foram submetidas a processo de filtração utilizando-se metodologia descrita por BARÇANTE *et al.* (2003). Após o processo de filtração as larvas foram incubadas em solução 0,05% de estreptomicina por 10 min para eliminação de contaminantes.

#### 4.4.3. Procedimento experimental

Os ensaios de predação foram realizados em superfície de placas de Petri com 5 cm de diâmetro preenchidas com ágar-água (AA) 2%. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com dezoito tratamentos (17 isolados e controle) e cinco repetições.

Discos de cultura dos isolados fúngicos foram retirados dos tubos de cultivo e repicados para placas de Petri com 9 cm de diâmetro, contendo 20 mL de meio CMA acrescido de gentamicina 0,05%. As placas foram incubadas em estufa BOD a 25 °C, em ausência de luz. Após sete dias, das bordas das colônias crescidas livres de contaminação, discos de aproximadamente 4 mm de diâmetro foram repicados para placas de Petri com 6 cm de diâmetro contendo ágar-água 2%. Estas placas foram mantidas em estufa BOD por cinco dias a 25 °C e em ausência de luz. No quinto dia de incubação, 50 µL de uma suspensão contendo aproximadamente mil larvas de *Strongyloides papillosus* foram gotejados sobre a superfície do ágar. O grupo controle foi constituído por placas de Petri contendo ágar-água sem fungo, onde não foi adicionado material fúngico. No quinto dia de incubação, as placas foram retiradas da estufa, sendo o ágar retirado das placas com auxílio de uma espátula metálica e submetido ao método de Baermann por 6 h para

recuperação das larvas livres. Para contagem das larvas o conteúdo dos tubos foi igualado para 3 mL e o número de larvas estimado em cinco alíquotas de 50  $\mu$ L extrapolando-se para o volume dos tubos. A taxa de predação foi estimada comparando-se a média do número de larvas recuperadas nos grupos controle e tratado utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ redução} = \frac{X_T - X_C}{X_C}$$

Onde:  $X_C$ = média de larvas recuperadas no grupo controle;

$X_T$ =média do número de larvas recuperadas no grupo tratado.

#### 4.4.4. Análise estatística

Para análise de variância, os dados foram transformados em  $\sqrt{(X+1)}$  e as médias comparadas utilizando o teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade, aplicando o Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG).

#### 4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os isolados utilizados neste experimento cresceram e colonizaram a superfície do ágar, entretanto pôde ser observado que alguns isolados demonstraram crescimento menos agressivo pela demora para atingir as bordas das placas de Petri.

Das espécies avaliadas, somente o isolado de *N. robustus* (D1) produziu armadilhas espontaneamente. Estruturas de predação do tipo redes adesivas foram observadas nas placas de todos os outros isolados testados, 24 h após a adição dos nematóides às placas.

A formação de armadilhas nos fungos nematófagos pode ocorrer em resposta a diversos fatores, tais como, presença de nematóides ou de substâncias por eles liberadas, condições adversas de cultivo e escassez de água e ou nutrientes (PRAMER, 1964; BALAN e GERBER, 1972; JANSSON e NORDBRIG-HERTZ, 1980) ou mesmo espontaneamente. MENDOZA-de-GIVES *et al.*, (1994) sugerem que a produção espontânea de armadilhas poderia ser vantajosa quanto à eficácia predatória do isolado. STIRLING, (1991) relata que fungos produtores de nódulos adesivos produzem espontaneamente as armadilhas que associadas a uma habilidade saprofítica reduzida resultaria em maior eficácia predatória. De fato, no presente experimento, o isolado de *Nematoctonus robustus* apresentou eficácia predatória superior a alguns outros isolados que não produziram estas estruturas na ausência de estímulo pelas larvas de *S. papillosus*.

O número médio de larvas recuperadas por placa e os respectivos percentuais de redução para cada isolado são demonstrados na Tabela 2.

Após sete dias de interação entre *S. papillosus* e os isolados, diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no número médio de larvas recuperadas por placa foi observada em todos os tratamentos em relação ao controle e entre os isolados.

**Tabela 2** - Valores médios transformados em  $\sqrt{(X+1)}$  do número de larvas de *Strongyloides papillosus* recuperadas por placa (n=5) e percentuais de redução após sete dias de interação com diferentes isolados de fungos nematófagos

ISOLADO	MÉDIA DE LARVAS POR PLACA	% REDUÇÃO
Controle	30,89 (957,6) a	-
C2	18,16 (331,2) b	65,41
D2	14,69 (217,2) bc	77,32
SF139	13,92 (198,0) cd	79,32
A3	13,92 (132,0) cd	86,22
I31	11,41 (112,8) de	88,22
CG768	10,41 (43,2) ef	95,49
C1	6,46 (12,0) fg	98,75
CG722	2,84 (12,0) fg	98,75
SF53	2,81 (9,6) fg	99,00
A1	2,81 (9,6) fg	99,00
E1	2,60 (7,2) fg	99,25
CG719	2,36 (4,8) g	99,50
I40	2,32 (0,0) g	100,00
A2	1,00 (0,0) g	100,00
B1	1,00 (0,0) g	100,00
D1	1,00 (0,0) g	100,00
NF34A	1,00 (0,0) g	100,00
CV (%)	26,00	

As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

( ) Valores médios do número de larvas de *Strongyloides papillosus* recuperados por placa.

Existem poucas informações sobre a atividade de fungos nematófagos sobre *Strongyloides papillosus*. Roubaud e Deschiens, (1941) *apud* GONZALEZ-CRUZ *et al.* (1998), observaram reduções no número de larvas de *S. papillosus* em ovinos que pastavam em piquete tratado com esporos de *A. oligospora*, *Dactylella bembicoides* e *Dactylaria ellipsospora*. GONZALEZ-CRUZ *et al.* (1998) compararam a atividade predatória de *A. robusta* e *M. gelyropagum* sobre *S. papillosus* observando 93,1% de redução no número de larvas por *M. gelyropagum* e 32,3% por *A. robusta*. CHANDRAWATHANI *et al.*, 1998 estudaram o efeito da adição de esporos de *A. oligospora* sobre o

desenvolvimento de larvas de *S. papillosus* em coproculturas. Na concentração de 2000 conídios por grama de fezes foram observadas reduções de 99% no número de larvas recuperadas em relação ao grupo controle.

A atividade predatória de alguns dos isolados aqui testados, já foi avaliada em prévios experimentos *in vitro*. Em um estudo realizado por MOTA *et al.* (2000) os isolados NF34A e I31 apresentaram percentuais de redução de 91,90% e 67,96% no número de larvas infectantes de *H. contortus* recuperadas de placas de AA, após vinte dias de interação. RODRIGUES *et al.* (2001) avaliaram a atividade predatória dos isolados I31, I40 e NF34A sobre larvas infectantes de ciatostomídeos de eqüinos. Após sete dias, o isolado NF34A demonstrou maior virulência, capturando 99% das larvas, em comparação com I31 (79,3%) e I40 (77%). Em um estudo *in vitro* ARAÚJO *et al.* (2004c) observaram reduções significativas no número de larvas de *Cooperia* sp. e *Haemonchus* sp. quando tratados com conídios dos isolados I31, NF34A e clamidósporo do isolado CG768. Os isolados SF53, SF139 e CGI demonstraram grande eficácia predatória sobre o nematóide de vida livre *Panagrellus* sp., o fitonematóide *Meloydogyne incognita* e os nematóides gastrintestinais de bovinos *Cooperia punctata* e *Haemonchus placei* em experimento *in vitro* (GOMES *et al.*, 1999).

No presente trabalho, diferenças estatisticamente significativas foram observadas na capacidade predatória de isolados de mesma espécie, evidenciada pelo número de larvas recuperadas das placas com os isolados I31 e B1 de *A. robusta*, SF53 e SF139 de *M. sinense*, A1 e A3 de *A. musiformis* e C1 e C2 de *A. oligospora*.

Diferenças inter e intra-específicas na atividade predatória de fungos nematófagos são comuns e já foram observadas em experimentos com outros isolados fúngicos (NAVES e CAMPOS, 1991; ARAÚJO *et al.*, 1993, 1994).

As variações aqui observadas podem ter ocorrido em consequência de diversos fatores. Segundo MENDOZA-de-GIVES *et al.* (1999) a composição da cutícula dos nematóides pode ser um fator determinante na habilidade do fungo em preda os nematóides e, variações antigênicas podem estar presentes em diferentes espécies de nematóides ou diferentes isolados de mesma espécie

dos fungos, o que poderia resultar em variações na atividade predatória do fungo.

A manutenção de isolados em condições laboratoriais pode levar à perda de patogenicidade e outras características dos fungos nematófagos. Estas alterações podem ocorrer rapidamente e, em poucas gerações, os isolados mantidos em laboratório podem apresentar pouca semelhança com o isolado original (VAN OORSCHOT, 1985; FAEDO *et al.*, 1997). Vários isolados avaliados no presente experimento vêm sendo conservados em laboratório há vários anos, o que pode ter levado a alterações deletérias resultando em diminuição de suas eficácias predatórias.

Nos estudos *in vitro* os fungos não são expostos aos fatores adversos encontrados no ambiente (competição com outros organismos e variações de pH e temperatura), o que poderia resultar em insucesso quando estes são utilizados em experimentos *in vivo* e a campo. Assim, estudos avaliando a utilização dos fungos aqui testados em experimentos a campo são necessários para permitir a aplicação destes isolados em programas de controle biológico.

## 5. CAPÍTULO 2

---

**Interação entre o fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* e  
larvas infectantes de *Haemonchus contortus* (Nematoda:  
Trichostrongyloidea)**

---

## 5.1. RESUMO

A interação entre o fungo *Duddingtonia flagrans* e larvas infectantes de *Haemonchus contortus* foi estudada *in vitro* através de microscopia óptica e eletrônica de varredura. A formação de armadilhas pelo fungo ocorreu 9 h e as primeiras larvas predadas foram observadas 11 h após a inoculação das larvas sobre as colônias crescidas em superfície de membrana de diálise. Elétron-micrografias de varredura foram realizadas 12, 24, 36 e 48 h após a predação das larvas pelo fungo. Detalhes das estruturas de predação e da interação fungo-larva são descritos. Pôde ser visualizada a presença de substância mucilaginosa nos pontos de aderência da armadilha à cutícula do nematóide. A presença de bactérias foi observada em alguns pontos de interação entre o fungo e a cutícula das larvas. A penetração da cutícula pelas hifas do fungo foi evidenciada somente após 48 h de predação.

## 5.2. ABSTRACT

The interaction between the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* and infective larvae of *Haemonchus contortus* was studied *in vitro* by optical and scanning electron microscopy. The trap formation for the fungus happened 9 hours and the first larvae trapped were observed 11 h after the inoculation of the larvae on the colonies grown in surface of dialysis membrane. Scanning electron micrographs were done 12, 24, 36 and 48 hours after the entrapment. Details of the traps morphogenesis and of the fungi-larvae interaction are described. The presence of mucilaginous substance could be visualized in the points of adherence of the traps to the cuticle of the infective larvae. The occurrence of bacteria was observed in some interaction points between the fungus and the cuticle of the larvae. Some infective larvae stayed alive for up 24 h after entrapment. The penetration of the cuticle by the fungal hyphae was only evidenced after 48 h of the capture.

### 5.3. INTRODUÇÃO

A utilização do fungo *Duddingtonia flagrans* no controle biológico dos nematóides gastrintestinais parasitos de ruminantes têm sido intensamente estudada nos últimos anos. Este fungo produz armadilhas do tipo redes adesivas tridimensionais que capturam e destroem as fases pré-parasitárias de várias espécies de nematóides (LARSEN, 2000).

Apesar do grande número de estudos realizados, existem poucas informações sobre os aspectos ultraestruturais da interação entre esta espécie fúngica e larvas infectantes de nematóides parasitos gastrintestinais de ruminantes.

A caracterização dos processos de interação fungo-nematóide é de grande importância, podendo influenciar na seleção de isolados para utilização em programas de controle biológico (MENDOZA-de-GIVES, 1999).

O objetivo deste trabalho foi estudar os processos de interação do fungo predador de nematóides *D. flagrans* e larvas infectantes de *Haemonchus contortus* através da microscopia eletrônica de varredura.

## 5.4. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.4.1. Obtenção de Larvas infectantes de *Haemonchus contortus*

Fezes de caprinos infectados com *Haemonchus contortus* foram coletadas com auxílio de bolsa coletora confeccionada com sacos de algodão. Amostras fecais de 20 g cada foram misturadas com 8 g de vermiculita e 20 mL de água destilada e incubadas por 8 dias a 25 °C e em ausência de luz. As larvas foram recuperadas das culturas, em tubos de hemólise, através do funil de Baermann, com água inicialmente a 42 °C, por 12 horas.

Para eliminação de sujidades e recuperação das larvas ativas, estas foram submetidas a processo de filtração utilizando-se metodologia descrita por BARÇANTE *et al.* (2003). As larvas foram então lavadas com água destilada estéril por cinco vezes em centrífuga a 1000 rpm, por 5 minutos, desprezando ao final de cada centrifugação o sobrenadante. As larvas foram ressuspensas e estocadas a 4 °C, em solução contendo 0,05% de cloranfenicol e 0,05% de sulfato de estreptomicina segundo metodologia de ARAÚJO, (1996). Para estimativa do número total de larvas obtidas, cinco alíquotas de 20 µL de larvas foram contadas e o valor de larvas total da suspensão estimado.

### 5.4.2. Microscopia eletrônica de varredura

Na preparação do material para observação da interação ao microscópio eletrônico de varredura, foi utilizada a técnica proposta por NORDBRINGHERTZ, (1983) com modificações.

Discos de membrana de diálise (SIGMA®) com 6 cm de diâmetro foram cortados e colocados em frascos Erlenmeyer contendo água destilada. O material foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 min. Estes discos foram então retirados dos Erlenmeyer com auxílio de uma pinça e colocados sobre a superfície de ágar-água 2% contido em placas de Petri (6 cm de diâmetro) de forma que as margens da membrana cobrissem toda a superfície do ágar e as bordas ficassem elevadas e aderidas à margem de vidro das placas para evitar a passagem das larvas para a parte de baixo da membrana.

Fragments de CMA 1,7% (Corn Meal Agar, DIFCO®) contendo micélio e esporos do isolado fúngico de *D. flagrans* CG722 foram retirados de tubos de

cultivo e repicados para três placas de Petri com 9 cm de diâmetro contendo 20 mL de meio CMA acrescido de gentamicina 0,5%. As placas foram incubadas em BOD, a 25 °C e em ausência de luz. Após sete dias, das bordas das colônias crescidas livres de contaminação, fragmentos de aproximadamente 4 mm de diâmetro, foram repicados para a superfície das membranas de diálise (NORDBRING-HERTZ, 1983). As placas de Petri foram incubadas em BOD a 25 °C, em ausência de luz.

Após sete dias de incubação, as placas foram retiradas da incubadora e, suspensões contendo aproximadamente 2000 larvas infectantes de *Haemonchus contortus*, foram gotejadas sobre as culturas de *Duddingtonia flagrans* crescidas sobre a superfície das membranas de diálise. Cinco placas contendo ágar-água sem fungo, em que foram adicionados os mesmo números de larvas, foram utilizadas como controle da viabilidade das larvas.

Nas primeiras 12 h após a inoculação dos nematóides nas placas, as culturas contidas nas placas foram observadas de hora em hora em microscópio óptico (campo claro) em aumento de 100x. Após a observação de nematóides predados em uma determinada área da placa, para possibilitar a marcação do tempo de interação fungo-larva e facilitar o encontro das áreas com nematóides predados, marcas foram feitas na parte de baixo das placas com marcador permanente e as placas foram numeradas. Após a predação, observações foram feitas ao microscópio óptico em aumento de 100x, em intervalos de 6 h.

Retalhos de membrana de diálise com amostras de L<sub>3</sub> expostas à captura por 12, 24, 36, 48 h, foram cortados com uma lâmina de bisturi, coletados com pinça de ponta fina e fixados em glutaraldeído a 2,5% em 0,05 M de tampão fosfato, pH 7,4 por 24h, lavadas seis vezes no mesmo tampão e desidratadas através da passagem do material em série de etanol (30, 50, 60, 70, 95 e 100%). O material foi seco em secador de ponto crítico BALZERS® utilizando dióxido de carbono, recoberto com ouro em metalizador e elétrôn-micrografados em microscópio eletrônico de varredura LEO a 10-15 kV, no Núcleo de Microscopia Eletrônica e Microanálises, localizado na Universidade Federal de Viçosa.

## 5.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nove horas após a adição dos nematóides às placas, foram observadas ramificações a partir das hifas, evidenciando a diferenciação das estruturas de predação. Inicialmente, estas estruturas se concentravam nas áreas de maior concentração de nematóides e, posteriormente, se distribuíram por toda a superfície da membrana. A morfologia das estruturas de predação modificou-se gradualmente e, com 24 h, grande parte delas apresentavam o formato de rede tridimensional (Figura 2 A, B, C e D).

O tempo necessário para formação das armadilhas, após a adição de nematóides às placas, observado no presente experimento difere dos resultados obtidos por NANSEN *et al.* (1986) que observaram a presença de armadilhas 3-6 horas após adição de cento e cinquenta larvas (L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> e L<sub>3</sub>) de *Cooperia oncophora* na superfície de placas de Petri com 3,2 cm de diâmetro contendo *Arthrobotrys oligospora* crescido na superfície de CMA. Por outro lado, fatores tais como, o tipo de meio, espécie de fungo e nematóides utilizados dificultam as comparações.

Nos fungos predadores, a transição da fase saprofítica de crescimento para a fase parasitária, quando as armadilhas são formadas, é influenciada por fatores bióticos e abióticos. Em presença de nematóides, o micélio é induzido a formar as estruturas que eventualmente capturam os nematóides (NORDBRING-HERTZ, 1988).

As primeiras larvas predadas foram observadas 11 h após a adição das larvas às placas. Foram observadas larvas aderidas à superfície das estruturas de predação (Figura 2 E e F). Os pontos de aprisionamento das larvas variaram, não havendo áreas específicas na cutícula para aderência das armadilhas sendo que, em alguns casos, algumas larvas se apresentavam capturadas por várias estruturas de predação em regiões diferentes da superfície da cutícula (Figura 3 A). A presença de substância adesiva pôde ser evidenciada nas áreas de contato entre as armadilhas e a cutícula do nematóide (Figuras 2 E e 3 C).

Algumas larvas, mesmo após predadas, quando eram expostas à luz durante a observação no microscópio óptico, voltavam a se movimentar. Larvas

vivas foram observadas até 24 horas após a predação, sendo que, entre as larvas predadas por 36 h este fato não foi evidenciado em nenhuma das placas.

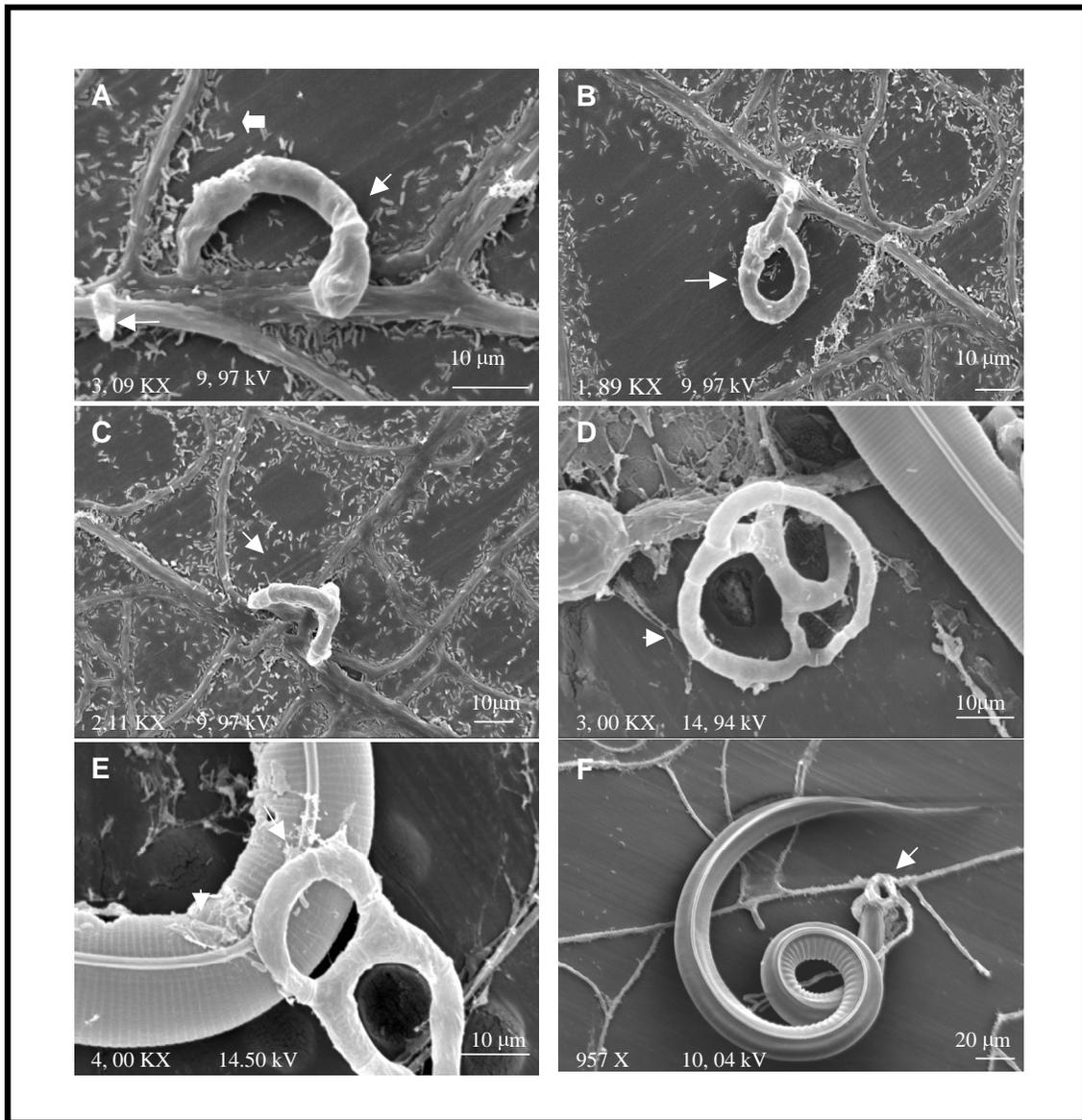
Estes resultados são semelhantes aos de NANSEN *et al.*, 1986, que observaram que larvas de *Cooperia oncophora* apresentavam grande motilidade, 20 horas após serem predadas por *A. oligospora*.

