

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



TESE

**Isolamento, caracterização e eficácia de fungos
nematófitos autóctones do Rio Grande do Sul no
controle de nematóides gastrintestinais de ovinos**

Flávia Biasoli de Araújo

Pelotas, 2014

FLÁVIA BIASOLI DE ARAÚJO

Isolamento, caracterização e eficácia de fungos nematófagos autóctones do Rio Grande do Sul no controle de nematóides gastrintestinais de ovinos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias.

Orientador: Dr. Mário Carlos Araújo Meireles

Co-orientadores: Dr. Clóvis de Paula Santos

Dr^a Patrícia da Silva Nascente

Pelotas, 2014

**Dados de catalogação na fonte:
(Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901)**

A663i Araújo, Flávia Biasoli de
Isolamento, caracterização e eficácia de fungos
nematófagos autóctones do Rio Grande do Sul no controle de
nematóides gastrintestinais de ovinos / Flávia Biasoli de Araújo.
– 92f. : il. – Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação
em Veterinária. Área de concentração: Sanidade animal.
Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Veterinária.
Pelotas, 2014. – Orientador Mário Carlos Araújo Meireles ;
coorientador Clóvis de Paula Santos.

1.Veterinária. 2.Controle biológico. 3.Resistência parasitária.
4.Nematóides gastrintestinais. 5.Método ecológico. 6.Fungos
nematófagos. 7.Sustentabilidade. 8.Ovinos. 9.*Duddingtonia*
flagrans. I.Meireles, Mário Carlos Araújo. II.Santos, Clóvis
de Paula. III.Título.

CDD: 636.30896

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Mário Carlos de Araújo Meireles

Prof^a. Dr^a. Ana Raquel Mano Meinerz

Prof^a. Dr^a. Daniela Isabel Brayer Pereira

Prof^a. Dr^a. Marlete Brum Cleff

**Aos meus amores, Daniel, Ana Laura
e Rafaella e aos que me deram
a vida, Flávio e Tânia
DEDICO ESTA TESE**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, em primeiro lugar, sempre.

Ao meu porto seguro, meu marido Daniel, e às nossas princesas Ana Laura e Rafaella, vocês tornam meus dias mais alegres.

Aos meus pais, Flávio e Tania, pelo amor, força e princípios. Sem dúvida, vocês são co-autores desse trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Mário Carlos Araújo Meireles, pelos ensinamentos, exemplo de profissional e de pesquisador.

Ao meu segundo orientador, Prof. Dr. Sergio Silva da Silva, grande mestre. Não tenho como agradecer todo teu interesse, tua conduta, teu comprometimento. Ganhei um grande amigo.

À minha co-orientadora e amiga Prof^a. Dr^a. Patrícia Nascente, pelas correções, paciência e amizade.

Ao meu co-orientador Dr. Clóvis de Paula Santos (UENF), que me despertou a paixão e interesse pela área do controle biológico com fungos.

A todo pessoal da Universidade do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), pela hospitalidade e cordialidade recebidas.

À Prof^a. Dr^a Renata Osório de Faria, pelo apoio.

À Dr^a. Ana Lúcia Shild, pela utilização dos animais e a todo pessoal da Patologia.

À grande amiga Saura Beatriz Fagundes, pela amizade, lealdade e parceria, principalmente em um determinado momento...fostes essencial.

À amiga Maria Elvira Sica Cruzeiro (Vica).

Às minhas colegas de pós-graduação da Micologia.

Às técnicas do Laboratório Tatiana Barbosa de Oliveira e Otávia Martins.

À secretária da Pós-Graduação, Daiane Amaral, pela disponibilidade e acessibilidade em qualquer momento.

Às estagiárias do MICVET, principalmente à Emanoele Serra, minha parceira de “descobrimientos” que também se apaixonou, como eu, por essa área tão bonita da micologia, que é o controle biológico com fungos.

Ao amigo Iuri Marmitt, pela parceria, empenho, amizade e confiança. Colega que pude contar durante os momentos de trabalho.

Ao Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR) que abriu as portas e me acolheu para que eu pudesse realizar esse trabalho. Aos amigos que lá fiz e que levarei comigo por toda vida: Marcus Godoy Diaz, Artur Guidotti, Bruno Chagas, Gabriela Soares, Camila Wendt, Alexandre Lima, Mariana Sanches, Nicholas Silveira e Vitória Daitx.

À Capes, pela concessão da bolsa.

E por último, mas nem por isso menos importante, aos animais que participaram dessa pesquisa. Segundo Sampaio (2002), "Animal Experimental: sob nosso controle, ele cresce, depende e confia. Respeito haja, enquanto vivo, pois não será em vão seu sacrifício."

Pouco conhecimento faz com que as criaturas
se sintam orgulhosas.

Muito conhecimento, que se sintam
humildes.

É assim que as espigas sem grãos
erguem desdenhosamente a cabeça para
o céu, enquanto que as cheias a baixam
para a terra, sua mãe.

Leonardo da Vinci

RESUMO

ARAÚJO, Flávia Biasoli. **Isolamento, caracterização e eficácia de fungos nematófagos autóctones do Rio grande do sul no controle de nematóides gastrintestinais de ovinos.** 2014. 84f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O biocontrole com fungos nematófagos tem sido uma promissora alternativa para ser utilizada contra as nematodioses gastrintestinais de ovinos, devido às adversidades que a utilização supressiva de moléculas químicas tem ocasionado. O trabalho objetivou isolar e caracterizar fungos com potencial nematofágico a partir de amostras de solo, provenientes de municípios do Rio Grande do Sul. Os isolados foram testados quanto a eficiência nematofágica diante do nematóide *Panagrellus redivivus* sendo eleito um dos fungos para a realização de ensaios *in vitro* e *in vivo*. Os ensaios consistiram em avaliar a atividade do isolado sobre larvas infectantes em condições ideais (estufa) e condições adversas (campo), a partir de administrações orais do fungo em substrato milho, em três doses distintas, em ovinos naturalmente infectados com nematóides gastrintestinais. Também foram avaliadas as taxas de integridade física e a viabilidade do referente fungo após passagem pelo trato digestório desses animais. Os resultados demonstraram a existência de fungos com potencial nematofágico no estado. Foi isolado o fungo nematófago *Duddingtonia flagrans*, considerado um dos mais eficientes pela grande produção de clamidósporos, o qual foi utilizado nos testes. *D. flagrans* comprovou integridade e viabilidade após atravessar o trato gastrointestinal dos ovinos e os resultados tanto em ambiente controlado como adverso, demonstraram uma diminuição no número de larvas em relação ao grupo controle. Diante do exposto, o Rio Grande do Sul possui fungos com poder nematofágico, e *D. flagrans* quando colocado em desafio, atestou sua eficácia nematicida sendo, portanto, passível sua utilização como controlador biológico de larvas gastrintestinais de ovinos.

Palavras-chave: Fungos nematófagos. Ovinos. Parasitas. Controle Biológico.