A predação das larvas por fungos nematófagos envolve vários passos. A adesão entre o nematóide e o fungo inicia-se como contato entre a superfície da cutícula da larva e superfície das armadilhas. Após a captura, as hifas penetram a cutícula, colonizam o interior do corpo e emergem novamente na superfície da cutícula do nematóide, produzindo esporos e ramos miceliais (BARRON, 1977).

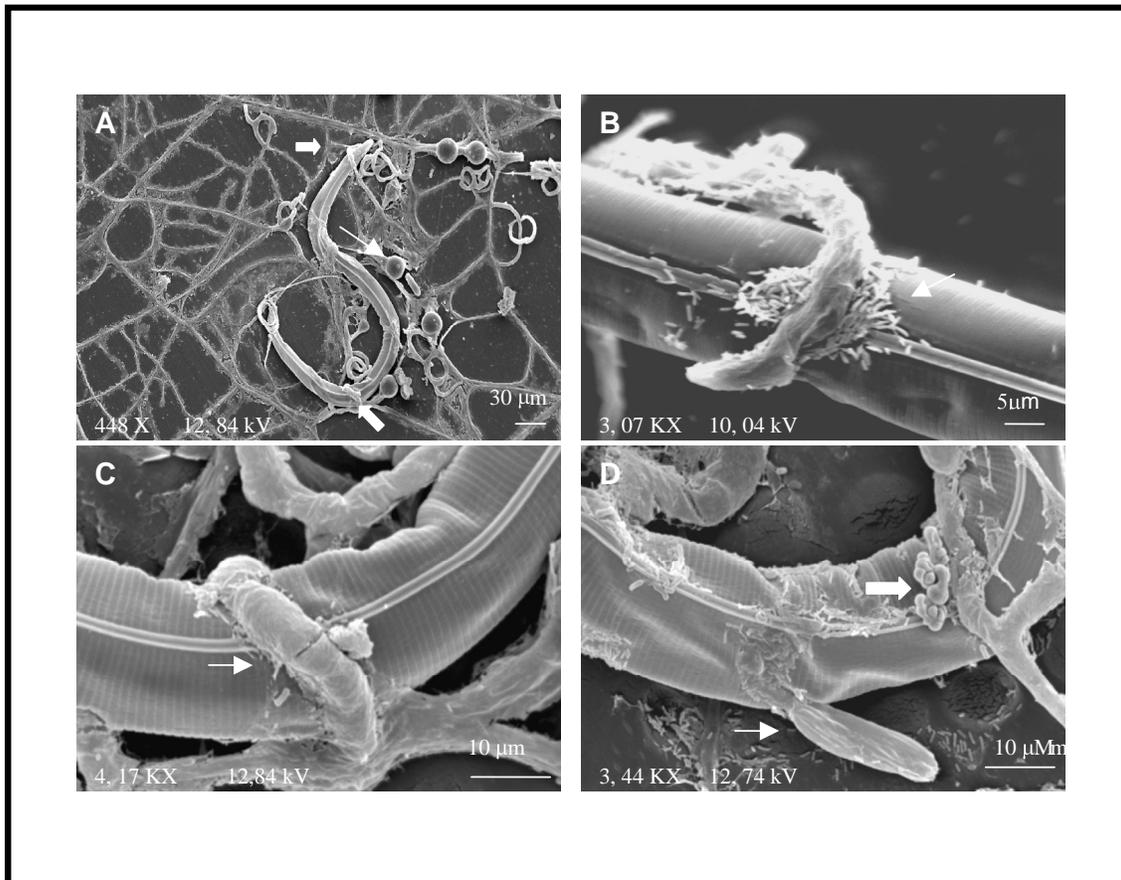
No presente trabalho, somente nas observações realizadas com a interação fungo-larva por 48 h, pôde ser evidenciada a invasão da cutícula da larva pelo fungo (Figura 3 D), o que indica que, possivelmente, este fato ocorreu no intervalo entre 36-48 h de interação.

Todavia, nas observações ao microscópio óptico não foram observadas larvas se movimentando após 24 h de interação, o que poderia indicar que as larvas podem ter sido penetradas pelas hifas no intervalo entre 24 e 36 h. Cabe ressaltar que, nas placas controle, as larvas apresentaram-se vivas e com movimentação vigorosa durante todo o período de avaliação.

VEENHUIS *et al.* (1985) relatam que a penetração de nematóides pelas hifas do fungo *A. oligospora* ocorrem com 2-4 h após a captura. Entretanto, suas observações se basearam na ação do fungo sobre *Panagrellus redivivus* e, estes nematóides não são recobertos pela cutícula externa oriunda das larvas de segundo estágio, presente nas larvas infectantes de *H. contortus*, o que poderia explicar o maior tempo para a penetração das larvas no presente estudo. Estudos ultraestruturais de microscopia eletrônica de transmissão poderiam esclarecer a fase de penetração da larva pelas hifas do fungo.



**Figura 2** - Elétron-micrografias de varredura do processo de formação de armadilhas e da interação do fungo *Duddingtonia flagrans* com larvas infectantes (L3) de *Haemonchus contortus* em superfície de membrana de diálise. A) (↑) ramos emitidos a partir das hifas evidenciando a fase inicial de formação de armadilha do fungo, (♣) células de bactéria do tipo bastonete na superfície da membrana de diálise; B) C) (↑) armadilhas em fase de formação D) rede adesiva tridimensional do fungo; E) (↑) presença de substância mucilagínosa adesiva na cutícula da larva após 12 h de predação F) (↑) larva de *Haemonchus contortus* após 12 h de predação pela armadilha.



**Figura 3** - Elétron-micrografias de varredura da interação entre o fungo *Duddingtonia flagrans* e larvas infectantes (L3) de *Haemonchus contortus* em superfície de membrana de diálise. A) (▲) armadilhas aderidas a diferentes regiões da superfície da L3 12 horas após predação (↑) clamidósporos do fungo *Duddingtonia flagrans*; B) (↑) células de bactérias no ponto de aderência entre a armadilha e a cutícula do nematóide 24 h após a predação; C) (↑) presença de substância mucilaginosa entre a armadilha do fungo e cutícula do nematóide com 36 h de interação fungo nematóide; D) (▲) substância liberada a partir da cutícula da L3 próxima a zona de aderência da armadilha, 48 h após a predação; (↑) hifa do fungo emergindo da cutícula da larva, evidenciando a penetração do corpo da L3 pelo fungo.

Pôde ser observada nas micrografias de varredura, a presença de bactérias em forma de bastonete. Estas se apresentavam distribuídas aleatoriamente na superfície da membrana (Figura 2 A) e, algumas vezes, associadas à zona de interação fungo-larva (Figura 3 B). A observação de bactérias em associação com fungos nematófagos foi relatada por MAIA *et al.*

(2001) que observaram a presença constante de bastonetes em culturas de fungo do gênero *M. robustum*.

DUPPONOIS *et al.* (1998) estudaram a atividade de diversas cepas de bactérias associadas a um isolado de *Arthrobotrys oligospora*. A interação de algumas cepas com o fungo potencializou a atividade predatória, o crescimento radial e a produção de conídios. No mesmo estudo, foi observado que a atividade predatória do fungo, isoladamente, sobre juvenis dos nematóides parasitos de plantas *Meloidogyne incognita* e *M. mayaguanensis* foi maior do que sobre *M. javanica*. Contudo, quando se utilizou a associação com algumas bactérias não houve especificidade e a agressividade do fungo aumentou. Os autores denominaram estas bactérias de “Nematophagous Helper Bacteria” e levantaram a hipótese das bactérias produzirem substâncias que atuem como pontes moleculares entre os fungos e os nematóides.

No presente trabalho não foi constante a presença de bactérias nas zonas de interação entre o fungo e as larvas. Isto poderia indicar que o encontro das bactérias foi casual e estas não teriam funções relevantes na atividade de *Duddingtonia flagrans* ou que, durante o processamento do material, as bactérias foram lavadas e carregadas para outras áreas da superfície da membrana. Na literatura não foram encontrados relatos da associação de bactérias com isolados de *D. flagrans*. Desta forma, o isolamento das bactérias observadas no presente trabalho e o estudo do efeito da associação com fungos nematófagos poderiam esclarecer o real papel destas bactérias na atividade do fungo *D. flagrans* sobre larvas de nematóides parasitos de animais.

A técnica de fixação em membrana de diálise proposta por NORDBRING-HERTZ, (1983) demonstrou ser prática e aplicável ao estudo da interação fungo-nematóide, entretanto, com o tempo algumas membranas de diálise perderam umidade e encolheram ou enrugaram o que permitiu que algumas larvas passassem para a parte de baixo da membrana de diálise, impedindo o contato destas com as armadilhas. A adição de ágar em estado líquido às margens das membranas com auxílio de uma seringa de 1 mL impediu que este fato ocorresse.

Através dos estudos de interação fungo-nematóide, os fungos com produção mais precoce e maior número de armadilhas e com maior

agressividade sobre várias espécies de nematóides poderiam ser selecionados para utilização em programas de controle biológico. Estudos moleculares e bioquímicos dos fatores envolvidos na interação de *D. flagrans* e larvas infectantes dos nematóides parasitos gastrintestinais de ruminantes poderiam apresentar resultados importantes, permitindo a identificação de substâncias envolvidas na interação, com implicações na seleção de isolados a serem implementados nos programas de controle biológico de nematóides.

## 6. CAPÍTULO 3

---

**Eficácia do fungo predador de nematóides *Duddingtonia flagrans* sobre larvas infectantes de *Haemonchus contortus* e *Strongyloides papillosus* após passagem de clamidósporos, conídios e micélio pelo trato gastrointestinal de caprinos.**

---

## 6.1. RESUMO

Neste estudo, a utilização do fungo predador de nematóides *D. flagrans* no controle dos parasitos gastrintestinais de caprinos *H. contortus* e *S. papillosus* foi investigada. Avaliou-se dinâmica de passagem de conídios e clamidósporos e micélio do fungo pelo trato digestivo de caprinos. Foram formados quatro grupos com cinco caprinos cada. No grupo A, cada animal recebeu  $1 \times 10^6$  conídios de *D. flagrans* por kg de peso vivo. No grupo B, cada animal recebeu  $1 \times 10^6$  clamidósporos por kg de peso vivo. No grupo C, cada animal recebeu 1 g de massa micelial por kg de peso vivo. No grupo 4 (grupo controle) os animais não receberam nenhum propágulo fúngico. Amostras fecais foram coletadas 3 horas antes e 12, 24, 30, 36, 42, 48, 60, 72, 84 e 96 h após a inoculação das estruturas fúngicas. As fezes foram colocadas em placas de Petri contendo ágar-água. Estas placas foram examinadas durante 30 dias para verificar a presença do fungo e larvas predadas. Um segundo ensaio avaliou o efeito da administração das estruturas sobre o desenvolvimento larvar em coproculturas nos intervalos de 12-24; 24-30; 30-36; 36-48; 48-60; 60-72; 72-84 e 84-96 h após o tratamento com as estruturas fúngicas. O percentual de desenvolvimento larval foi determinado usando a relação de larvas/ovos depositados nas culturas fecais. O fungo *D. flagrans* sobreviveu à passagem pelo trato digestivo dos caprinos e manteve sua atividade predatória, sendo observado de 12 a 96 h após a inoculação de clamidósporos e conídios. Houve redução significativa ( $p < 0,05$ ) no número de larvas recuperadas das culturas dos animais tratados com conídios, clamidósporos e micélio quando comparado com o controle. Entretanto, o tratamento dos animais com clamidósporos resultou em um maior período de eficácia quando comparado com os animais tratados com micélio e conídios.

## 6.2. ABSTRACT

In this study, the use of nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in the control of goat parasite *Haemonchus contortus* and *Strongyloides papillosus* was investigated. The dynamics of passage of conidial, chlamyospore and mycelium of the fungus through the digestive tract of goats was evaluated. Four groups of five goats were formed. In the group A, each animal receive  $1 \times 10^6$  *D. flagrans* conidia per kg of live weight. In the group B, each animal received  $1 \times 10^6$  chlamyospores per kg of live weight. In the group C each animal receive 1 g of mycelia mass per kg of live weight. In the group 4 (control group) the animal did not receive any fungal structure. Feces were obtained 3 hours before and 12, 24, 30, 36, 42, 48, 60, 72, 84 e 96 hours after the inoculation. The feces were placed in Petri dishes containing water agar. Petri dishes were examined to detect the fungus and trapped nematodes. A second trial evaluated the effect of fungal structures on the number of gastrointestinal larvae of *H. contours* and *S. papillosus* harvested of fecal cultures of goats. Feces were obtained from goats in the 12-24, 24-30, 30-36, 42-48, 60-72, 72-84 and 84-96 intervals after the inoculation. Percentage of larval development was determined using a ratio of larvae/eggs deposited in the fecal cultures. *D. flagrans* survived to the digestive process of goats, and maintained its predatory activity, being observed from 12 to 96 h before inoculation in the animals that received chlamyospores and conidia. There was a significant reduction ( $p < 0, 05$ ) in the number of nematodes larvae recovered of the cultures of the treated animals with conidia, chlamyospore and mycelia when compared with the control. However, the treatment of the animals with chlamyospore resulted in a larger period of effectiveness when compared with the treated animals with mycelia and conidia.

### 6.3. INTRODUÇÃO

A criação de caprinos é uma atividade de crescente importância sócio-econômica no mundo. A caprinocultura de corte e leite são alternativas, tanto para a produção de alimentos, quanto para a diversificação da renda da propriedade e geração de empregos no campo (SILVA, 2003). Dentre os ruminantes domésticos os caprinos são considerados os mais suscetíveis aos nematóides parasitos gastrintestinais (ASSIS, 2005).

*Haemonchus contortus* é considerado o principal nematóide parasito gastrintestinal de pequenos ruminantes sendo responsável por importantes perdas econômicas em diversas regiões do mundo. Os danos causados por este parasito estão associados aos hábitos hematófagos do parasito que levam a um quadro de anemia intensa poucos dias após a infecção, perda de peso, fraqueza, inapetência e, em alguns casos, morte dos animais afetados (URQUHART *et al.*, 1996).

Os nematóides da espécie *Strongyloides papillosus* são importantes parasitos gastrintestinais de ruminantes, principalmente em regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo capazes de desenvolver ciclos reprodutivos tanto parasitários quanto de vida livre. A fase parasitária é composta exclusivamente por fêmeas que produzem ovos larvados por partenogênese (CHANDRAWATHANI *et al.*, 1998; URQUHART *et al.*, 1996).

A utilização de fungos nematófagos predadores têm demonstrado ser uma alternativa viável no controle de estádios pré-parasitários de diversas espécies de nematóides gastrintestinais de ruminantes (LARSEN, 1999).

Pelo fato desta forma de controle se basear na administração oral de estruturas fúngicas, existe a necessidade de se determinar quais isolados e quais estruturas destes isolados apresentam a capacidade de passar pelo trato gastrintestinal dos animais e manter a capacidade de predação e destruir as larvas infectantes presentes no bolo fecal.

Neste aspecto, a espécie *Duddingtonia flagrans* tem demonstrado em diversos estudos uma grande viabilidade. Este fato está relacionado à capacidade desse fungo produzir além de micélio e conídios, esporos de

parede espessa com grande resistência às condições adversas impostas pelo trato gastrintestinal de ruminantes denominados clamidósporos.

Apesar do consenso que se criou em torno da produção de clamidósporos como forma ideal de administração dos fungos utilizados no controle biológico, existem falhas na tentativa de se desenvolver metodologias eficientes para a produção massal destas estruturas, assim como determinar se realmente apenas os clamidósporos são responsáveis pela grande viabilidade apresentada pelos fungos (ARAÚJO *et al.*, 2004a).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia predatória do isolado CG722 do fungo *D. flagrans* sobre L3 de *Haemonchus contortus* e *Strongyloides papillosus*, após a passagem de micélio, conídios, e clamidósporos desta espécie pelo trato gastrintestinal de caprinos estabulados.

## 6.4. MATERIAL E MÉTODOS

### 6.4.1. Isolado Fúngico

Isolado fúngico da espécie *Duddingtonia flagrans* (CG722) cedido pelo CENARGEM, foi mantido na micoteca do Laboratório de Parasitologia do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa em geladeira a 4 °C em tubos de cultivo contendo Corn Meal Agar (CMA, DIFCO), em ausência de luz.

### 6.4.2. Produção de clamidósporos

Isolado fúngico da espécie *D. flagrans* mantido em tubos de cultivo contendo meio CMA foi repicado para cinco placas de Petri contendo meio ágar-água (AA, SIGMA®). Estas placas foram incubadas em estufa BOD a 25 °C em ausência de luz por cinco dias. Das bordas das colônias fúngicas crescidas livres de contaminação, discos de ágar com aproximadamente 4 mm de diâmetro, foram retirados, com auxílio de uma alça de platina e inoculados em trinta placas de Petri contendo 20 mL de meio YPSSA (extrato de levedura, 4 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g; MgSO<sub>4</sub>, 0,5 g; amido solúvel, 20 g; Agar, 20 g; água suficiente para 1 L de solução). Em seguida, estas placas foram incubadas em estufa BOD a 25° C, por 28 dias e em ausência de luz. Após este período, a superfície das placas foi lavada com 10 mL de água com auxílio de um pincel. A suspensão contida nas placas foi passada através de uma peneira acoplada a um recipiente plástico para eliminação dos fragmentos de micélio. Os esporos recuperados foram quantificados em dez contagens em câmara de Neubauer e qualificados (conídios e clamidósporos) em 3 alíquotas de 10 µL. Após a quantificação e qualificação dos esporos, foi feita a diluição para a concentração desejada a ser administrada a cada animal.

### 6.4.3. Produção de conídios

Discos de CMA com 4 mm de diâmetro contendo material fúngico de *D. flagrans* foram inoculados em 30 placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo meio YPSSA. Estas placas foram colocadas em incubadora BOD a 25° C por sete dias. Após este período a superfície das placas foi lavada com 10 mL de água com auxílio de um pincel. A quantificação e qualificação dos esporos foram feitas como descrito acima. Após a quantificação e qualificação dos esporos foi feita a diluição para a concentração desejada a ser administrada a cada animal.

### 6.4.4. Produção de massa micelial

Cinco discos de AA com 4 mm de diâmetro contendo micélio e esporos de *D. flagrans* foram inoculados em frascos Erlenmeyers (250 mL) contendo 150 mL de meio GPL (Glicose, 15 g; peptona, 2 g; extrato de levedura, 5 g). Estes frascos foram incubados sob agitação de 120 rpm, por dez dias em estufa regulada a 25°C e em ausência de luz. No décimo dia de incubação a massa micelial foi separada do meio de cultura através de filtração em papel filtro e lavada por três vezes em água destilada estéril. O excesso de umidade foi retirado através de prensagem manual em papel-filtro por três vezes e a massa micelial foi pesada em balança de precisão. Para descartar a possibilidade de formação de conídios e clamidósporos do fungo em meio líquido, após a pesagem, cinco amostras da massa micelial total foram retiradas, colocadas sobre lâmina e lamínula e observadas em aumento de 100 e 400x em microscópio óptico.