ABSTRACT

ARAÚJO, Flávia Biasoli. **Isolation, characterization and efficacy of Rio Grande do Sul native nematophagous fungi on the control of gastrointestinal nematodes of sheep.** 2014. 84f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The biocontrol with nematophagous fungi has been a promising alternative for use against gastrointestinal nematodiosis of sheep, due to the adversities that suppressive use of chemical molecules has occasioned. This study aimed to isolate and characterize fungi with nematophagic potential from soil samples from the municipalities of Rio Grande do Sul. The isolates were tested for nematophagic efficiency against the nematode *Panagrellus redivivus* being one of the fungi elected for *in vitro* and *in vivo* testing. The tests consisted of evaluation of the activity of the isolated on infective larvae in ideal conditions (bacteriological oven) and adverse conditions (field) from oral administrations of the fungus in corn substrate at three different doses in sheep naturally infected with gastrointestinal nematodes. Rates of physical integrity and viability of the related fungus were also evaluated after passage through the digestive tract of these animals. The results demonstrated the existence of fungi with nematophagic potential in the state. There has been the isolation of *Duddingtonia flagrans* nematophagous fungi, considered one of the most efficient due to its large-scale production of chlamydo spores, which was used in the tests was isolated. *D. flagrans* demonstrated integrity and viability after crossing the gastrointestinal tract of sheep and the results in both environment such as controlled and adverse, demonstrated a decrease in the number of larvae when compared to the control group. Given the above, Rio Grande do Sul has fungi with nematophagic potential and *D. flagrans* when challenged, attested its nematocide efficacy being therefore likely its usage as a biological controller of gastrointestinal sheep larvae.

Key-words: Nematophagous fungi. Sheep. Parasites. Biological control

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 2- Taxa de integridade e viabilidade do fungo nematófago <i>Duddingtonia flagrans</i> após passagem pelo trato digestório de ovinos.....	37
Figura 1 Médias das contagens de clamidósporos do isolado autóctone de <i>Duddingtonia flagrans</i> recuperados nas fezes dos sete ovinos por dia.....	56
ARTIGO 3 –Efeito nematofágico de <i>Duddingtonia flagrans</i> no controle de larvas de ovinos em estufa e campo.....	57
Figura 1 – Recuperação total diária de clamidósporos do isolado de <i>Duddingtonia flagrans</i> no volume do conteúdo fecal dos oito ovinos durante o período de seis dias (média dos grupos).....	74
Figura 2 - Percentuais de larvas recuperadas provenientes das fezes do 2 DAAF, dos turnos I e II, após cultura em estufa BOD, por 14 dias.....	74
Figura 3 – Percentuais de larvas recuperadas provenientes das fezes do 4 DAAF, dos turnos I e II, após cultura em estufa BOD, por 14 dias.....	75
Figura 4 – Percentuais de larvas recuperadas provenientes das fezes do 6 DAAF, dos turnos I e II, após cultura em estufa BOD, por 14 dias.....	75
Figura 5- Quantidade total de larvas recuperadas na estufa dos grupos tratados e controle do 2 DAAF, 4 DAAF e 6 DAAF.....	76
Figura 6 - Quantidade total de larvas recuperadas nas parcelas de campo dos grupos tratados e controle do 2 DAAF, 4 DAAF e 6 DAAF.....	76
Figura 7 – Percentuais de larvas recuperadas das parcelas de campo oriundas das fezes depositadas no dia 2 DAAF e dos turnos I e II, após 14 dias (2 DA).....	77
Figura 8 – Percentuais de larvas recuperadas das parcelas de campo oriundas das fezes depositadas no dia 4 DAAF e dos turnos I e II, após 14 dias (4 DA).....	77

Figura 9 – Percentuais de larvas recuperadas das parcelas de campo oriundas das fezes depositadas no dia 6 DAAF e dos turnos I e II, após 14 dias (6 DAI).....	78
Figura 10 - Percentuais de larvas recuperadas oriundas dos dois gramas de fezes depositadas no campo e cultivadas em estufa do 2 DAAF.....	78
Figura 11 - Percentuais de larvas recuperadas oriundas dos dois gramas de fezes depositadas no campo e cultivadas em estufa do 4 DAAF.....	79
Figura 12 - Percentuais de larvas recuperadas oriundas dos dois gramas de fezes depositadas no campo e cultivadas em estufa do 6 DAAF.....	79
Figura 13 - Quantidade total de larvas recuperadas nas fezes residuais do campo (2 gramas) dos grupos tratados e controle do 2 DAAF, 4 DAAF e 6 DAAF.....	80

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1- Levantamento de fungos nematófagos predadores em amostras de solos de municípios do Rio Grande do Sul.....25