### 6.4.5. Nematóides

Para obtenção de larvas infectantes (L<sub>3</sub>) de *Haemonchus contortus* e *Strongyloides papillosus*, coproculturas foram feitas com 20 g fezes de caprinos com infecção monoespecífica, internados no setor de clínica do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.

As larvas foram recuperadas separadamente das coproculturas, através do método de Baermann e lavadas cinco vezes por centrifugação a 1500 rpm durante 5 minutos, desprezando-se o sobrenadante ao final da centrifugação. Para eliminação de sujidades e bactérias as L<sub>3</sub> foram submetidas à filtração em filme antiestático Kimwipes (Kimberly-Clark®), de acordo com metodologia descrita por BARÇANTE *et al.* (2003) e estocadas em solução 0,05% (p/v) de sulfato de estreptomicina e 0,05% (p/v) de cloranfenicol por uma hora. Após, repetiu-se o processo de lavagem descrito anteriormente.

#### **6.4.6. Animais**

Foram utilizados 20 caprinos machos com oito meses de idade, adquiridos do setor de caprinocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa. Estes animais foram infectados oralmente com 5000 larvas de *Haemonchus contortus* e a infecção por *Strongyloides papillosus* ocorreu naturalmente durante a estabulação. Estes animais foram alocados em baia de piso cimentado no Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. Durante o período experimental, os caprinos foram alimentados com capim Elefante (*Pennisetum purpureum*) picado e feno de Tifton (*Cynodon dactylon*) e água *ad libitum*.

#### **6.4.7. Procedimento experimental**

##### **6.4.7.1. Atividade predatória *in vitro* do fungo *D. flagrans* sobre larvas infectantes de *H. contortus* e *S. papillosus*.**

Os testes de predação foram realizados em superfície de placas de Petri com 6 cm de diâmetro contendo AA 2%. Foram formados quatro grupos com cinco repetições:

- Grupo 1: cinco placas de Petri contendo colônia fúngica de *D. flagrans* crescida por sete dias a 25 °C em superfície de ágar-água, inoculada, cada uma com aproximadamente 1000 L<sub>3</sub> de *H. contortus*.

- Grupo 2: cinco placas de Petri contendo colônia fúngica de *D. flagrans* ágar-água inoculada, cada uma, com aproximadamente 1000 L<sub>3</sub> de *H. contortus*.
- Grupo 3: cinco placas de Petri contendo colônia fúngica de *D. flagrans* crescida por sete dias a 25 °C em superfície de ágar-água, inoculada, cada uma com aproximadamente 1000 L<sub>3</sub> de *S. papillosus*.
- Grupo 4: Cinco placas de Petri contendo ágar-água inoculada, cada uma, com 1000 L<sub>3</sub> de *S. papillosus*.

As placas foram incubadas em incubadora, por sete dias a 25° C e em ausência de luz. Diariamente, durante os sete dias de incubação, as placas foram retiradas da estufa para observação da formação de armadilhas e da captura das L<sub>3</sub> pelo fungo. Após sete dias, o ágar contido nas placas foi retirado com auxílio de espátula metálica e as L<sub>3</sub> livres de predação foram recuperadas em tubos de hemólise pelo método de Baermann por 12 horas. O conteúdo recolhido em tubos de hemólise foi transferido para tubos de centrífuga e o material foi então centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm. Após a centrifugação, o conteúdo dos tubos foi igualado para 1 mL com auxílio de pipeta de Pasteur acoplada a uma bomba de vácuo. A estimativa do número de L<sub>3</sub> foi feita através da média de cinco alíquotas de 50 µl, extrapolando-se para o volume de 1 mL contido nos tubos.

A taxa de predação do fungo para cada espécie de nematóide foi calculada utilizando-se a fórmula:

$$\% \text{ redução} = \frac{X_c - X_t}{X_c} \times 100$$

Onde: X<sub>c</sub>= média do número larvas recuperadas no grupo controle;

X<sub>t</sub> = média do número de larvas recuperadas no grupo tratado.

Em seguida os animais foram divididos por sorteio baseados no OPG em 4 grupos com cinco animais cada:

**A - (Conídio)** - Cada animal recebeu, por via oral, 120 mL de suspensão contendo aproximadamente 1x10<sup>6</sup> esporos (95,28% conídios e 4,72% clamidósporos) do fungo *D. flagrans*.

**B - (Clamidósporo)** - Cada animal recebeu, por via oral, 120 mL de suspensão contendo aproximadamente  $1 \times 10^6$  esporos (93,37% clamidósporos e 6,63% conídios) do fungo *D. flagrans* por Kg de peso vivo.

**C – Micélio** - Cada animal recebeu por via oral, 120 mL de suspensão contendo 1 g de massa micelial fresca do fungo *D. flagrans* por Kg de peso vivo.

**D - Controle** - Cada animal recebeu, por via oral, 120 mL de água destilada autoclavada.

Coletas de fezes foram feitas com auxílio de bolsas coletoras confeccionadas com sacos de algodão forradas internamente com fita plástica para facilitar a limpeza entre os intervalos de coleta, nos intervalos de 12-24, 24-30, 30-36, 42-48, 60-72, 72-84, 84-96 horas após a administração do material fúngico. As fezes coletadas foram homogeneizadas e uma amostra de cada animal pertencente aos 4 grupos experimentais, de 20 gramas cada, foi retirada e misturada a 10 g de vermiculita e 25 mL de água, para coprocultura, em copos de PVC de 200 mL alocados em incubadora, regulada a 26 °C de temperatura. Durante a incubação, em intervalos de seis em seis dias, as coproculturas foram inspecionadas visualmente para avaliar as condições de umidade das culturas. Após 18 dias de incubação a partir do horário de coleta das amostras, as L<sub>3</sub> foram recuperadas em tubos de hemólise pelo método de Baermann por 12 horas com água a 42 °C. As larvas livres de predação foram quantificadas em microscópio óptico (100x), em cinco alíquotas de 100 µL da amostra inicial e se extrapolando para o volume total contido nos tubos de hemólise.

Para determinação do OPG dos animais durante o período experimental, diariamente, eram feitas três coletas (8h, 14h e 18h) de fezes diretamente do reto dos animais. Após cada coleta de fezes era realizado o exame de OPG (GORDON e WHITLOCK, 1939) modificada descrita em HOFFMANN (1987).

A partir das médias dos OPG e do número de larvas obtidas das coproculturas foram determinados os percentuais de desenvolvimento larvar para cada grupo e cada intervalo de coleta aplicando-se a fórmula descrita por PARAUD *et al.* (2004):

$$\% \text{ dl} = (\text{lpg} / \text{OPG}) \times 100$$

Onde: lpg - número de larvas por grama de fezes recuperadas da coprocultura;

OPG - número de ovos por grama de fezes utilizadas para coprocultura.

O percentual de redução do desenvolvimento larvar para os grupos tratados com conídios, clamidósporos e micélio foram calculados aplicando a fórmula:

$$\% \text{ rdl} = (\% \text{mdl}_c - \% \text{mdl}_t / \% \text{mdl}_c) \times 100$$

Onde: %mdl<sub>c</sub>- percentual médio de desenvolvimento larvar do grupo controle;

%mdl<sub>t</sub> - percentual médio de desenvolvimento larvar do grupo tratado.

Para descartar a presença de fungos nas fezes dos animais antes do experimento e avaliar a presença do fungo após a administração dos tratamentos, amostras de fezes foram coletadas em sacos plásticos diretamente do reto dos animais nos horários de 3 h antes e 12, 24, 30, 36, 42, 48, 60, 72, 84 e 96 h após a inoculação das estruturas fúngicas aos animais. Dois gramas destas amostras foram macerados com bastão de vidro e espalhadas sobre placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo ágar-água 2%. Sobre o ágar contido nas placas, foram gotejadas três mil larvas de *H. contortus* para estímulo do crescimento dos fungos e do desenvolvimento das armadilhas. Estas placas foram vedadas com Parafilm (SIGMA<sup>®</sup>) e incubadas a 25 °C e em ausência de luz. Diariamente, durante trinta dias, estas placas foram inspecionadas em microscópio estereoscópico para visualização de armadilhas, conídios, clamidósporos característicos do isolado e nematóides predados na superfície das placas.

#### 6.4.8. Análise Estatística

O experimento foi montado seguindo um esquema de parcelas subdivididas, tendo nas parcelas os tratamentos (clamidósporo, conídios, micélio, controle) e nas subparcelas os intervalos de coleta (12-24, 24-30, 30-36, 36-48, 48-60, 60-72, 72-84, 84-96 h) em delineamento inteiramente casualizado com 20 repetições (5 animais por tratamento). Os dados referentes aos percentuais de desenvolvimento larvar foram transformados (Arcoseno da raiz de  $X+1$ ), submetidos à análise de variância e as médias comparadas utilizando-se o teste Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

## 6.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.5.1. Produção de conídios, clamidósporos e micélio

Das placas utilizadas para produção de clamidósporos foram recuperados clamidósporos (93,37%) e conídios (6,63%). Nas placas utilizadas para produção de conídios 95,28% dos esporos coletados foram conídios e 4,72% clamidósporos. Mesmo após passagens sucessivas pela peneira, vários fragmentos de micélio foram observados nas suspensões de conídios e clamidósporos.

O percentual de clamidósporos obtido foi superior aos obtidos por FAEDO *et al.* (1997) e WALLER *et al.* (2001b) que obtiveram respectivamente 50 e 80% de clamidósporos entre os esporos produzidos. Estas diferenças podem estar relacionadas ao substrato de cultivo utilizado, visto que, nos trabalhos citados acima, os esporos foram produzidos em ágar-fezes de ovino e grãos de cevada. Por outro lado, variações em características fisiológicas e morfológicas são comuns entre isolados de mesma espécie, o que poderia resultar em diferenças na produção de conídios e/ou clamidósporos (VAN - OORSCHOT, 1985; CHANDRAWATHANI *et al.*, 2002).

### 6.5.2. Atividade predatória *in vitro* de *D. flagrans* sobre larvas infectantes de *H. contortus* e *S. papillosus*

Estruturas de predação do tipo redes adesivas tridimensionais começaram a ser produzidas 10 h após adição dos nematóides às placas e os primeiros nematóides predados foram observados com 12 h de incubação das placas.

A Tabela 3 demonstra o número médio de larvas infectantes de *H. contortus* e *S. papillosus* recuperadas após sete dias das placas com o fungo *D. flagrans* (CG722) e das placas controle. Os percentuais de redução para *H. contortus* e *S. papillosus* foram respectivamente 81,52 % e 99,51 %.

**Tabela 3** - Número médio de larvas infectantes (L3) de *Haemonchus contortus* e *Strongyloides papillosus* recuperadas pelo método de Baermann das placas de Petri com 6 cm de diâmetro contendo ágar-água, com o fungo *D. flagrans* (CG722), após vinte dias de interação a 25 °C, em ausência de luz

TRATAMENTO	MNLRP	% REDUÇÃO
Controle <i>Strongyloides papillosus</i>	956.66 ± 139,99	—
Controle <i>Haemonchus contortus</i>	842.66 ± 161,98	—
<i>D. flagrans</i> + L <sub>3</sub> <i>S. papillosus</i>	4.66 ± 3.01	99.51 ± 0,35%
<i>D. flagrans</i> + L <sub>3</sub> <i>H. contortus</i>	148 ± 30,98	81,52 ± 0,45%

MNLRP: Média do número de L<sub>3</sub> recuperadas das placas.

Pode ser observado que o fungo *D. flagrans* demonstrou maior atividade predatória sobre *Strongyloides papillosus*. Experimentos realizados com outros isolados de *D. flagrans* já demonstraram alta eficácia predatória desta espécie de fungo sobre L<sub>3</sub> de *H. contortus* (MENDOZA-de-GIVES *et al.*, 1998; CHANDRAWATANI *et al.*, 2002).

Até o momento não existem na literatura trabalhos envolvendo a utilização de *D. flagrans* sobre *S. papillosus*. A taxa de predação aqui observada é superior à observada por GONZÁLES CRUZ *et al.* (1998) que observaram a predação de 93,1% de L<sub>3</sub> de *S. papillosus* por *M. gehyropagum* e 32,3 % por *A. robusta*.

Estudos realizados com fungos demonstram que variações na atividade predatória de fungos sobre nematóides são comuns (MENDOZA-de-GIVES *et al.*, 1994; LARSEN, 2000) independente da espécie de fungo e nematóide utilizadas nos ensaios. Estas variações podem estar relacionadas a diversos fatores, tais como, delineamento experimental utilizado, perda de viabilidade de isolados durante períodos de conservação em laboratório e como relatado por (GRONVOLD *et al.*, 1996), fatores genéticos inerentes às linhagens de fungos avaliadas.

Em experimentos *in vitro* os fungos não são expostos às condições adversas impostas pelo trato gastrointestinal dos animais e pelos efeitos bióticos

e abióticos do ambiente, como variações de temperatura, umidade, pH e competição com outros organismos da fauna e flora coprófila. Deste modo, os resultados obtidos neste tipo de teste não podem ser extrapolados para testes *in vivo*. Por outro lado, temos um maior controle que a interação fungo-nematóide esteja ocorrendo, o que é importante em fases iniciais da seleção de microrganismos para utilização em programas de controle biológico (GOMES, 1998).

Considerando que a produção de clamidósporos é uma característica desejável nos fungos a serem utilizados nos programas de controle biológico, a seleção de isolados com maior produção de clamidósporos associada a uma alta capacidade predatória é importante.

### **6.5.3. Dinâmica de eliminação de conídios, clamidósporos e micélio após passagem pelo trato gastrointestinal de caprinos**

O fungo *D. flagrans* não foi encontrado em nenhuma das amostras fecais coletadas antes da administração das estruturas fúngicas e nas placas dos animais do grupo controle durante todo período experimental (Tabela 4). Clamidósporos, conídios e nematóides predados foram visualizados na superfície das placas inoculadas com fezes coletadas dos animais dos grupos tratados com clamidósporos, conídios e micélio, entretanto houve variações entre os tratamentos e entre os horários (Tabela 4). O fungo foi detectado em 84,44% das placas inoculadas com fezes dos animais tratados com clamidósporos, 68,88% das placas do grupo tratado com conídio e em 40,0% das placas do grupo tratado com micélio.

Os resultados obtidos para os animais tratados com clamidósporos confirmam a passagem dos clamidósporos do isolado CG722 e estão de acordo com as observações de LARSEN *et al.* (1998) que isolaram fungos de fezes de ovinos a partir da décima segunda hora após a administração oral de clamidósporos de *D. flagrans*.

O presente trabalho relata pela primeira vez a dinâmica da passagem de conídios e micélio de *D. flagrans* pelo trato gastrointestinal de caprinos.

**Tabela 4** - Ocorrência do fungo *Duddingtonia flagrans* antes e após administração de clamidósporos, conídios e micélio do fungo a caprinos, em placas contendo ágar-água semeadas com dois gramas de fezes de caprino e inoculadas com 3000 larvas de *Haemonchus contortus*, após 30 dias de incubação á 25° C e em ausência de luz

HC(h)	TRATAMENTOS			
	Controle	Clamidósporo	Conídio	Micélio
3 AI	-----	-----	-----	-----
12 PI	-----	++++ -	+++ - -	++++ -
24 PI	-----	+++++	+++++	+++ - -
30 PI	-----	+++++	+++++	++++ -
36 PI	-----	+++++	++++ -	++++ -
48 PI	-----	+++++	+++ - -	+ - - - -
60 PI	-----	+++++	+++++	+ - - - -
72 PI	-----	+++ - -	++ - - -	+ - - - -
84PI	-----	++++ -	++ - - -	-----
96 PI	-----	++ - - -	++ - - -	-----

HC – Horário de coleta de fezes

AI - Horário de coleta antes da inoculação das estruturas fúngicas

PI - horário de coleta pós-inoculação das estruturas fúngicas

+ Placas com presença do fungo

- Placas sem a presença do fungo

Comparando-se os resultados aqui obtidos com outros trabalhos, observa-se que o tempo de eliminação do fungo após administração oral de estruturas fúngicas como conídios e clamidósporos pode variar substancialmente.

LLERANDI-JUARÉZ e MENDOZA-de-GIVES (1998) observaram, após administração de 562.500 clamidósporos de *D. flagrans* a ovinos, maior eliminação de material fúngico durante o intervalo de 22-32 h após a inoculação. MENDOZA-de-GIVES *et al.* (1998) encontraram evidências da presença do fungo *D. flagrans*, entre 14 a 116 h após fornecimento de 11.350.000 clamidósporos a ovinos, com reduções significativas no número de larvas infectantes de *Haemonchus contortus* recuperadas de coproculturas. Estas diferenças observadas possivelmente estão relacionadas a diferenças na

fisiologia digestiva entre caprinos e ovinos e às diferentes dosagens de material fúngico utilizadas.

Contudo, quando comparamos os resultados aos obtidos por OJEDA-ROBERTOS *et al.* (2005), observa-se que a dosagem utilizada pode não ser um fator determinante na dinâmica de eliminação do fungo. Ao administrarem oralmente  $3,5 \times 10^6$  clamidósporos por quilo de peso vivo a caprinos, a presença do fungo foi observada entre 21 a 81 h pós-inoculação.

Outros fatores, relacionados à dieta utilizada durante os experimentos podem ter influenciado o tempo de retenção do alimento no trato gastrintestinal dos animais.

O trânsito dos alimentos desde a sua ingestão até a eliminação nas fezes pelo reto tem uma duração variável, de acordo com o que foi consumido. Um feno de baixa qualidade tenderá a ter um trânsito mais lento que forragens de melhor qualidade. O trânsito total (ingestão/evacuação) é rápido para alguns alimentos (cerca de 15 h), mas pode durar dois dias ou mais para outros (RIBEIRO, 1997).

Observando a eliminação de material fúngico pelos animais tratados com micélio, conídios e clamidósporo, nota-se que até 36 horas após administração das estruturas fúngicas os resultados são semelhantes. A partir deste horário há uma nítida redução na recuperação do fungo nos animais do grupo tratado com micélio.

Durante o trânsito pelo trato gastrintestinal de ruminantes, a ingesta é submetida a ações mecânicas, microbianas e químicas adversas à sobrevivência do fungo (RIBEIRO, 1997). Desta forma, quanto maior o tempo de retenção no trato digestivo, maior a possibilidade de alterações ocasionadas às estruturas fúngicas. Possivelmente, a composição estrutural dos conídios e clamidósporos permitiu que estas estruturas se mantivessem íntegras, possibilitando o isolamento até o último horário de coleta. Em contrapartida, os fragmentos de micélio podem ter sofrido danos que os inviabilizaram.

As médias dos percentuais de desenvolvimento larvar de *H. contortus* e *Strongylloides papillosus* nas coproculturas são descritas nas Tabelas 5 e 6.

Na média dos intervalos de coleta os percentuais de desenvolvimento larvar de *H. contortus* para os grupos controle, conídio, clamidósporo e micélio

foram respectivamente 3,486; 2,653; 1,327 e 2,306% e os percentuais de redução do desenvolvimento larvar para o grupo conídio, clamidósporo e micélio foram respectivamente 23,89; 61,23 e 33,84%.

**Tabela 5** - Médias dos percentuais de desenvolvimento larvar de *Haemonchus contortus* em coproculturas de caprinos nos intervalos de 12-24, 24-30, 30-36, 36-48, 48-60, 60-72, 72-84 e 84-96 h após tratamento com  $1,0 \times 10^6$  conídios/kg de peso vivo (PV);  $1,0 \times 10^6$  clamidósporos/kg PV; 1 g de micélio/kg de PV de *Duddingtonia flagrans* e grupo Controle sem tratamento

IC (h)	GRUPO CONTROLE	CONÍDIO	CLAMIDÓSPORO	MICÉLIO
12-24	2,60 (0,0156) Aa	0,26 (0,0049) Cb	0,73 (0,0078) Bb	0,65 (0,0075) Cb
24-30	5,66 (0,0234) Aa	1,54 (0,0121) BCb	0,80 (0,0084) Bb	1,08 (0,0098) BCb
30-36	3,58 (0,0187) Aa	1,46 (0,0111) BCb	0,76 (0,0080) Bb	2,18 (0,0145) ABCab
36-48	3,25 (0,0177) Aa	1,81 (0,0133) ABab	1,1 (0,0102) Bb	2,25 (0,0148) ABCab
48-60	3,32 (0,0181) Aa	3,47 (0,0185) ABa	1,16 (0,0098) Bb	2,78 (0,0164) ABab
60-72	2,77(0,0164) Aa	2,77 (0,0172) ABa	1,69 (0,0118) ABa	2,78 (0,0164) ABa
72-84	3,94 (0,0194) Aa	3,40 (0,0177) ABa	0,46 (0,0066) Bb	3,00 (0,0172) ABa
84-96	2,77 (0,0164) Aa	4,71 (0,0211) Aa	3,92 (0,0185) Aa	3,50 (0,0178) Aa
%mdl <sup>1</sup>	3,486%	2,653%	1,327%	2,306%
%rdl <sup>2</sup>	—	23,89%	61,93%	33,84%
CV%	28,74			

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si a 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

<sup>1</sup> Percentual médio do desenvolvimento larvar

<sup>2</sup> Percentual de redução do desenvolvimento larvar

( ) Valores transformados para arcoseno (raiz de X+1)

CV - Coeficiente de variação

IC- Intervalo de coleta

Os percentuais de desenvolvimento larvar obtidos para *H. contortus* são semelhantes aos obtidos por OJEDA-ROBERTOS *et al.* (2005) (0,9 -11,1%) e inferiores aos obtidos por TERRIL *et al.* (2004) (3,9-100%) em coproculturas de caprinos.

Estudos moleculares têm demonstrado que existe uma grande diversidade genética em *H. contortus* (PRICHARD, 2001) o que poderia resultar, dentre outros fatores, em grandes variações das taxas de eclosão dos ovos e desenvolvimento larvar de cepas de diferentes regiões.

**Tabela 6** - Médias dos percentuais de desenvolvimento larvar de *Strongyloides papillosus* em coproculturas de caprinos nos intervalos de 12-24, 24-30, 30-36, 36-48, 48-60, 60-72, 72-84 e 84-96 horas após tratamento com  $1,0 \times 10^6$  conídios/kg de peso vivo (P.V);  $1,0 \times 10^6$  clamidósporos/kg.de P.V; 1g de micélio/kg P.V de *Duddingtonia flagrans* e controle sem tratamento

IC (h)	GRUPO CONTROLE	CONÍDIO	CLAMIDÓSPORO	MICÉLIO
12-24h	9,93 (0,0313) Ba	3,31 (0,0178) Ca	3,07 (0,0166) Ba	4,27 (0,0201) Ca
24-30h	9,41 (0,0300) Ba	3,93 (0,0184) Cab	1,17 (0,0097) Bb	5,66 (0,0235) BCab
30-36h	13,02 (0,0343) ABa	13,15 (0,0348) ABCa	0,92 (0,0086) Bb	12,68 (0,0349) ABCa
36-48h	19,04 (0,0432) ABa	7,23 (0,0263) BCab	2,80 (0,0159) Bb	16,45 (0,0386) ABa
48-60h	15,16 (0,0380) ABa	15,8 (0,0393) ABa	1,77 (0,0126) Bb	8,88 (0,0290) BCa
60-72h	20,93 (0,0443) ABa	20,93 (0,0344) ABCab	5,67 (0,0218) Bb	13,24 (0,0348) ABCab
72-84h	13,91(0,0360) ABab	16,72 (0,0400) ABa	6,52 (0,0228) Bb	17,55 (0,0392) ABab
84-96h	26,27(0,0490) Aa	26,27 (0,0490) Aa	17,84 (0,0398) Aa	23,13 (0,0471) Aa
%mdl <sup>1</sup>	15,95%	13,417%	4,97%	12,82%
%rdl <sup>2</sup>	—	15,88%	68,84%	19,62%
CV%	27,55			

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si a 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

<sup>1</sup> Percentual médio do desenvolvimento larvar

<sup>2</sup> Percentual de redução do desenvolvimento larvar

( ) Valores transformados para arcoseno (raiz de X+1)

CV- Coeficiente de Variação

IC- Intervalo de coleta

Os percentuais médios de desenvolvimento larvar de *S. papillosus* ao final do experimento para os grupos controle, conídio, clamidósporo e micélio foram respectivamente 15,95; 13,417; 4,97 e 12,82% e os percentuais de redução do desenvolvimento larvar para os grupos tratados com conídio, clamidósporos e micélio foram respectivamente 15,88; 68,84 e 19,62%.

Verifica-se que os percentuais de desenvolvimento larvar de *S. papillosus* foram superiores aos de *H. contortus* independente do tratamento.

Os nematóides do gênero *Strongyloides* têm a particularidade de alternar ciclos evolutivos completos de vida livre e parasitária, podendo multiplicar-se abundantemente no ambiente (URQUHART *et al.*, 1996). Deste

modo, pode ter ocorrido a multiplicação de *S. papillosus* durante a incubação das coproculturas, o que explicaria uma maior recuperação destas larvas.

Analisando-se os resultados dos percentuais de desenvolvimento larvar de *H. contortus* e *S. papillosus*, nota-se que o tratamento dos animais com clamidósporos foi o mais eficaz no controle das duas espécies. Com exceção do primeiro intervalo de coleta de *S. papillosus* e do sexto intervalo de coleta para *Haemonchus contortus* as reduções acompanharam a dinâmica de eliminação dos clamidósporos descrita na Tabela 4.

No grupo de animais tratados com conídios, os percentuais de desenvolvimento larvar de *H. contortus* foram significativamente menores ( $p < 0,05$ ) que os do grupo controle e semelhantes aos grupos tratados com clamidósporos e micélio até 36 h após administração, entretanto, as reduções não se correlacionaram com a dinâmica de eliminação de conídios, evidenciando que podem ter ocorrido danos durante a passagem pelo trato gastrointestinal dos animais, que não prejudicaram a capacidade do fungo germinar, mas prejudicaram sua atividade predatória. Os resultados obtidos nesse grupo para *S. papillosus* corroboram esta hipótese, pois não ocorreram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias dos percentuais de desenvolvimento larvar quando comparado com o grupo controle.

O tratamento com micélio reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) o percentual de desenvolvimento larvar de *H. contortus* somente nos dois primeiros intervalos de coleta, não sendo possível evidenciar seu efeito sobre larvas de *S. papillosus*.

Os resultados obtidos demonstraram que a administração de clamidósporos do isolado brasileiro de *D. flagrans* CG722 é eficaz no controle de larvas de *H. contortus* e *S. papillosus* de caprinos.

Futuros estudos são necessários para avaliar a eficácia deste isolado a campo, sob diferentes condições ambientais e após a passagem pelo trato gastrointestinal de outras espécies animais.

A administração de conídios e micélio aos animais resultou em um curto período de eficácia. Uma alternativa seria a utilização de formulações que protegessem estas estruturas das condições adversas impostas pelo trato gastrintestinais desses animais. ALVES *et al.*, 2003; ARAÚJO *et al.*, 2004b;

ASSIS *et al.*, 2005 obtiveram reduções significativas de larvas infectantes de parasitos gastrintestinais de bovinos após administração de micélio fúngico de isolados de *Monacrosporium* encapsulados em alginato de sódio a bovinos e caprinos.

Apesar de os clamidósporos possuírem uma grande resistência para passar pelo trato gastrintestinal dos animais e manter a atividade predatória, sua produção demanda um período de tempo maior, quando comparado com a produção de micélio e conídios.

A aplicação dos fungos nematófagos no controle biológico de nematóides parasitos de ruminantes só será possível após o envolvimento de indústrias no desenvolvimento de formulações fúngicas. Para tanto, torna-se necessário estudo da relação custo benefício da produção em escala industrial de cada uma das estruturas fúngicas e desenvolvimento de metodologias que otimizem a produção das estruturas fúngicas.

## 7. CAPÍTULO 4

---

**Viabilidade de formulação peletizada do fungo nematófago *Monacrosporium sinense*, no controle biológico de nematóides parasitos gastrintestinais de bezerros**

---

## 7.1. RESUMO

Neste trabalho, a viabilidade de uma formulação do fungo *Monacrosporium sinense* foi avaliada no controle de nematóides parasitos gastrintestinais de bovinos. Dois grupos de dez bezerros cada, mestiços holandês x zebu, de seis a nove meses de idade, foram colocados em pastagem de *Brachiaria brizantha* em propriedade rural localizada no município de Viçosa-MG. Em um dos grupos cada animal recebeu 20 g de péletes em matriz de alginato de sódio contendo massa micelial do fungo *M. sinense* via oral, duas vezes por semana, durante seis meses com início no mês de outubro. No outro grupo, controle, os bezerros não receberam esse tratamento. As contagens de ovos por grama de fezes (OPG) e de larvas infectantes por kg de matéria seca foram significativamente maiores ( $P < 0,05$ ) no grupo controle. A viabilidade dos péletes em germinar e a atividade predatória do fungo após o encapsulamento foram avaliadas *in vitro*. A porcentagem de péletes com cultivo positivo para o fungo variou entre 90 e 100% e o percentual de redução de larvas infectantes *in vitro* variou entre 90,6 e 100%. A aplicação de péletes de *M. sinense* na dosagem e periodicidade de aplicação usada são eficazes no biocontrole de nematóides parasitos gastrintestinais de bovinos.

## 7.2. ABSTRACT

In this work, the viability of a formulation of the fungus *Monacrosporium sinense* was evaluated in the control of bovine gastrointestinal nematode parasites. Two groups of ten calves each, Holstein X Zebu crossbred six to eight months of age were placed in *Brachiaria brizantha* pasture in a rural property located in the municipal district of Viçosa-MG. In the treated group each animal received 20 g of pellets of sodium alginate containing mycelia of the fungus *M. sinense*, orally, twice a week, during six months with the onset in October-month. In the control group, the calves did not receive treatment. The counts of eggs per gram of faeces (EPG) and counts of infective larvae per kg of dry matter were significantly larger ( $P < 0,05$ ) in the control group than the ones of the treated group. The viability of the pellets germination and the predatory activity of the fungus after the encapsulation were evaluated in vitro. The percentage of pellets with positive culture for fungus varied between 90-100% and percentage of reduction of infective larvae varied between 90,6-100%. The use of this dose and the periodicity of application of *M. sinense* pellets were efficient in the control of bovine gastrointestinal nematode parasites.

### 7.3. INTRODUÇÃO

O surgimento de problemas inerentes ao controle químico de nematóides gastrintestinais de ruminantes tem levado á busca por métodos adicionais de controle, visando uma diminuição do uso exclusivo de anti-helmínticos como forma de controle das verminoses.

Uma das formas alternativas de controle das verminoses pesquisadas tem sido o controle biológico por fungos nematófagos. No Brasil os estudos utilizando esta forma de controle se intensificaram na década de noventa, entretanto, estes estudos têm se restringido a poucos grupos de pesquisa.

Os estudos de controle biológico realizados em outros países vêm se restringindo ao fungo *Duddingtonia flagrans* devido à produção de clamidósporos, estruturas que possuem uma maior resistência às condições adversas impostas pelo trato gastrintestinal dos animais. Por outro lado, apesar dos diversos trabalhos de isolamento de fungos nematófagos realizados em várias regiões do país (NAVES e CAMPOS, 1991; RIBEIRO *et al.*, 1999; SAUMELL *et al.*, 1999; SAUMELL *et al.*, 2000), existe um único relato do encontro desta espécie (PADILHA e SANTOS, comunicação pessoal). Nestes estudos as espécies mais freqüentemente observadas são as pertencentes aos gêneros *Arthrobotrys* e *Monacrosporium*.

O gênero *Monacrosporium* foi descrito por Oudermans em 1885 e foi classificado por COOKE e GODFREY (1964) como pertencente à subdivisão Deuteromycotina. A espécie *Monacrosporium sinense* foi inicialmente descrita por LIU e ZHANG (1994). Esta espécie preda nematóides através de redes adesivas e produz conídios medindo entre 25-30,5 µm de comprimento por 15-18 µm de largura com um a três septos e clamidósporos esféricos a elipsoidais com 20-24 µm de diâmetro. Recentemente, SCHOLLER *et al.* (1999), baseados no tipo de armadilha produzida pelo fungo, propuseram a transferência da espécie para o gênero *Arthrobotrys*.

Em trabalhos realizados utilizando fungos do gênero *Monacrosporium* ARAÚJO *et al.* (1999) e ALVES *et al.* (2003) observaram a passagem pelo trato gastrintestinal de bezerros sem perda da capacidade de preda larvas de nematóides parasitos gastrintestinais de bovinos.

Em trabalho com bezerros estabilados realizado por RIBEIRO (2003), um isolado de *M. sinense* (SF53) foi avaliado quanto à capacidade de passar pelo trato gastrointestinal de bezerros e manter atividade predatória sobre L<sub>3</sub> de *Cooperia* sp. e *Haemonchus* sp. Ao final do experimento, foi observado que o fungo manteve sua atividade predatória sobre as larvas após a passagem pelo trato gastrointestinal.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade de uma formulação peletizada em matriz de alginato de sódio do fungo predador de nematóides *Monacrosporium sinense* (SF53) e verificar sua eficácia no controle de nematóides gastrintestinais de bovinos em experimento de campo, realizado durante o período chuvoso, na região de Viçosa-MG.

## 7.4. MATERIAL E MÉTODOS

### 7.4.1. Fungo

Um isolado do fungo *Monacrosporium sinense* (SF53), isolado de solos brasileiros e cedido pelo Professor Silamar Ferraz do Laboratório de Controle Biológico do Departamento de Fitopatologia foi mantido em tubos de cultivo contendo meio CMA 1,7% em temperatura de 4 °C e em ausência de luz, na micoteca do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.

### 7.4.2. Manutenção dos nematóides de vida livre *Panagrellus* sp. para utilização no isolamento de fungos das fezes.

Populações do nematóide *Panagrellus* sp. foram mantidos e reproduzidos em laboratório em placa de Petri com 20 cm de diâmetro contendo aveia em flocos umedecida e macerada com espátula de metal. Para obtenção dos nematóides, estes foram recuperados da superfície do meio de aveia macerada com auxílio de uma espátula metálica ou das tampas das placas de Petri, através de lavagens com água destilada e transferidos para tubos de centrífuga com capacidade para 15 mL. Após centrifugação a 1200 rpm por cinco minutos, o sobrenadante foi descartado e completava-se o tubo com água destilada, repetindo-se o procedimento até a obtenção de suspensão livre de fragmentos de aveia. A concentração da suspensão foi ajustada de forma a se obter cinco mil nematóides por 0,5 mL.

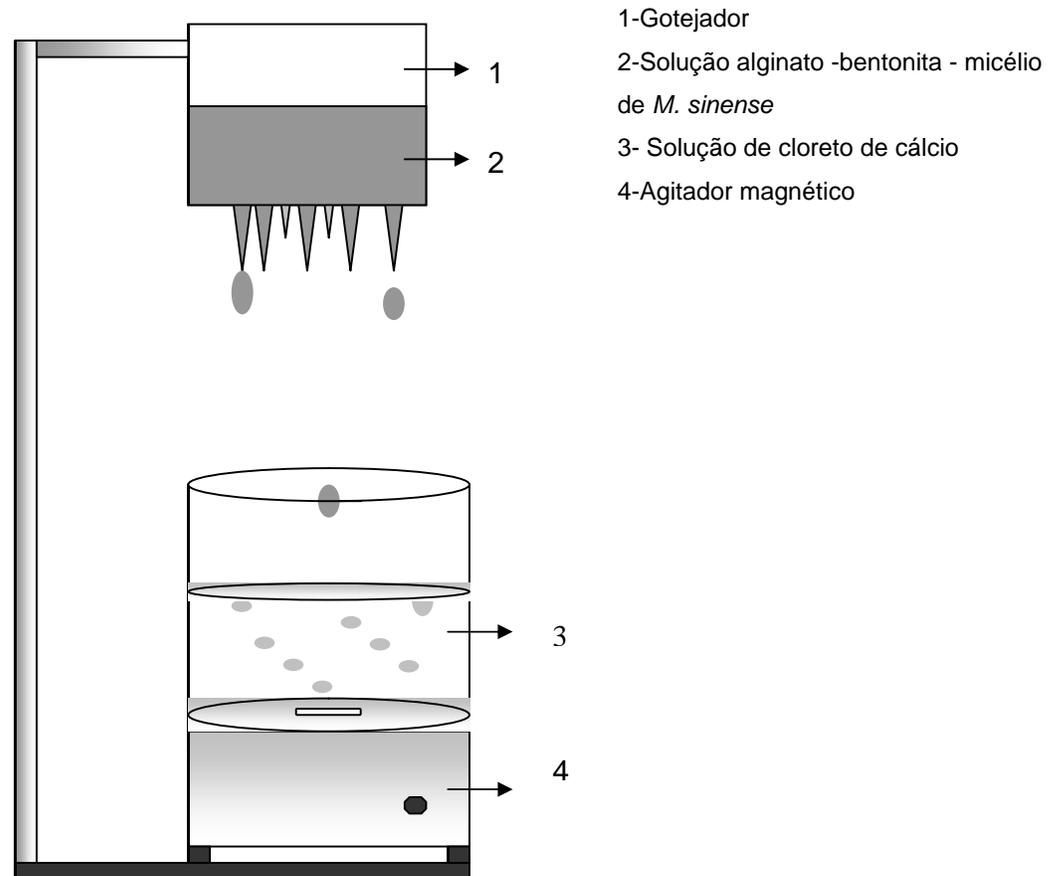
### 7.4.3. Peletização do fungo *M. sinense* em alginato de sódio

Fragmentos de ágar com aproximadamente 4 mm<sup>2</sup> contendo micélio de *M. sinense* foram repicados, a partir dos tubos de cultivo, para placas de Petri com 9 cm de diâmetro contendo ágar-água 2%. Após a repicagem, as placas foram acondicionadas em incubadora BOD a 25 °C, em ausência de luz, por sete dias. Ao final do período de incubação as placas foram inspecionadas para verificação da presença de contaminantes. Das bordas das colônias

crescidas livres de contaminação, discos de ágar com 4 mm de diâmetro contendo micélio do fungo foram retirados das placas e inoculados em meio GPL (15 g de glicose, 2 g de peptona, 5 g de extrato de levedura, 0,5 g de  $K_2HPO_4$ , 0,25 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ), contido em frascos Erlenmeyers, sob agitação constante de 120 rpm, em câmara incubadora regulada a 25 °C. A massa de micélio foi recuperada com auxílio de funil de papel-filtro esterilizado em autoclave a 120 °C por 1 hora e lavada três vezes com água destilada para retirada do excesso de meio nutritivo. Após o processo de lavagem, o excesso de umidade foi retirado por prensagem em papel-filtro.

Os péletes foram produzidos ao início de cada mês do período experimental conforme descrição de LEWIS e PAPAVIZAS (1985), com modificações. Dezesete gramas de fungo foram homogeneizadas em liquidificador industrial juntamente com solução composta por 12 g de alginato de sódio, 50 g de bentonita e 980 mL de água destilada por 5 minutos. Após a homogeneização, a solução foi transferida para um gotejador adaptado<sup>1</sup> (Figura 4), constituído de vasilhame plástico com dez ponteiros de 10 mL acopladas em sua extremidade, através das quais a mistura foi gotejada dentro de um Becker contendo solução 0,25 M de cloreto de cálcio, sob agitação, utilizando agitador magnético. Após 30 min os péletes formados foram colocados em uma peneira e enxaguados três vezes com água destilada e distribuídos na superfície de papel-filtro, contidos em bandeja plástica 40 x 30 cm. As bandejas plásticas foram colocadas em câmara de fluxo laminar e após seis horas, foram transferidas para estufa regulada para 30 °C onde permaneceram por 48 h para secagem.

Após secagem, os péletes foram transferidos para sacos plásticos transparentes (30 x 25 cm) e colocados em geladeira a 4 °C e em ausência de luz.



**Figura 4** - Desenho esquemático de sistema adaptado para produção de péletes de alginato de sódio contendo micélio do fungo *Monacrosporium sinense*.

#### 7.4.4. Avaliação da viabilidade dos fungos após peletização em alginato de sódio

Após a confecção dos péletes, a cada mês, a habilidade dos fungos em crescer e preda nematóides foi testada *in vitro*: Cinquenta péletes, sendo dez por placa, foram distribuídos sobre placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo 20 mL de ágar-água. As placas foram incubadas em estufa a 25 °C e o crescimento de colônias a partir de cada pélete foi observado durante cinco

dias, após os quais foi calculado o percentual de péletes a partir dos quais houve formação de colônias. Após a observação do crescimento das colônias, mil larvas de *Haemonchus contortus* foram gotejadas sobre as placas. As placas foram mantidas em estufa a 25 °C e observadas em microscópio (100x), diariamente, por um período de sete dias. Foram utilizadas, como controle, placas de ágar-água sem fungo sobre as quais foram gotejadas mil larvas infectantes de *H. contortus*. As larvas livres de predação, nas placas, foram recuperadas através de lavagem da superfície da placa com 5 mL de água e auxílio de espátula metálica. A suspensão recuperada das placas foi vertida em tubo de centrífuga com capacidade para 15 mL e centrifugado a 1500 rpm. Após, o conteúdo dos tubos foi igualado para 2 mL e as larvas foram contadas em 5 alíquotas de 50 µL. Calculou-se a média e extrapolou-se o valor para o volume final de 2 mL. O percentual de redução de larvas do grupo tratado em relação ao controle foi calculado através da fórmula:

$$\% \text{ redução} = \frac{X_c - X_t}{X_c} \times 100$$

Onde:  $X_c$  - número de larvas recuperadas das placas controle;

$X_t$  - número de larvas recuperadas das placas tratadas.

#### **7.4.5. Ensaio experimental com bezerros a campo.**

O teste de controle biológico *in vivo* foi realizado em propriedade rural, no Município de Viçosa, localizado na região da Zona da Mata de Minas Gerais e situada a 649 m de altitude, 20°45'20" latitude sul e 42°52'40" longitude oeste, no período de outubro de 2003 a março de 2004. O grupo de animais foi constituído por 20 bezerros, sendo 16 fêmeas e 4 machos, mestiços holandês x zebu com seis a nove meses de idade. Esses animais foram identificados com brincos numerados e tratados com o anti-helmíntico albendazol na dose de 7,5 mg por quilograma de peso vivo. Após o tratamento os animais foram colocados em área de pastagem recém-formada de *Brachiaria brizantha* sem histórico de pastejo.

Após sete dias do tratamento com anti-helmíntico, os bezerros foram divididos em dois grupos de dez animais cada (8 fêmeas e 2 machos por grupo), em piquetes de *Brachiaria brizantha* com aproximadamente quatro hectares, formando um grupo tratado (A) e outro controle (B). No grupo tratado (A), cada animal recebeu 20 g de péletes de alginato de sódio contendo massa micelial do fungo *M. sinense*, duas vezes por semana, por um período de seis meses a partir do mês de outubro. No grupo controle, os animais não receberam tratamento fúngico.

Para facilitar a administração, os péletes foram misturados à ração e fornecidos individualmente a cada animal, em cocho com divisórias. Durante o período experimental os animais receberam suplementação mineral à vontade e 3 kg de ração (15% de proteína bruta) dividido em três administrações por semana em cochos existentes nos currais de cada piquete.

#### **7.4.6. Exames coprológicos**

Uma vez por semana, após a introdução dos bezerros nos pastos, dos animais de cada grupo foram colhidas amostras de fezes em sacos plásticos 30x25 cm diretamente da ampola retal. As amostras coletadas foram acondicionadas em caixas de isopor com gelo e levadas ao Laboratório de Parasitologia do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. Nestas amostras fecais, foram determinadas as contagens de ovos por grama de fezes (OPG), segundo a técnica modificada de Gordon e Whitlock (1939) e descrita por LIMA (1989). Simultaneamente ao exame de OPG, foram realizadas as coproculturas, em que 20 g de fezes dos animais foram misturadas com serragem, umedecidas e levadas à estufa a 26 °C, durante sete dias, obtendo assim larvas infectantes (L<sub>3</sub>) de nematóides parasitos gastrintestinais. Para recuperação das L<sub>3</sub>, as culturas foram depositadas sobre gaze e colocadas em aparelho de Baermann contendo água inicialmente a 42 °C. Após 24 h, o material contido nos tubos de hemólise era homogeneizado através de agitação manual e gotejado sobre lâminas de vidro juntamente com uma gota de lugol, coberto com lamínula e observado em microscópio ótico em aumentos de 100 e 400x. Foram identificadas cem larvas de acordo com os

critérios de Keith, (1953) descritos em UENO (1998). A partir dos percentuais obtidos nas coproculturas, foram estimados os números de ovos por grama de fezes para cada gênero encontrado.

#### **7.4.7. Reisolamento do fungo *Monacrosporium sinense* nas fezes**

Uma vez por mês, amostras de 3 g de fezes eram retiradas das fezes coletadas dos animais dos grupos A e B. Estas amostras eram misturadas duas a duas e 3 gramas eram espalhadas sobre placas de Petri com 9 cm de diâmetro contendo ágar-água 2%, totalizando cinco placas para o grupo A e cinco placas para o grupo B. Sobre as placas eram gotejadas 0,5 mL de suspensão contendo 5000 larvas do nematóide de vida livre *Panagrellus*. Estas placas foram incubadas em estufa a 26 °C, durante 21 dias. Durante esse período, as placas foram observadas diariamente com o auxílio de um microscópio estereoscópico para visualização de armadilhas e conídios do fungo. Os fungos isolados foram identificados utilizando-se as chaves de COOKE e GODFREY (1964); VAN OORSCHOT (1985); LIU e ZHANG (1994).

#### **7.4.8. Contagem de larvas em amostras de gramíneas**

Uma vez por semana, em cada piquete, foram coletadas amostras de gramíneas, em zigue-zague, de pontos variados. De cada amostra, 500 g de gramíneas foram utilizadas para recuperação de L<sub>3</sub> de nematóides parasitos de bovinos seguindo a técnica descrita por LIMA (1989): 500 g de gramíneas eram colocados sobre uma tela de plástico em um balde com capacidade para 10 litros. O balde foi preenchido com água à temperatura de 41°C, e a amostra foi deixada em repouso por um período de 24 h, após o qual a tela com a amostra de gramíneas foi retirada e se adicionou 100 mL de formalina, para deixar novamente em repouso por 6 h. Após este período, o sobrenadante foi sifonado com auxílio de uma mangueira plástica acoplada a uma bomba de vácuo. O líquido remanescente foi coado em um tamis de bronze com malha de 200 µm. O sedimento foi transportado para um cálice de Hoffmann, com capacidade de 300 mL, onde ficou decantando por um período de 12 h. O

sobrenadante foi passado novamente no tamis, até que o sedimento atingiu um volume de 10 mL. O conteúdo obtido foi centrifugado a 1.500 rpm, durante três minutos. Posteriormente, o sedimento foi examinado em microscópio óptico, e as larvas foram contadas e identificadas segundo KEITH (1953).

As amostras de gramíneas foram retiradas das telas plásticas e colocadas em uma estufa de secagem a 100° C até que atingissem peso constante, para se obter o peso da matéria seca. Os dados obtidos foram transformados em número de larvas por kg de matéria seca.

#### **7.4.9. Ganho de peso dos animais**

O peso dos animais foi estimado de trinta em trinta dias, a partir do início do experimento, com auxílio de uma fita barimétrica.

#### **7.4.10. Dados meteorológicos**

Os dados meteorológicos, referentes às médias das temperaturas e à precipitação pluvial mensal, foram obtidos em estação especializada do Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa-MG.

#### **7.4.11. Análise Estatística**

Foram comparados os dados de OPG, das coproculturas, larvas presentes na pastagem e ganho de peso dos animais do grupo controle e tratado, durante os seis meses de experimento. Para análise estatística dos dados de OPG, coproculturas e número de larvas recuperadas da pastagem, foi realizada a transformação dos dados  $\log(x+2)$  para correção das distorções das médias. As médias dos fatores qualitativos foram comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

## 7.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A porcentagem de péletes com cultivo positivo para o fungo variou entre 90 e 100% (Tabela 7) e o percentual de redução de larvas infectantes *in vitro* variou entre 90,6 e 100%. Nas placas inoculadas com péletes foi observado um grande número de conídios do isolado, além de várias larvas predadas 12 h após a inoculação destas em placas contendo o fungo já crescido.

**Tabela 7** - Viabilidade de péletes de alginato de sódio contendo massa micelial do fungo *Monacrosporium sinense* após cinco dias de incubação a 25 °C e percentual de redução do número de larvas de *Haemonchus contortus* após dez dias de interação em superfície de placas de Petri contendo ágar-água 2%; Péletes produzidos de outubro de 2003 a março de 2004

MÊS	PERCENTUAL DE VIABILIDADE	PERCENTUAL DE REDUÇÃO
Outubro	100%	98,3%
Novembro	100%	100%
Dezembro	100%	90,6%
Janeiro	90%	99,3%
Fevereiro	100%	100%
Março	100%	93,6%

A alta viabilidade dos péletes de alginato de sódio contendo o fungo *Monacrosporium sinense* e os percentuais de redução observados *in vitro* demonstram que o fungo sobreviveu ao processo de peletização em alginato de sódio e manteve sua capacidade predatória, indicando que esta pode ser uma forma viável para veiculação de fungos nematófagos. Entretanto, é importante ressaltar que os testes de viabilidade foram feitos logo após a confecção dos péletes, o que pode ter colaborado para a alta taxa de germinação e predação apresentadas. Futuros estudos devem ser realizados para avaliar a viabilidade de *M. sinense* peletizado após diferentes períodos de armazenagem em condições variáveis.

A avaliação da viabilidade dos péletes foi realizada *in vitro* sob condições laboratoriais estáveis de temperatura, pH, umidade e ausência de

competidores dos fungos. Este fato pode ter colaborado para a alta germinação dos péletes e para a grande eficácia predatória dos fungos. Devido a estes fatores, os resultados *in vitro* muitas vezes não podem ser extrapolados para experimentos de campo. Por outro lado, os experimentos *in vitro* são mais práticos e nos permitem uma análise mais acurada do comportamento do fungo e da interação entre os isolados utilizados e o nematóide alvo.

Os valores médios mensais do OPG total, *Cooperia*, *Haemonchus* e *Oesophagostomum* são descritos na Figura 5. O OPG dos animais do grupo controle foi maior ( $p < 0,05$ ) do que o dos animais do grupo tratado nos meses de fevereiro e março de 2004. Ao final do período experimental, a diferença das contagens de OPG entre o grupo A e B foi de 50,61% e nos últimos três meses foi de 65,23%. A maior diferença do OPG do grupo do tratado foi no mês de março, ao final do experimento, quando alcançou 79,19%. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por ALVES *et al.* (2003) e ARAÚJO *et al.* (2004b), que, em experimentos realizados na mesma região, observaram ação gradativa na redução do OPG dos animais tratados, com reduções significativas observadas a partir do quarto mês após aplicação de uma formulação de alginato de sódio contendo micélio do fungo *M. thaumasium*, e maior diferença no OPG entre os grupos tratados e controle no último mês de experimento.

Ovos de *Trichuris* foram encontrados ocasionalmente nos exames de dois animais do grupo controle, a partir do quarto mês de experimento. Em experimentos realizados na região de Viçosa, este parasito tem sido encontrado em baixos níveis nos animais (ARAÚJO *et al.*, 1998; GOMES, 1998). É importante ressaltar que o fato de ovos deste parasito não serem encontrados no grupo tratado com a formulação fúngica, não está relacionado com a ação do fungo, pois a infecção por este parasito ocorre pela ingestão de ovos e *M. sinense* não está relacionado entre os fungos com ação ovicida.

As médias mensais do OPG obtidas a partir da participação das L<sub>3</sub> nas coproculturas estão descritas na Figura 5. Nas coproculturas foram observadas larvas de *Cooperia* sp., *Haemonchus* sp. e *Oesophagostomum* sp.

Através dos percentuais observados nas coproculturas ficou evidenciado que as diferenças no OPG foram relacionadas ao gênero *Oesophagostomum* no mês de fevereiro e, aos três gêneros citados acima, no mês de março.

Durante os meses de outubro, novembro e dezembro o gênero *Cooperia* foi o mais prevalente nas coproculturas dos dois grupos. A partir do mês de janeiro verificou-se um aumento na recuperação dos gêneros *Haemonchus* e *Oesophagostomum* em relação ao gênero *Cooperia*. O gênero *Haemonchus* apresentou maior prevalência que *Cooperia* nos meses de janeiro, fevereiro e março. A ocorrência de *Oesophagostomum* foi maior que a de *Cooperia* nos meses de janeiro e março nos animais do grupo A e em janeiro fevereiro e março nos animais do grupo B. No grupo B, *Oesophagostomum* apresentou uma maior prevalência que *Haemonchus* nos meses de janeiro e fevereiro. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por GOMES, (1998) que realizou experimento na mesma região do presente estudo. As diferenças na curva de ocorrência dos gêneros nas coproculturas ao longo dos meses do período experimental podem estar relacionadas a fatores ambientais como, aumento na precipitação pluvial e ao desenvolvimento de imunidade aos nematóides pelos animais, que apresenta perfil diferente para cada gênero e é dependente da idade (LIMA, 1989).

Os valores das contagens de larvas infectantes de nematóides tricostrongilídeos (L3) por kg de matéria seca de gramínea são apresentados na Figura 6. Ao final do período experimental, o piquete dos animais tratados apresentou uma contagem menor ( $p < 0,05$ ) de larvas por kg de matéria seca que o grupo controle. O número total de larvas recuperadas ao final do experimento, no pasto dos animais tratados com os péletes foi menor 48,17% em relação ao grupo controle. O gênero *Cooperia* foi o que apresentou maior prevalência seguido por *Haemonchus* e *Oesophagostomum*. O número de larvas de *Cooperia*, *Haemonchus* e *Oesophagostomum* recuperadas do pasto dos animais tratados com péletes foi menor ( $p < 0,05$ ) com reduções de 43,45; 52,29 e 56,09%, respectivamente.

Os resultados da prevalência de larvas estão de acordo com GOMES (1998) e ALVES *et al.* (2003), que ao realizarem experimentos na mesma região, observaram uma maior prevalência de *Cooperia* nas pastagens. Este

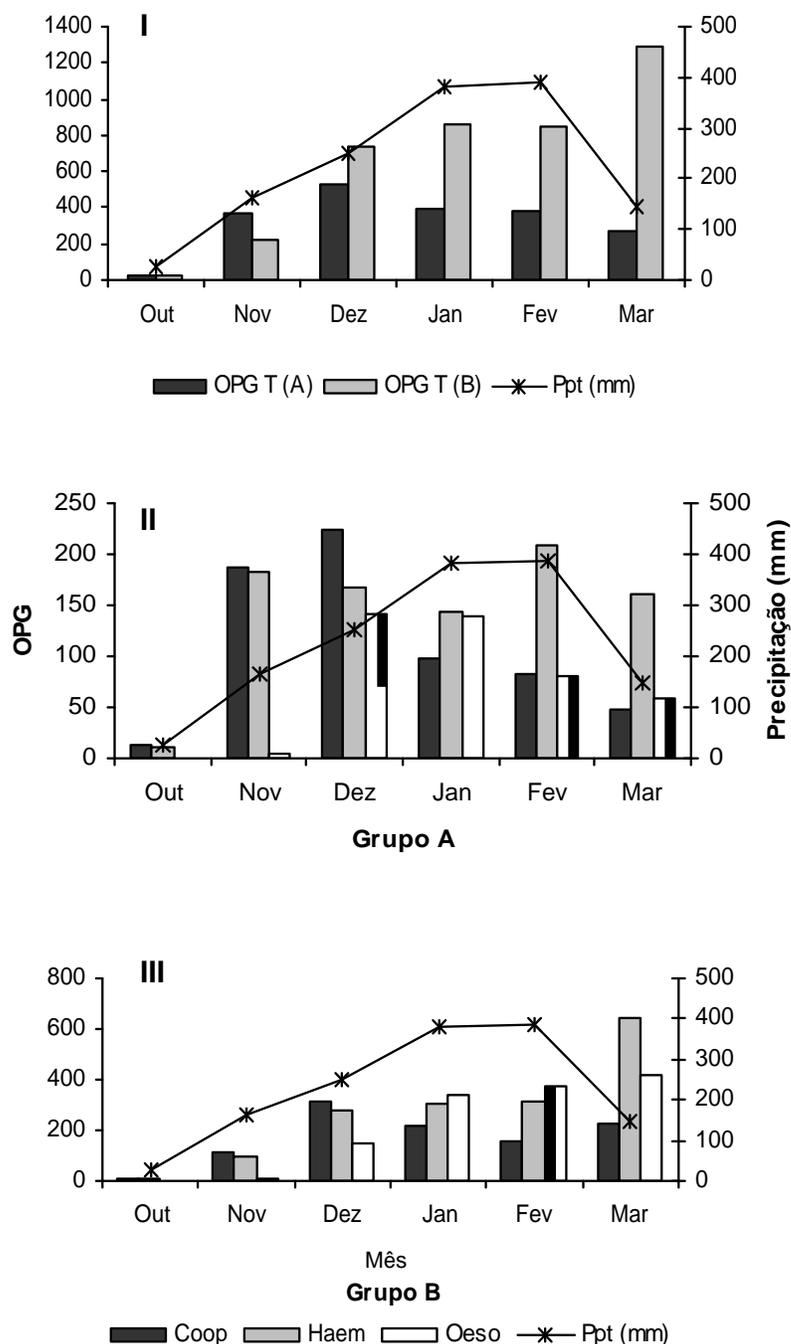
fato pode estar associado a maior resistência dos estádios pré-parasitários de *Cooperia* no ambiente e à maior capacidade migratória das fases pré-parasitárias destes nematóides como relatado por REINECKE (1960) e DURIE (1962).

Por outro lado, GOMES (1998) e ARAÚJO *et al.* (1998) não observaram reduções significativas das larvas de *Oesophagostomum* nas pastagens e dos valores de OPG para este gênero. Os autores propuseram que a ineficiência do fungo teria ocorrido devido a menor motilidade das larvas deste parasito, o que levaria a uma menor produção de armadilhas pelos fungos. Nestes trabalhos, os isolados utilizados pertenciam ao gênero *Arthrobotrys* e variações no comportamento predatório de isolados de diferentes espécies são comuns (ARAÚJO, 1999) o que poderia explicar o resultado encontrado para o isolado de *M. sinense*.

Os dados climáticos são apresentados na Figura 7. A temperatura média mensal variou entre 20,74 °C (outubro de 2003) e 22,74 °C (Dezembro de 2003).

As temperaturas ótimas para o desenvolvimento da maioria dos nematóides tricostrongilídeos parasitos gastrintestinais de bovinos estão compreendidas entre 20 e 30 °C (FREITAS, 1980). A temperatura ótima para o crescimento e atividade predatória de fungos nematófagos oscila entre 20 e 30° C (PANDEY, 1973; CASTRO *et al.*, 2003). Desta forma, as médias de temperatura observadas durante o período experimental foram favoráveis ao desenvolvimento das larvas infectantes e ao crescimento e ação do fungo.

Somente no mês de outubro de 2003 (início do período experimental) a precipitação pluviométrica ficou abaixo de 50 mm, que segundo WILLIAMS e MAYHEW (1967) seria o mínimo requerido para o desenvolvimento das larvas no ambiente. Entretanto alguns trabalhos no Brasil têm demonstrado que, para algumas larvas de nematóides, a umidade existente no bolo fecal e precipitações de 5 a 7 mm seriam suficientes para o seu desenvolvimento e posterior migração de larvas para a pastagem (LIMA, 1989 e 2000).



**Figura 5.** Valores médios mensais da contagem de ovos totais (T) (I) e dos gêneros *Cooperia* (Coop) *Haemonchus* (Haem) e *Oesophagostomum* sp. (Oeso) por grama de fezes (OPG) em bezerros do grupo tratado com pêletes de alginato de sódio contendo o fungo *Monacrosporium sinense* (A) (II) e do grupo sem tratamento (B) (III), e precipitação pluvial entre outubro de 2003 e março de 2004 no Município de Viçosa-MG.

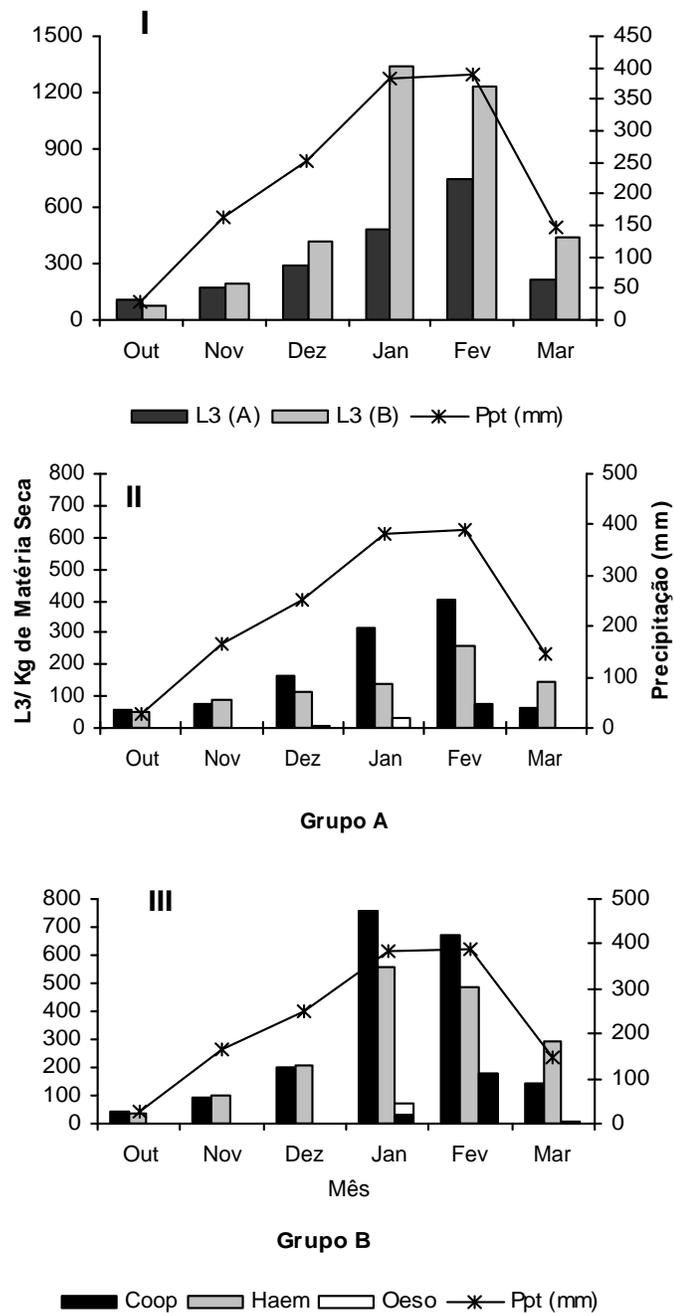
Segundo FURLONG *et al.*, 1985, as condições climáticas da região da Zona da Mata de Minas Gerais, são geralmente favoráveis à sobrevivência e ao desenvolvimento de *Haemonchus* e *Cooperia* durante o ano todo.

A partir do mês de outubro, a precipitação aumentou gradativamente atingindo o maior índice no mês de fevereiro. O aumento nos índices de precipitação coincidiu com o aumento do número de larvas de *Haemonchus* e *Oesophagostomum* recuperadas das pastagens e das coproculturas. Provavelmente, este fato está relacionado aos maiores índices de precipitação pluvial requeridos para o desenvolvimento destes gêneros no ambiente (ROBERTS *et al.*, 1952).

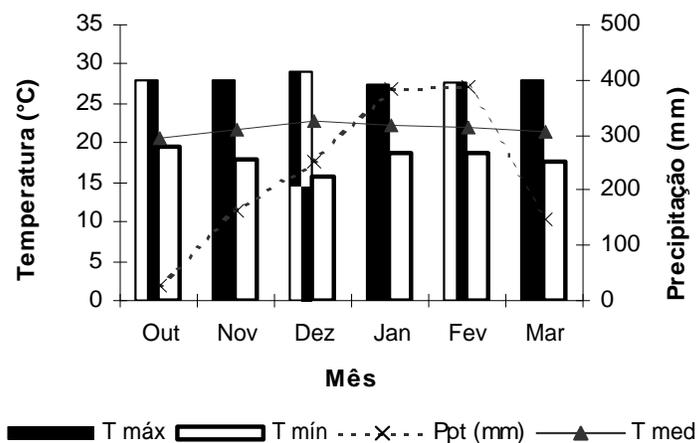
A ocorrência de altos índices pluviométricos geralmente está relacionada a uma baixa recuperação de larvas das gramíneas, pois, as chuvas torrenciais carreariam as larvas para o solo e para as regiões mais baixas do piquete. No presente trabalho, foi observada uma maior recuperação de larvas nos meses de maior precipitação pluvial. Este fato pode estar relacionado a um maior número de amostras coletadas de áreas onde se concentravam as larvas ou coletas realizadas mais próximas dos bolos fecais resultando numa maior contagem de larvas.

O fungo *M. sinense* foi recuperado em placas, das fezes dos bezerros do grupo tratado com péletes nos meses de outubro e março, mês em que também foi isolado fungo identificado como *Arthrobotrys musiformis*. Nas placas do grupo controle, no mês de outubro de 2003, foi encontrado um isolado do gênero *Arthrobotrys* sp. e no mês de fevereiro, um isolado não identificado devido à ausência de estruturas que permitissem sua identificação.

O isolamento do fungo *M. sinense* de amostras de fezes frescas dos bezerros somente nos meses de outubro de 2003 e março de 2004 pode ter ocorrido devido a problemas relacionados à sensibilidade da técnica, como relatado por MANUELLI *et al.* (1999) e aos dias de coleta de amostras de fezes, que podem não estar relacionados aos horários de maior eliminação dos péletes nas condições em que os animais experimentais se encontravam.



**Figura 6** - Número médio de larvas infectantes (L3) totais (I) e de *Cooperia* (Coop), *Haemonchus* (Haem) e *Oesophagostomum* (Oeso) por kg de matéria seca de gramínea coletadas em piquetes com bezerros do grupo tratado com péletes do fungo *Monacrsoporium sinense* (A) (II) e do grupo controle sem tratamento (B) (III), e precipitação pluvial entre os meses de outubro de 2003 e março de 2004.

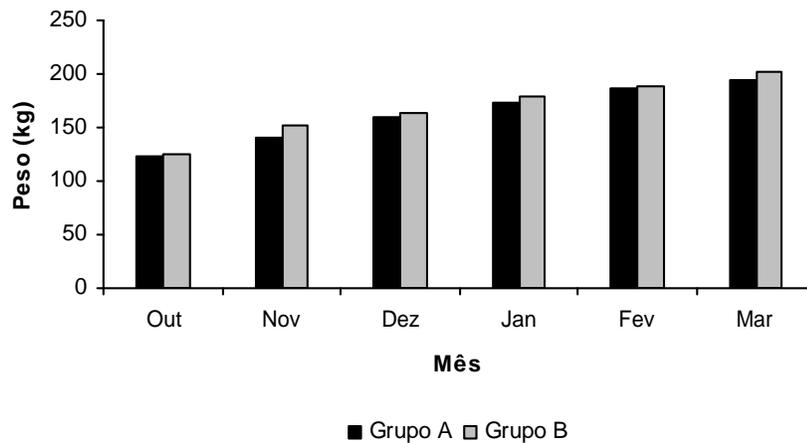


**Figura 7** - Médias mensais, das temperaturas máximas, mínimas e médias e precipitação pluvial mensal em Viçosa-MG de outubro de 2003 a março de 2004.

O isolamento de fungos nematófagos de outras espécies das fezes frescas dos animais se deve à ocorrência natural destes microrganismos no ambiente e à possibilidade de ocorrer naturalmente a passagem de estruturas fúngicas pelo trato gastrointestinal de ruminantes como já relatado por SAUMELL *et al.* (1999). Considerando que a resistência à passagem pelo trato gastrointestinal de ruminantes é um dos principais requisitos para que um isolado seja utilizado em programas de controle biológico de nematóides, a avaliação dos fungos isolados em futuros testes deve ser realizada.

A média de peso dos animais dos grupos A e B estão descritos na Figura 8. Ao final do período experimental não foram detectadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no ganho de peso dos animais do grupo tratado em relação aos animais do grupo controle.

A ausência de diferenças no ganho de peso de bezerros já foi observada em outros experimentos com fungos (RABELO, 2000) e pode ter ocorrido devido ao fato de, nas condições em que o experimento foi realizado, a carga parasitária presente no grupo controle não ser suficiente para causar danos aos animais.



**Figura 8** - Média de peso dos bezerros tratados com péletes de alginato de sódio contendo o fungo *Monacrosporium sinense* (grupo A) e sem tratamento, durante o período de outubro de 2003 a março de 2004, na região de Viçosa-MG.

Um dos maiores desafios para a aplicação prática do controle biológico de nematóides é o desenvolvimento de formulações com baixo custo, fácil aplicação alta eficácia e adaptada aos processos de produção industrial (WALLER e FAEDO, 1996; ARAÚJO *et al.*, 2000). A formulação em alginato de sódio contendo o fungo *Monacrosporium sinense* demonstrou ser uma alternativa viável no controle da infestação das pastagens nas condições avaliadas no presente experimento. Estudos com esta formulação contendo o fungo *M. sinense*, em outras épocas do ano e outras regiões com condições climáticas diferentes, devem ser realizados para permitir sua aplicação em programas de controle biológico de nematóides parasitos gastrintestinais de ruminantes.

## 8.0. CONCLUSÕES GERAIS

- Isolados brasileiros de fungos nematófagos apresentam variações inter e intra-específicas na atividade predatória sobre larvas infectantes de *Strongyloides papillosus*.
- A formação de armadilhas do isolado CG722 de *D. flagrans* ocorre 9 horas após o contato com larvas de *H. contortus*.
- A penetração da cutícula de *H. contortus* por *D. flagrans* ocorre 24 h após a captura do nematóide.
- O fungo *Duddingtonia flagrans* (CG722) é capaz de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal de caprinos após fornecimento oral de conídios, clamidósporos e micélio.
- O fungo *Duddingtonia flagrans* mantém atividade predatória sobre *Haemonchus contortus* e *Strongyloides papillosus* após passagem de clamidósporos pelo trato gastrointestinal de caprinos.
- Ocorre perda de capacidade predatória do fungo *Duddingtonia flagrans* após a passagem de conídios e micélio pelo trato gastrointestinal de caprinos.
- O tratamento de bezerros com péletes de alginato de sódio contendo massa micelial, duas vezes por semana durante seis meses, diminui a infestação das pastagens por larvas infectantes de *Haemonchus* sp., *Cooperia* sp. e *Oesophagostomum* sp. durante a estação chuvosa na região de Viçosa-MG, resultando em reduções significativas do OPG dos animais nos dois últimos meses de tratamento.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, P.H.; ARAÚJO, J.V.; GUIMARÃES, M.P.; ASSIS, R.C.L.; SARTI, P.; CAMPOS, A.K. Aplicação de formulação do fungo predador de nematóides *Monacrosporium thaumasium* (Drechsler, 1937) no controle de nematóides de bovinos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v.55, n.5, p. 568-573, 2003.

AMARANTE, A.F.T. Controle de endoparasitoses dos ovinos. In: **A produção animal na visão dos brasileiros**. Piracicaba: FEALQ, 2001. p.461-473.

AMARANTE, A. F. T. Controle integrado de helmintos de bovinos e ovinos. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.13, s.1, p.68-71, 2004.

AMARANTE, A. F. T. Controle da verminose ovina. *Revista CFMV.*, n.34, p.19-30, 2005.

AMARANTE, A.F.T.; BAGNOL, J.J., AMARANTE, M.R.V.; BARBOSA, M. A. Host specificity of sheep and cattle nematodes in São Paulo state, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.73, p.89-104, 1997.

AMARANTE, A.F.T. CRAIG, T.M.; RAMSEY, W.S.; DAVIS, S.K.; BAZER, F.W. nematode burdens and cellular responses in the abomasal mucosa and blood of Florida Native, Rambolliet and crossbred lambs. *Vet. Parasitol.*,v.80, p.311-324, 1999.

ANUALPEC 2003: Anuário estatístico da produção animal. São Paulo: **FNP-Consultoria & Comércio**,. 2003. 380 p.

ARAÚJO, F.R.; MADRUGA, C.R. Imunidade contra helmintos In: MADRUGA, C.R.; ARAÚJO, F.R.; SOARES, C.O (Eds). **Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. p.97-110.

ARAÚJO, J.V. Controle de nematóides parasitas de bovinos por fungos nematófagos. Uma nova alternativa? *Cad. Tec. Vet. Zoot.*, v 30 p. 75-88, 1999.

ARAÚJO, J.V. Predacious activity of *Arthrobotrys* spp isolates on infective *Cooperia punctata* larvae. *Bras. J. Res. Anim. Sci.*, v. 35, n.1, p.9-11, 1998.

ARAÚJO, J.V.; ASSIS, R.C.L.; CAMPOS, A.K.; MOTA, M.A. Atividade *in vitro* dos fungos nematófagos dos gêneros *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* e *Monacrosporium* sobre nematóides Trichostrongilídeos (Nematoda: Trichostrongyloidea) parasitos gastrintestinais de bovinos. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.13, n.2, p.65-71, 2004c.

ARAÚJO, J.V.; GOMES, A.P.S.; GUIMARÃES, M. P. Biological control of bovine gastrointestinal nematode parasites in southern Brazil by the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys robusta*. *Rev. Bras. Parasit. Vet.*, v. 47, p.117-122, 1998.

ARAÚJO, J.V.; GUIMARÃES, M. P., CAMPOS, A.K.; SÁ, N.C.; SARTI, P.; ASSIS, R.C.L. Control of bovine gastrointestinal nematodes parasites using pellets of the nematode- trapping fungus *Monacrosporium thaumasium*. *Cienc. Rural*, v.34, n. 2, p.457-463, 2004b.

ARAÚJO, J.V.; GUIMARÃES, M. P.; LIMA, P.A.S.; LIMA, W.S. Avaliação de tratamentos anti-helmínticos em bezerros da bacia leiteira de Muriaé. *Pesq. Agropec. Bras.*, v.27, n.1, p.7-14, 1992a.

ARAÚJO, J.V.; MOTA, M.A.; CAMPOS, A.K. Controle biológico de helmintos parasitos de animais por fungos nematófagos. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.13, s.1, p.165-171, 2004a.

ARAÚJO, J.V.; NETO, A.P.; AZEVEDO, M.H.F. Screening parasitic nematode-trapping fungi *Arthrobotrys* for passage through the gastrointestinal tract of calves. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v 48, p. 543-552, 1996.

ARAÚJO, J.V.; SANTOS, M.A.; FERRAZ, S.; MAIA, A.S.; MAGALHÃES, A.C.M. Controle de larvas infectantes de *Haemonchus placei* por fungos predadores da espécie *Monacrosporium ellypsosporum* em condições de laboratório. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* v.44, p.521-526, 1992b.

ARAÚJO, J.V.; SANTOS, M.A.; FERRAZ, S.; MAIA, A.S. Antagonistic effect of predacious *Arthrobotrys* fungi on infective *Haemonchus placei* larvae. *J. Helminthol.* , v.67, p. 136-138, 1993.

ARAÚJO, J.V.; SANTOS, M.A.; FERRAZ, S.; MAIA, A.S. Biological control "in vitro" of infective *Haemonchus placei* larvae by predacious fungi *Arthrobotrys musiformis*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v.46, n.3, p. 197-204, 1994.

ARAÚJO, J.V.; STEPHANO, M.A.; SAMPAIO, W.M. Passage of nematode trapping fungi through the gastrointestinal tract of calves. *Vet. Arhiv.*, v.69, n.2, p. 69-78, 1999.

ARAÚJO, J.V.; STEPHANO, M.; SAMPAIO, W. M. Effects of temperature, mineral salt and passage through gastrointestinal tract of calves on alginate formulation of *Arthrobotrys robusta*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 9, n.1, p. 55-59, 2000.

ASSIS, R.C.L. ARAÚJO, J.V.; GANDRA, J.R.; CAMPOS, A.K. Avaliação de fungos predadores do gênero *Monacrosporium* sobre larvas infectantes de *Haemonchus contortus* de caprinos. *Rev. Bras. Ci. Vet.*,v.12, n. 1/3, p.42-45, 2005.

BALAN, J., GERBER, N. Attraction and killing of the nematode *Panagrellus redivivus* by the predacious fungus *Arthrobotrys dactyloides*. *Nematol.*, v.18, p.163-173, 1972.

BARÇANTE, J.M.P.; BARÇANTE, T.A.; DIAS, S.R.C.; LIMA, W.S.; NEGRÃO-CORRÊA, D. A method to obtain axenic *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae from dog feces. *Parasitol. Res.*, v.89, p.89-93, 2003.

BARRON, G. L. **The nematode destroying fungi**. Topics in Microbiology. Canadian Biological Publications Ltdm Guelph, Canada, 140 pp., 1977.

BARRON, G.L.; THORN, R.G. Destruction of nematodes by species of *Pleurotus*. *Can. J. Bot.* v.65, p.774-778, 1987.

BIANCHIN, I. Epidemiologia dos nematódeos gastrintestinais em bovinos de corte nos cerrados e o controle estratégico no Brasil. In: **Controle dos nematódeos gastrintestinais dos ruminantes**. Terezinha Padilha (Ed.). Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1996. p.113-156.

BIANCHIN, I.; HONER, M.R.; NASCIMENTO, Y.A. The epidemiology of helminths in Nellore beef cattle in the cerrados of Brazil. In: *Epidemiology of bovine nematode parasites in the americas*. Guerreiro, J.; ILEANNING. W.H. D. (Eds)., 1990. p.41-49.

BIRD, J.; HERD, R.P. In vitro assessment of two species of nematophagous fungi (*Arthrobotrys oligospora* and *Arthrobotrys flagrans*) to control the development of infective cyathostome larvae from naturally infected horses. *Vet Parasitol.*, v.56, p.181-187, 1995.

BRUNDSON, R.V. Principles of helminth control. *Vet Parasitol.*, v. 6, p.185-215, 1980.

CAMPOS, A.K. **Efeito da criopreservação e de formulações sobre a viabilidade do fungo nematófago *Monacrosporium spp.*** Viçosa: Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, 48p., Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), 2002.

CAMPOS, V.P. Perspectivas do controle biológico de fitonematóides. *Inf. Agropec.*, v.16, p.26-30, 1992.

CASTRO, A.A.; OLIVEIRA, C.R.C.; ANJOS, D.H.S.; ORNELAS, E.I.; BITTENCOURT, V. R. E.; ARAÚJO, J.V.; SAMPAIO, I.B.M.; RODRIGUES, M.L.A. Potencial dos fungos nematófagos *Arthrobotrys* sp. e *Monacrosporium thaumasium* para o controle de larvas de ciatostomíneos de eqüinos (Nematoda: Cyathostominae). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* v.12, n.2, p.53-57, 2003.

CASTRO, A.A.; RODRIGUES, M.L.A.; ANJOS, D. H. S.; OLIVEIRA, C.R.C.; BITTENCOURT, V.R.E.; ARAÚJO, J.V. Avaliação do fungo *Monacrosporium thaumasium* Isolado NF34A) sobre as fases pré-parasíticas de Cyathostominae (Nematoda-Strongylidae) em coproculturas. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11, 1999, anais, Bahia, p.165,1999.

CAYROL, J.C., FRANKOWSKI, J.P. Une méthode de lutte biologique contre les nématodes à galles des racines appartenat au genre *Meloidogyne*. *Rev. Hort.*, v.193, p.15-23, 1979.

CAYROL, J.C., FRANKOWSKI, J.P., LANIECE, A. *et al.* Contre les nematodes en champignonnière. Mise au point d'une méthode de lutte biologique a l'aide d'un hyphomycete prédateur: *Arthrobotrys robusta* souche antipolis (Royal 300). *Rev Hort.*, v.184, p.23-30, 1978.

CHANDRAWATHANI, P.; JAMNAH, O.; WALLER, P.J. The control of the free-living stages of *Strongyloides papillosus* by the nematophagous fungus, *Arthrobotrys oligospora*. *Vet. Parasitol.*, v.76, p.321-325, 1998.

CHANDRAWATHANI, P. JAMNAH, O.; WALLER, P.J.; HÖGLUND, J.; LARSEN, M.; ZAHARI, W.M. Nematophagous fungi as a biological control agent for nematode parasites of small ruminants in Malaysia; a special emphasis on *Duddingtonia flagrans*. *Vet. Res.*, v.33, p.685-696, 2002.

CHARLES, T.P. Epidemiologia e controle de nematódeos de caprinos do Brasil. In: Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 7., 1991, São Paulo. Anais... São Paulo: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1991. p.65-68.

CHARLES, T. P. Disponibilidade de larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais parasitas de ovinos deslançados no semi-árido pernambucano. *Cienc. Rural*, v.25, n.3, p.437-442,1995.

CHARLES, T.P. FURLONG, J. A survey of dairy cattle worm control practices in Southeast Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.65, p.65-73, 1996.

CHARLES, T.P.; ROQUE, M.V.C.; SANTOS, C.P. Reduction of *Haemonchus contortus* infective larvae by *Harposporium anquillulae* in sheep faecal cultures. *Int. J. Parasitol.* v.26, n.5, p.509-510, 1996.

COOKE, R.C.; GODFREY, B.E.S. A key to nematode destroying fungi. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, v.47, n.1, p. 61, 74, 1964.

COOP, R.L.; KYRIAZAKIS, I. Nutrition-parasite interaction. *Vet. Parasitol.*,v.84, p.187-204, 1999.

COSTA, C.A.F.; VIEIRA, L. S. Controle de nematódeos gastrintestinais de caprinos e ovinos no Estado do Ceará. Sobral. CNPC, 1984. 6p. (EMBRAPA-CNPC. Comunicado Técnico, 13).

DIAS, W.P.; FERRAZ, S. Crescimento e esporulação de *Arthrobotrys* spp. Em diferentes substratos, meios de cultura, pH e níveis de temperatura. *Nematol. Bras.*, v.17, p.168-181, 1993.

DIAS, W.P.; FERRAZ,S.; MUCHOVEJ, J.J. Detecção, isolamento e identificação de fungos predadores de nematóides em amostras de solo de diferentes regiões do Brasil. *Rev. Ceres.* v.42, n.244, p. 615-620, 1995.

DRECHSLER, C. Some Hyphomycetes that prey on free-living terricolous nematodes. *Mycologia*, v.29, p.447-552, 1937.

DUPPONOIS, R.; AMADOU, M.B.; MATTEILE, T. Effect of some rhizospher bactéria for the biocontrol of nematodes of the genus *Meloidogyne* with *Arthrobotrys oligospora*. *Fund. Appl. Nematol.* V.2, p.157-163, 1998.

DURIE, P.H. Parasitic gastro-enteritis of cattle: Seasonal fluctuations in populations of Strongyle larvae on a calf pasture and their significance in infection of the grazing animal. *Aust. J. Agric. Res.*, v.13, p. 767-777, 1962

ECHEVARRIA, F. Epidemiologia de nematódeos e o controle estratégico em ovinos lanados. In: **Controle dos nematódeos gastrintestinais dos ruminantes**. Terezinha Padilha (Ed.). Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1996. p.157-168.

ECHEVARRIA, F.; BORBA, M.F.S.; PINHEIRO, A.C.; WALLER, P.J.; HANSEN, J.W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Brazil. *Vet. Parasitol.* v.62, p.199-206, 1996.

EMERY, D.L. Vaccination against worm parasites of animals. *Int. J. Parasitol.*, v.64, p.31-45, 1996.

ESLAMI, A.; RANJBAR-BAHADORI, S.; ZARE, R.; RAZZAGHI-ABYANEH, M. The predatory capability of *Arthrobotrys cladodes* var. *macroides* in the control of *Haemonchus contortus* infective larvae. *Vet. Parasitol.* (no prelo).

FAEDO, M.; LARSEN, M.; WALLER, P.J. The potential of nematophagous fungi to control free-living stages of nematodes parasites of sheep: comparison between Australian isolates of *Arthrobotrys* spp and *Duddingtonia flagrans*. *Vet. Parasitol.*, v.72, p. 149-155,1997.

FERNADEZ, A.S.; LARSEN, M.; HENNINGSEN, E.; NANSEN,P.; GRONVOLD, J.; BJORN, H.; WOLSTRUP, J. Effect of *Duddingtonia flagrans* against *Ostertagia ostertagi* in cattle grazing at different stocking rates. *Parasitol.*, v.119, p.105-111, 1999.

FIEL, C.A.; SAUMELL, C.A.; STEFFAN, P.E.; RODRIGUEZ, E.M. Resistance of *Cooperia* to ivermectin treatments in grazing cattle of the Humid Pampa, Argentina. *Vet Parasitol.* v.97p. 211-217, 2001.

FRAVEL, D.R., MAROIS, J.J., LUMSDEN, R.D.I, CONNICK, W. J. Encapsulation of potential biocontrol agents in an alginate- clay matrix. *Phytopathol.*, v.75, p.774-777, 1985.

FREITAS, M.G. **Helmintologia Veterinária**. Belo Horizonte: Editora Gráfica Rabelo. 1980. 396p.

FRISCH, J.E.; VERCOE, J.E. An analysis of different cattle genotypes reared in different environments. *J. Agric. Sci.*, v.103, p.137-153, 1984.

FURLONG, J.; ABREU, H.G.L. VERNEQUE, R.S. Parasitoses dos bovinos da zona da mata de Minas Gerais. I. Comportamento estacional de nematódeos gastrintestinais. *Pesq. Agrop. Bras.*, v.20, n.1, p.143-153, 1985.

GITHIGIA, S.M.; THAMSBORG, S.M.; LARSEN, M. KYVSGAARD, N.C.; NANSEN, P. The preventive effect of the fungus *Duddingtonia flagrans* on Trichostrongyle infections of lambs on pasture. *Int. J. Parasitol.*, v.27, p. 931-939, 1997.

GIRÃO, E.S.; GIRÃO, R.N.; MEDEIROS, L.P. Prevalência, intensidade de infecção e variação estacional de helmintos em bovinos no estado do Piauí. *Pesq. Agropec. Bras.*, v.20, n.8, p.889-897, 1985.

GOMES, A.P.S. **Controle biológico *in vivo* de nematódeos parasitos gastrintestinais de bovinos pelo fungo *Arthrobotrys robusta* e atividade *in vitro* de isolados do fungo *Monacrosporium* sobre nematódeos.** Viçosa: Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa. 81 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), 1998.

GOMES, A S.; ARAÚJO, J.V.; RIBEIRO, R.C.F. Differential *in vitro* pathogenicity of predatory fungi of the genus *Monacrosporium* for phytonematodes, free-living nematodes and parasitic nematodes of cattle. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.32, n.1, p.79-83, 1999.

GOMES, A.P.S. RAMOS, M.L.; VASCONCELLOS, R.S.; JENSEN, J.R.; VIEIRA-BRESSAN, M.C.R.; ARAÚJO, J.V. *In vitro* activity of brazilian strains of the predatory fungi *Arthrobotrys* spp. On free-living nematodes and infective larvae of *Haemonchus placei*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v. 95, n.6, p. 873-876, 2000.

GOMES, A.P.S.; VASCONCELLOS, R.S.; RAMOS, M.L.; GUIMARÃES, M.P.; YATSUDA, A.P.; VIEIRA-BRESSAN, M.C.R. *In vitro* interaction of Brazilian strains of the nematode -trapping fungi *Arthrobotrys* spp. on *Panagrellus* sp. and *Cooperia punctata*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v.96, n.6, p. 861-864, 2001.

GONZALEZ-CRUZ, M.E.; MENDOZA-de-GIVES, P. QUIROZ-ROMERO, H. Comparison of the ability of *Arthrobotrys robusta* and *Monacrosporium ghyropagum* on infective larvae of *Strongyloides papillosus*. *J. Helminthol.*, v.72, p. 209-213, 1998.

GORDON, H. M.; WHITLOCK, H. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *J. Coun. Sci. Ind. Res.* V.12, p.50-52, 1939.

GRAY, N. F. Fungi attacking vermiform nematodes. In: POINAR Jr., G. O. & JANSSON, H. B. (Eds). **Disease of nematodes**, vol. 2 Boca Raton, CRC Press, 1988, p. 3-38.

GRONVOLD, J.; KORSHOLM, H.; WOLSTRUP, J; NANSEM, P.; HENRIKSEN, S. A. Laboratory experiments to evaluate the ability of *Arthrobotrys oligospora* to destroy infective larvae of *Cooperia* species, and to investigate the effect of physical factors on the growth of the fungus. *J. Helminthol.*, v. 59, p.119-125, 1985.

GRONVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; NANSEM, P.; HENRIKSEN, S. A.; LARSEN, M.; BRESCIANI, J. Biological control of nematode parasites in cattle with nematode trapping fungi: a survey of Danish studies. *Vet. Parasitol.* v.48, p.311-325, 1993.

GRONVOLD, J., HENRIKSEN, S. A, LARSEN, M., NANSEN, P., WOLSTRUP, J. Aspects of biological control - With special reference to arthropods, protozoans and helminths of domesticated animals. *Vet. Parasitol.*, v.64, p.47-64,. 1996.

HASHMI, H.A.; CONNAN, R.M. Biological control of ruminant trichostrongylidae by *Arthrobotrys oligospora*, a predacious fungus. *Parasitol. Today*, v.5, n.1, p.28-30, 1989.

HERD, R. Impactos ambientais associados aos compostos endectocidas. In: **Controle dos nematódeos gastrintestinais dos ruminantes**. Terezinha Padilha (Ed.). Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1996. p.95-111.

HOFFMANN, R.P. Diagnóstico de parasitismo veterinário. Porto Alegre: Sulina, 1987. 156p.

HONER, M.R.; BIANCHIN, I. Considerações básicas para um programa de controle estratégico da verminose bovina em gado de corte no Brasil. Campo Grande: Embrapa-CNPGC,. 53p. (Embrapa-CNPGC. Circular Técnica 20). 1987.

HONER, M. R VIEIRA –BRESSAN, M.C.R. Nematódeos de bovinos no Brasil - o estado da pesquisa. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.1, p.67-69, 1992.

JACKSON, F. Anthelmintics - What's the alternative? *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.13, s.1, p.62-8, 2004.

JANSSON, H.B.; NORDBRING-HERTZ, B. Interactions between nematophagous fungi and plant parasitic nematodes: Attraction, induction of trap formation and capture. *Nematol.*, v.26, p.383-389, 1980.

JANSSON, H.B.; NORDBRING-HERTZ, B. Involvement of sialic acid in nematode chemotaxis and infection by an endoparasitic nematophagous fungi, *J. Gen. Microbiol.* , v.130, p.39-43, 1984.

JANSSON, H.B.; POINAR, O.G. Some possible fossil nematophagous fungi. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, v.87, p. 471-474, 1986.

KEITH, R.K. The differentiation on the infective larvae of some common nematode parasites of cattle. *Austr. J. Zool.*, v.1, p.223-235, 1953.

KNOX, M.R.; FAEDO, M. Biological control of field infections of nematode parasites of young sheep with *Duddingtonia flagrans* and effects of spore intake on efficacy. *Vet. Parasitol.*, v.101, p.155-160, 2001.

KNOX, D.P.; SMITH, W.D. Vaccination against gastrointestinal nematode parasites of ruminants using gut-expressed antigens. *Vet. Parasitol.* v. 100, p. 21-32, 2001.

LARSEN, M. Biological Control of Helminths. *Int. J. Parasitol.*, v.29, p.139-146, 1999.

LARSEN, M. Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious microfungi. *Parasitol.* v.120, p. 121-131, 2000.

LARSEN, M.; FAEDO, M.; WALLER, P. J. The potential of nematophagous fungi to control the free living stages of nematode parasites of sheep: studies with *Duddingtonia flagrans*. *Vet. Parasitol.* v.76, p.121-128, 1998.

LARSEN, M.; NANSEN, P. Ability of the fungus *Pleurotus pulmonarius* to immobilise preparasitic nematode larvae. *Res. Vet. Scienc.*, v.51, p.246-249, 1991.

LARSEN, M.; WOLSTRUP, J.; HENRIKSEN, S.A.; GRONVOLD, J.; NANSEN, P. In vivo passage through calves of nematophagous fungi selected for biocontrol of parasitic nematodes. *J. Helminthol.* v.66, n.2, p.137-141, 1992.

LARSEN, M.; NANSEN, P.; WOLSTRUP, J.; GRONVOLD, J.; HENRIKSEN, S.; ZORN, A. Biological control of trichostrongyles in calves by the fungus *Duddingtonia flagrans* fed to animals under natural grazing conditions. *Vet. Parasitol.*, v.60, p. 321-330, 1995b.

LARSEN, M.; NANSEN, P.; HENRIKSEN, S.A.; WOLSTRUP, J.; GRONVOLD, J.; ZORN, A.; WEDO, E. Predacious activity of the nematode trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against cyathostome larvae in faeces after passage through the gastrointestinal tract of horses. *Vet. Parasitol.*, v.60, p.315-320, 1995a.

LEWIS, J.A.; PAPAIVIZAS, G.C. Application of *Trichoderma* and *Gliocladium* in alginates pellets for control of *Rhizoctonia* damping-off. *Plant Pathol.*, v.36, p.438-446, 1987.

LEWIS, J.A.; PAPAIVIZAS, G.C. Effect of mycelial preparations of *Trichoderma* and *Gliocladium* on populations of *Rhizoctonia solani* and the incidence of damping off. *Phytopatology*, v.75, p.812-817, 1985

LIERANDI-JUÁREZ, R.D.; MENDOZA-de-GIVES, P. Resistance of chlamydospores of nematophagous fungi to the digestive processes of sheep in Mexico. *J. Helminthol.*, v.72, p.155-158, 1998.

LIMA, W.S. Controle das helmintoses dos bovinos. In: BRESSAN, M. Práticas de manejo sanitário em bovinos de leite. Juiz de Fora: EMBRAPA Gado de leite, 2000. 65 p.

LIMA, W.S. **Dinâmica das populações de parasitos gastrintestinais em bovinos de corte, alguns aspectos da relação parasito-hospedeiro e do comportamento dos estádios de vida livre na região do vale do Rio Doce, MG. Brasil.** Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 1989. 178p. (Tese, doutorado).

LIMA, J.D.; LIMA, W.S.; GUIMARÃES, A.M.; LOSS, A.C.S.; MALACCO, M.A. Epidemiology of bovine nematode parasites in southeastern Brazil. In: *Epidemiology of bovine nematode parasites in the Americas*. Guerreiro, J.; ILEANING, W.H. D. (Eds), 1990, p.41-49.

LIU, X.Z.; ZHANG, K.Q. Nematode-trapping species of *Monacrosporium* with special reference to two new species. *Mycol. Res.*, v. 98, n.8, p.862-868, 1994.

LOHMANN, U.E.; SIKORA, R.A. Mass production of the endoparasitic fungi *Drechmeria coniospora*, *Verticillium balanoides* e *Harposporium anguillulae* in liquid culture. *Nematol.*, v.85, p. 97-104, 1989.

LYSEK, H.; NIGENDA, G. Capacidad de deshelmintización del suelo. *Salud Publica Mex.*, v.31, p.763-771, 1989.

MACHADO, V. O. F.; CAMPOS, V. P. Cultivo de fungos antagonistas em diferentes substratos e avaliação no controle de *Meloidogyne javanica*. *Fitopatol. Bras.*, v. 22, n. 3, p. 387-391, 1997.

MAIA, A. S.; SANTOS, J.M.; DI MAURO, A.O. Estudo *in vitro* da habilidade predatória de *Monacrosporium robustum* sobre *Heterodera glycines*. *Fitopatol. Bras.*, v. 26, n.4, 732, 736, 2001.

MAHONEY, C.J.; STRONGMAN, D.B. Nematophagous fungi from cattle manure in four states of decomposition at three sites in Nova Scotia, Canada. *Mycologia*, v.86, n.3, p.371-375, 1994.

MANKAU, R. Biological control of nematode pests by natural enemies. *Ann.Rev. Phytopatol.*, v.18, p.415-440, 1980.

MANUELLI, P.R.; WALLER, P.J.; FAEDO, M.; MAHOMMED, F. Biological control of nematode parasites of livestock in Fiji: screening of fresh dung of small ruminants for the presence of nematophagous fungi. *Vet. Parasitol.*, v.81, p. 39-45, 1999.

MELO, L.M.; BEVILACQUA, C.M.L.; ARAÚJO, J.V.; MELO, A.C.F.L. Atividade predatória do fungo *Monacrosporium thaumasium* contra o nematóide *Haemonchus contortus* após passagem pelo trato gastrintestinal de caprinos. *Cienc. Rural*. v.33, n.1, p. 169-171, 2003.

MELO, I.S.; SANHUEZA, R.M.V. **Métodos de seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos**. Jaguariúna: EMBRAPA - CNPMA,. 72 p. (EMBRAPA - CNPMA. Documentos, 1). 1995.

MENDOZA-de-GIVES, P. **Interaction between nematodes and biocontrol agents with potential for use in biomanagement systems**. Nottingham: University of Nottingham, 1999. 219 p. (Doctor of Philosophy Thesis).

MENDOZA-de-GIVES, P.; FLORES-CRESPO, J.; HERRERA-RODRIGUES, D.; VASQUEZ-PRATS, V.; LIEBANO HERNANDEZ, E.; ONTIVEROS-FERNADEZ, G.E. Biological control of *Haemonchus contortus* infective larvae in ovine faeces by administering an oral suspension of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to sheep. *J. Helminthol.*, v72, p.343-347, 1998.

MENDOZA-de-GIVES, P.; DAVIES, K.G.; CLARK, S.J.; BEHNKE, J.M. Predatory behavior of trapping fungi against *srf* mutants of *Caenorhabditis elegans* and different plant and animal parasitic nematodes. *Parasitol.*, v.119, p. 95-104, 1999.

MENDOZA-de-GIVES, P.; ZAVALETA-MEJIA, E.; HERRERA-RODRIGUES, D.; QUIROZ-ROMERO, H. *In vitro* trapping capability of *Arthrobotrys spp* on infective larvae of *Haemonchus contortus* and *Nacobus aberrans*. *J. Helminthol.*, v.68, p.223-229, 1994.

MENDOZA-de-GIVES, P.; ZAVALETA-MEJIA, E.; QUIROZ-ROMERO, H.; HERRERA-RODRIGUES, D.; PERDOLMO- ROLDAN, F. Interaction between the nematode destroying fungus *Arthrobotrys robusta* (Hyphomycetales) and *Haemonchus contortus* infective larvae in vitro. *Vet, Parasitol.* v.41, p. 101-107, 1992.

MILLER, J.E. GRAY, G.D. Resistência genética a helmintos em ruminantes. In: **Controle dos nematódeos gastrintestinais dos ruminantes**. Terezinha Padilha (Ed.). Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL,. p.237- 257, 1996.

MORGAN JONES, G.; RODRIGUEZ-KÁBANA, R. Infections events in the fungus-nematode system. In: **Diseases of Nematodes**. POINAR, O.G.; BORNE, J.H., CRC press, Boca Raton, USA, 1988, p.59-62.

MOTA, M.A. **Efeito dos processos de preservação sobre a viabilidade dos fungos predadores de nematóides *Arthrobotrys robusta* e *Monacrosporium thaumasium***, Viçosa, Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, 61p. 2002, (Tese de Mestrado).

MOTA, M.A.; BEVILAQUA, C.M.L.; ARAÚJO, J.V. Atividade predatória de fungos *Arthrobotrys robusta* e *Monacrosporium thaumasium* sobre larvas infectantes de *Haemonchus contortus* de caprinos. *Cienc. Animal*, v.10, p.37-41, 2000.

MURRAY, M. The parasites, predators, places and people I have known: a great adventure *Vet. Parasitol.*,v.81, p.149-158, 1999.

NANSEN, P.; GRONVOLD, J.; HENRIKSEN, S.A.; WOLSTRUP, J. Predacious activity of the nematode-destroying fungus *Arthrobotrys oligospora*, on preparasitic larvae of *Cooperia oncophora* and on soil nematodes. *Proc. Heminthol. Soc. Wash.*, v.53, n.2, p.237-243, 1986.

NANSEN, P.; GRONVOLD, J.; HENRIKSEN, S.A.; WOLSTRUP, J. Interactions between the predacious fungus *Arthrobotrys oligospora* and third-stage larvae of a series of animal-parasitic nematodes. *Vet. Parasitol.*, v.26, p.329-337, 1988.

NAVES, R.L.; CAMPOS, V.P. Ocorrência de fungos predadores de nematóides no sul de Minas Gerais e estudo da capacidade predatória e crescimento *in vitro* de alguns de seus isolados. *Nematol. Bras.*, v. 15, p.153-162, 1991.

NORDBRING-HERTZ, B. Dialysis Membrane Technique for Studying Microbial Interaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.45, p. 399-407, 1983.

NORDBRING-HERTZ, B. Nematophagous fungi: Strategies for nematode exploitation and for survival. *Microbiol. Sci.*, v.5, p. 108-116, 1988.

NORDBRING-HERTZ , B. STALHAMMAR-CARLEMALM, M. Capture of nematodes by *Arthrobotrys oligospora*, an electron microscope study .*Can J. Bot.*, v. 56, p. 1297-1307, 1977.

OJEDA-ROBERTOS, N.F.; MENDOZA-de-GIVES, P.; TORRES-ACOSTA, J.F.J; RODRÍGUEZ-VIVAS, R.I.; AGUILLAR-CABALLERO, A.J. Evaluating the effectiveness of a Mexican strain of *Duddingtonia flagrans* as a biological control agent against gastrointestinal nematodes in goat faeces. *J. Helminthol.*, v.79, p. 151-157, 2005.

PADILHA, T. Controle da verminose gastrintestinal em pequenos ruminantes nas regiões áridas e semi-áridas do nordeste do Brasil In: **Controle dos nematódeos gastrintestinais dos ruminantes**. Terezinha Padilha (Ed.). Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1996. p.169-178.

PADILHA, T.; MENDOZA-de-GIVES, P. Controle microbiano das formas de vida livre dos nematódeos tricostrongilídeos: Uma alternativa para higienização das pastagens. In: **Controle dos nematódeos gastrintestinais dos ruminantes**. Terezinha Padilha (Ed.). Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1996. p.215-237.

PAIVA, F.; SATO, M.O.; ACUÑA, A.H.; JENSEN, J.R.;BRESSAN, M.C.R.V. Resistência a ivermectina constatada em *Haemonchus placei* e *Cooperia punctata* em bovinos. *Hora vet.*, v.120,p.29-34, 2001.

PANDEY, V.S. Predatory activity of nematode trapping fungi against the larvae of *Trichostrongylus axei* and *Ostertagia ostertagi*: a possible method of biological control. *J. Helminthol.*, v.57, p.35-48, 1973.

PAPAVIZAS, G. C.; DUNN, M.T. LEWIS, J.A.; BEDELE-RISTAINO,J. Liquid fermentation technology for experimental production biocontrol fungi. *Phytopatol.*,v. 74, p.1171-1175, 1984.

PARAUD, C.; PORS, I.; CHARTIER, C. Activity of *Duddingtonia flagrans* on *Trichostrongylus colubriformis* larvae in goat feces and interaction with a benzimidazole treatment. *Small Rum. Res.* v.55, p.199-209. 2004.

PARAUD, C.; CABARET, J.; PORS, I.; CHARTIER, C. Impact of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on *Muellerius capillaris* larvae in goat faeces. *Vet. Parasitol.*, v.131, p.71-78, 2005.

PARNELL, I.W.; GORDON, H.M. Predaceous fungi: a possible method of biological control of parasitic nematodes. *J. Heminthol.*, v.37, n.4p.339-342, 1963.

PELLOILE, M. Selection of nematode trapping fungi for the use in biological control. In: **Methods for Studying nematophagous fungi** KERRY, B.R.; CRUMP, D.H. (Eds). London, IOBC/WPRS 1991. p.13-17.

PEÑA, M.T. MILLER, J.E.; FONTENOT, M.E.; GILLESPIE, a.; LARSEN, M. Evaluation of *Duddingtonia flagrans* in reducing infective larvae of *Haemonchus contortus* larvae in feces off sheep. *Vet. Parasitol.*, v.103, p.259-265, 2002.

PIENAAR, J.G.; BASSON, P.A.; PLESSIS, J. L.D.; COLLINS, H.M.; NAUDE, T.W.; BOYAZOGLU, P.A.; BOOMKER, J.; REYERS, F.; PIENAAR, W.L. Experimental studies with *Strongyloides papillosus* in goats. *Ond. J. Vet Res.*, v. 66, p. 191-235, 1999.

PINHEIRO, A.C.; ECHEVARRIA, F.A.M. Suscetibilidade de *Haemonchus* spp. Em bovinos ao tratamento com anti-helmíntico com albendazole e oxfendazole. *Pesq. Vet. Bras.* v. 10, p.19-21, 1990.

PRAMER, D. Nematode-trapping fungi. *Science*, v. 144, n.6, p.382-388, 1964.

PRICHARD, R. K. Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. *Trends Parasitol.* v.17, n.9, p.445-453, 2001.

RABELO, A. M. G. **Avaliação da sobrevivência dos fungos nematófagos *Arthrobotrys musiformis* e *Duddingtonia flagrans* após incorporação e armazenamento em suplementos alimentares de ruminantes.** Belo Horizonte: UFMG, Instituto de Ciências Biológicas, 2000.122p. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Universidade Federal de Minas Gerais.

RAMOS, C.I.; BELLATO, V. SOUZA, A. P.; AVILA, V.S.; COUTINHO, G.C.; DALAGNOL, C. A. Epidemiologia das helmintoses gastrintestinais de ovinos no Planalto Catarinense. *Cienc. Rural.*, v.34, n.6, p.1889-1895, 2004.

RANGEL, V.B.; LEITE, R.C. OLIVEIRA, P.R.; SANTOS, E. J. Resistência de *Cooperia* spp. e *Haemonchus* spp. às avermectinas em bovinos de corte. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, n.2, p.186-190, 2005.

REINECK, R.K. A field study of some nematode parasites of bovines in a semi-arid area, with special reference to their biology and possible methods of prophylaxis, *Onderstepoort J. Vet. Res.* v.28, p. 365-464, 1960.

RIBEIRO, S.D.A. Caprinocultura: Criação racional de caprinos. Nobel, São Paulo, 1997.

RIBEIRO, R.C.F.; FERRAZ, S.; MIZOBUTSI, E.H.; MENEZES, M. Levantamento de espécies de *Monacrosporium* predadoras de nematóides em diversas regiões brasileiras. *Nematol. Bras.* v.23, n.2, p.41-47, 1999.

RIBEIRO, R.R. Atividade predatória sobre larvas de Trichostrongilídeos de isolados fúngicos do gênero *Monacrosporium* após passagem pelo trato gastrintestinal de bovinos. Viçosa: Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa. 44 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), 2003.

ROBERTS, F.H.S.; O, SULLIVAN, P.J. RIEK, R.F. the epidemiology of parasitic gastro-enteritis of cattle. *Aust. J. Agri. Res.* v.3, p 187-226, 1952.

RODRIGUES, M.L.A.; CASTRO, A.A.; OLIVEIRA, C.R.R.; ANJOS, D.H.S.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; ARAÚJO, J.V. Capacidade predatória de *Arthrobotrys* sp. e *Monacrosporium thaumasium* sobre larvas de ciatostomíneos. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* v.10, n.2, p. 51-54, 2001.

SALGADO, S.M.L., CAMPOS, V.P. Formulação do fungo *Arthrobotrys conoides* em alginato de sódio para o controle de nematóides. *Nematol. Bras.*, v.17, p.141-151, 1993.

SANTIAGO, M. A. M.; BENEVENGA, S. F.; COSTA, U. C. Epidemiologia e controle da helmintose ovina no município de Itaquí, Rio Grande do Sul. *Pesq. Agropec Bras.*, v.11, p.1-77, 1976.

SANTOS, C.P.; PADILHA, T.; RODRIGUES, M.L.A. Atividade predatória de *Arthrobotrys oligospora* e *Duddingtonia flagrans* nos estádios larvares pré-parasitários de *Cyathostominae* sob diferentes temperaturas constantes. *Cienc. Rural.* v.31, n.5, p.839-842, 2001.

SAUMELL, C.A.; PADILHA, T. Influence of weather and time of deposition on sheep faeces colonization by nematophagous fungi in the Mata region of Minas Gerais state, Brazil. *App. Soil Ecol.*, v.14, p.63-70, 2000.

SAUMELL, C.A.; PADILHA, T.; SANTOS, C,P.; ROQUE, M.V.C.P. Nematophagous fungi in fresh faeces of cattle in the Mata region of Minas Gerais state, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.82, p. 217-220, 1999.

SAUMELL, C.A.; PADILHA, T.; SANTOS, C, P. Nematophagous fungi in sheep faeces in Minas Gerais, Brazil. *Mycol Res.*,v.104, n.8, p.1005-1008, 2000.

SCHOLLER, M.; HAGEDORN, G.; RUBNER, A. A reevaluation of predatory orbiliaceus fungi. II. A new generic group. *Sydowya*, p. 89-113, 1999.

SIEFKER, C., RICKARD, L.G. Vaccination of calves with *Haemonchus placei* intestinal homogenate. *Vet. Parasitol.*, v.89, p. 249-260, 2000.

SILVA, W.W. **Aspectos epidemiológicos e controle biológico de nematóides gastrintestinais de caprinos pelo fungo *Monacrosporium thaumasium* (Drechsler, 1937) em ecossistema semi-árido do Nordeste-Brasil.** Rio de Janeiro Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Parasitologia Animal, 2003. 53 p. Tese (Doutorado).

SOPRUNOV, F.F. Predacious hyphomycetes and their application in the control of pathogenic nematodes. Ashkhabad, 1958, 365 p. Jerusalem: Israel program SPIEGEL for Scientific translation, 292 pp (traduzido do russo por MEMCHINOK, S.)

STIRLING, G.R. **Biological Control of Plant Parasitic nematodes.** CAB International. Wallingford, United Kingdon. 282pp,1991.

STIRLING, G.R.; MANI, A. The activity of nematode-trapping fungi following their encapsulation in alginate. *Nematologica*, v.41, p. 240-250, 1995.

STIRLING, G.R.; SMITH, L.J. Field tests of formulated products containing either *Verticillium chlamydosporium* or *Arthobotrys dactiloydes* for biological control of root-knot nematodes. *Biol. Contr.*, v.11, p. 231- 239, 1998.

STEAR, M.J.; MURRAY, M. Genetic resistance to parasitic disease: particularly of resistance in ruminants to gastrointestinal nematodes. *Vet. Parasitol.*, v.54, p.161-176, 1994.

STROMBERG, B.E; AVERBECK, G.A. The role of parasite epidemiology in the management of grazing cattle. *Int. J. Parasitol.*, v.29, p. 33-39, 1997.

SUAREZ, V.H. Helminthic control on grazing ruminants and environmental risks in South America. *Vet. Res.*, v.33, p.563-573, 2002.

TAIRA, N.; NAKAMURA, Y.; TSUJI, N.; KUBO, M; URA, S. Sudden death of calves by experimental infection with *Strongyloides papillosus*. I. Parasitological observations. *Vet. Parasitol.*, v.42,n.3-4, p. 247-256, 1992

TERRIL, T.H. LARSEN, M.; SAMPLES, O.; HUSTED, S.; MILLER, J.H. KAPLAN, R.M.; GELAYE, S. Capability of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* to reduce infective larvae of gastrointestinal nematodes in goat faeces in the southeastern United States: dose titration and dose time interval studies. *Vet. Parasitol.* V.120, p. 285-296, 2004.

THAMSBORG, S.M.; POEPSTORFF, A.; LARSEN, M. Integrated and biological control of parasites in organic and conventional production systems. *Vet. Parasitol.*, v.84, p. 169-186, 1999.

TORINA, A.; FERRANTELLI, V.; SPARAGANO, O.A.E.; REALE,S.; VITALE, F.; CARACAPPA, S. Climatic conditions and gastrointestinal nematode egg production. Observation in breeding sheep and goats. *Ann.N.Y.Acad. Sci.* v. 1026, p.203-209, 2004.

UENO, H & GONÇALVES, P.C. 1998. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. Japan International Cooperation Agency, 4 ed., 142 p.

URQUHART, G.M; ARAMOUR,J.; DUNCAN.J.L. **Veterinary Parasitology**. Blackwell Science. London, United Kingdom, 307pp., 1996.

VAN GUNDY, S.D. **Biological control of nematodes**. In: Hoy, M. A. HERZOG, D.C. Biological control in agricultural IPM systems {S.l.:s.n.}, 1985.

VAN-OORSCHOT, C.A.N. Taxonomy of the *Dactylaria* complex. A review of *Arthrobotrys* and allied genera. *St. Mycol.*, v.26, p.61-95, 1985.

VEENHUIS, M.; NORDBTING-HERTZ, B.; HARDER, W. An electron microscopical analysis of capture and initial stages of nematodes by *Arthrobotrys oligospora*. *Ant. Van Leeuw.*, v.51, p. 385-398, 1985.

VIEIRA, L.S. CAVALCANTE, A.C.R. Resistência anti-helmíntica em rebanhos caprinos no Estado do Ceará. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 19, n.3/4, p.99-103, 1999.

WALKER, H.L., CONNICK, W.J. Sodium alginate for production and formulation of mycoherbicides. *Weed Sci.*, v.31, p. 333-338, 1983.

WALLER, P.J. Controle integrado de nematódeos parasitos de ruminantes. **Controle dos nematódeos gastrintestinais dos ruminantes**. Terezinha Padilha (Ed.). Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1996a. p.179-195.

WALLER, P.J. Prospects for biological control of nematodes of parasites of ruminants. *New. Z. Vet. Jour.*, v.40, p.1-3, 1992.

WALLER, P.J. Sustainable helminth control of ruminants in developing countries. *Vet. Parasitol.*, v.71 p.195-207, 1997.

WALLER, P.J Sustainable nematode parasite control strategies for ruminant livestock by grazing management and biological control. *Anim. Feed Sci. Technol* .2005(no prelo).

WALLER, P.J. Workshop summary: Sustainable production systems. *Vet. Parasitol.* v. 54, n.1-3, p.305-307, 1996b.

WALLER, P.J.; ECHEVARRIA, F.; EDDI, C.; MACIEL, S.; NARI, A.; HANSEN, J.W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematodes parasites of sheep in Southern Latin America: General over view. *Vet. Parasitol.*, v.62, p. 181-187, 1996.

WALLER, P.J.; FAEDO, M. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematodes parasites of sheep: screening studies. *Vet Parasitol.*, v.49, p.285-297, 1993.

WALLER, P.J.; FAEDO, M. The prospect for biological control of the free-living stages of nematode parasite of livestock. *Int. J. Parasitol.*, v.26, p.915-925, 1996.

WALLER, P.J.; FAEDO, M.; ELLIS, K. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematodes parasites of sheep: towards the development of a fungal controlled release device. *Vet. Parasitol.*, v.102, p.321-330, 2001b.

WALLER, P.J., KNOX, N.R., FAEDO, M. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: feed and block studies with *Duddingtonia flagrans*. *Vet. Parasitol.*, v.102, p.330-336, 2001a.

WALLER, P.J., LARSEN, M. The role of nematophagous fungi in the biological control of nematode parasites of livestock. *Int. J. Parasitol.*, v.23, p.539-546, 1993.

WALLER, P.J.; LARSEN, M.; FAEDO, M.; HENESSY, D.R. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: "in vitro" and "in vivo" studies. *Vet. Parasitol.*, v.51, p. 289-299, 1994.

WILLIAMS, J.C.; MAYHEW, R.L. Survival of infective larvae of the cattle nematodes, *Cooperia punctata*, *Trichostrongylus axei* and *Oesophagostomum radiatum*. *Am. J. Vet. Res.*, v.28, p.629-640, 1967.

WIMBLE, D.B.; YOUNG, T.W.K. Ultra structure of the infection of nematodes by *Dactylella lysipaga*. *N. Hewid.*, v.40, p.9-29, 1984.

WOLSTRUP, J.; GRONVOLD, J.; HENRIKSEN, S.A.; NANSEM, P.; LARSEN, M.; BOGH, H.O.; ILSOE, B. An attempt to implement the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* in biological control of trichostrongylidae infections of first year grazing calves. *J. Helminthol*, v. 68, p.175-180, 1994.

## 10. APÊNDICE

**Tabela 8** – Resumo da Análise de Variância do número médio de larvas por placa de Petri com colônias de fungos dos gêneros *Arthrobotrys*, *Duddingtonia*, *Monacrosporium* e *Nematoctonus*.

F.V.	G.L.	QUADRADOS MÉDIOS
TRATAMENTO	17	334,1800
REPETIÇÃO	4	
RESÍDUO	72	3.310256
C.V. (%)		26,002

\* F significativo ao nível de 5% de probabilidade.

\*\* F significativo ao nível de 1% de probabilidade.

ns - F não significativo a 5% de probabilidade.

**Tabela 9.** Resumo da Análise de Variância do percentual de desenvolvimento larvar para *Haemonchus contortus*, nos intervalos amostrados e o coeficiente de variação (C.V.) (%)

F.V.	G.L.	QUADRADOS MÉDIOS
TRATAMENTO (T)	3	0,0004378222
RESÍDUO (a)	16	0,0000325793
HORÁRIO DE COLETA (HC)	7	0,0001503351
HC X T	21	0,0000510290**
RESÍDUO (b)	112	0,0000168448
RESÍDUO COMBINADO	119	0,000018812
C.V. (%) SUBPARCELA		28,74

\* F significativo ao nível de 5% de probabilidade.

\*\* F significativo ao nível de 1% de probabilidade.

ns - F não significativo a 5% de probabilidade.

**Tabela 10** – Resumo da Análise de Variância do Percentual de desenvolvimento larvar de *Strongyloides papillosus*, dos meses amostrados e o coeficiente de variação (C.V.) (%)

F.V.	G.L.	QUADRADOS MÉDIOS
TRATAMENTO (T)	3	0,002900607
RESÍDUO (a)	16	0,000343565
HORÁRIO DE COLETA (HC)	7	0,001325521
HC X T	21	0,000129360*
RESÍDUO (b)	112	0,000071328
RESÍDUO COMBINADO	74	0,000105358
C.V. (%) SUBPARCELA		27,55

\* F significativo ao nível de 5% de probabilidade.

\*\* F significativo ao nível de 1% de probabilidade.

ns - F não significativo a 5% de probabilidade.

**Tabela 11.** Resumo da Análise de Variância do número de ovos por grama (OPG), durante os meses amostrados e o coeficiente de variação (C.V.) (%)

F.V.	G.L.	QUADRADOS MÉDIOS
TRATAMENTO (T)	1	0,2268
RESÍDUO (a)	18	1,0504
MESES (M)	5	11,9676
M X T	5	1,5095**
RESÍDUO (b)	90	0,1414
RESÍDUO COMBINADO	46	0,2929
C.V. (%) SUBPARCELA		18,34

\* F significativo ao nível de 5% de probabilidade.

\*\* F significativo ao nível de 1% de probabilidade.

ns - F não significativo a 5% de probabilidade.

**Tabela 12** – Resumo da Análise de Variância do número de ovos de *Haemonchus* sp., durante os meses amostrados e o coeficiente de variação (C.V.) (%)

F.V.	G.L.	QUADRADOS MÉDIOS
TRATAMENTO (T)	1	0,1150
RESÍDUO (a)	18	0,8794
MESES (M)	5	8,3496
M X T	5	1,0281**
RESÍDUO (b)	90	0,1080
RESÍDUO COMBINADO	43	0,2365
C.V. (%) SUBPARCELA		18,57

\* F significativo ao nível de 5% de probabilidade.

\*\* F significativo ao nível de 1% de probabilidade.

ns - F não significativo a 5% de probabilidade.

**Tabela 13** – Resumo da Análise de Variância do número de ovos de *Oesophagostomum* sp., dos meses amostrados e o coeficiente de variação (C.V.) (%)

F.V.	G.L.	QUADRADOS MÉDIOS
TRATAMENTO (T)	1	2,0325
RESÍDUO (a)	18	0,4968
MESES (M)	5	12,2299
M X T	5	0,8573**
RESÍDUO (b)	90	0,0722
RESÍDUO COMBINADO	48	0,1429
C.V. (%) SUBPARCELA		18,03

\* F significativo ao nível de 5% de probabilidade.

\*\* F significativo ao nível de 1% de probabilidade.

ns - F não significativo a 5% de probabilidade.

**Tabela 14** – Resumo da Análise de Variância do número de ovos de *Cooperia* sp. durante os meses amostrados e os coeficiente de variação (C.V.) (%)

F.V.	G.L.	QUADRADOS MÉDIOS
TRATAMENTO (T)	1	0,1260
RESÍDUO (a)	18	0,8516
MESES (M)	5	6,6641
M X T	5	1,0230**
RESÍDUO (b)	90	0,0984
RESÍDUO COMBINADO	42	0,2240
C.V. (%) SUBPARCELA		19,13

\* F significativo ao nível de 5% de probabilidade.

\*\* F significativo ao nível de 1% de probabilidade.

ns - F não significativo a 5% de probabilidade.

**Tabela 15** – Resumo da Análise de Variância do número de larvas de *Cooperia Haemonchus*, e *Oesophagostomum* por kg de matéria seca de gramíneas durante os meses amostrados.

F.V.	G.L.	QUADRADOS MÉDIOS		
		COOP	HAEM	OESO
GRUPO	1	0,5328	0,2097	0,7084
REPETIÇÃO	24	0,3488	0,2633	0,9975
RESÍDUO	24	0,0387	0,0223	0,0674
C.V. (%)		9,01	6,88	28,61

\* F significativo ao nível de 5% de probabilidade.

\*\* F significativo ao nível de 1% de probabilidade.

ns - F não significativo a 5% de probabilidade.

**Tabela 16** – Resumo da Análise de Variância do número de larvas totais por Kg de matéria seca durante o período de outubro de 2003 a março de 2004.

F.V.	G.L.	QUADRADOS MÉDIOS
REPETIÇÃO	27	0,2957
GRUPO	1	0,5898
RESÍDUO	27	0,0271
C.V. (%)		6,51

\* F significativo ao nível de 5% de probabilidade.

\*\* F significativo ao nível de 1% de probabilidade.

ns - F não significativo a 5% de probabilidade.

**Tabela 17** – Resumo da Análise de Variância do ganho de peso dos animais durante o período de outubro de 2003 a março de 2004.

F.V.	G.L.	QUADRADOS MÉDIOS
REPETIÇÃO	9	309,3334
TRATAMENTO	1	115,2000
RESÍDUO	9	23,0888
C.V. (%)		6,54

\* F significativo ao nível de 5% de probabilidade.

\*\* F significativo ao nível de 1% de probabilidade.

ns - F não significativo a 5% de probabilidade.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.  
This page will not be added after purchasing Win2PDF.