Tabela 1. Identificação dos fungos isolados com seus respectivos municípios do RS e localizações geográficas.....31

ARTIGO 2- Taxa de integridade e viabilidade do fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* após passagem pelo trato digestório de ovinos.....37

Tabela 1. Dose de clamidósporos administrada aos ovinos de acordo com o peso do animal, número de clamidósporos recuperados nas fezes após 24 horas e taxa de passagem íntegra do isolado autóctone de *Duddingtonia flagrans*.....53

Tabela 2 Contagens individuais de clamidósporos recuperados ao dia das fezes dos sete ovinos, média das contagens e total de clamidósporos do isolado autóctone de *Duddingtonia flagrans* recuperados no período de cinco dias de administração.....54

Tabela 3 Dose total de clamidósporos administrada aos ovinos nos dias 2, 3, 4, 5 e 6, número total de clamidósporos recuperados nas fezes durante esse período e a taxa de passagem íntegra acumulada do isolado autóctone de *Duddingtonia flagrans*.....55

ARTIGO 3 –Efeito nematófágico de *Duddingtonia flagrans* no controle de larvas de ovinos em estufa e campo.....57

Tabela 1: Valores do dia zero de Graus Famacha, hematócrito e OPG dos oito ovinos.....73

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Ágar- água
BOD – Demanda Bioquímica de Oxigênio
°C – Graus Celsius
Cfa – Classificação climática
Cm - Centímetro
cm² - Centímetro quadrado - unidade de área
CPG – Clamidósporos por grama de fezes
g – Grama (s)
Kg – Quilograma
L₁ – Larva de primeiro estágio
L₂ – Larva de segundo estágio
L₃ – Larva infectante, de terceiro estágio
L₄ – Larva de quarto estágio
L₅ – Larva de quinto estágio
m - Metro
mL – Mililitro
mm³ - Milímetro cúbico
OPG – Ovos por grama de fezes
PV – Peso vivo
R² – Coeficiente de determinação
RS – Rio Grande do Sul
T - Temperatura
UFPel – Universidade Federal de Pelotas
URA – Umidade relativa do ar

SUMÁRIO

1. Introdução.....	14
2. Objetivos.....	24
3. Artigos.....	25
3.1 Artigo 1.....	25
3.2 Artigo 2.....	37
3.3 Artigo 3.....	57
4. Conclusões Gerais.....	81
5. Referências.....	82
6. Apêndices.....	88

1 INTRODUÇÃO

A ovinocultura vem aumentando sua participação no agronegócio brasileiro e a tendência é de que se mantenha em expansão, sendo que essa atividade contribui significativamente na constituição do Produto Interno Bruto (PIB) do agronegócio no Brasil. Entretanto, o parasitismo gastrointestinal tornou-se um fator limitante nos sistemas de produção de ovinos (WAGHORN et al., 2003).

Essa doença representa uma grande ameaça para a produtividade de pequenos ruminantes, e o impacto causado é bastante substancial no mundo inteiro (CAMPOS et al., 2009). Girão et al. (1992), associam as altas perdas na ovinocultura decorrentes das nematodioses, enquanto que Torina et al. (2004), as estimam no mundo em milhões de dólares anualmente.

Entretanto, muitos são os fatores que determinam as nematodioses além dos fatores inerentes ao parasita e ao hospedeiro, como por exemplo, as condições ambientais. As pastagens brasileiras, em sua grande maioria, apresentam durante todas as estações do ano, condições favoráveis à sobrevivência de larvas. Na pastagem, o bolo fecal exerce função de reservatório, protegendo as larvas infectantes da dissecação, fazendo com que algumas perdurem no pasto por vários meses ou até mais de um ano (ARMOUR, 1989). Quando em condições ambientais favoráveis, as larvas migram das massas fecais horizontal e verticalmente para a fração da vegetação que será ingerida por seu hospedeiro definitivo, dando continuidade ao ciclo evolutivo (AMARANTE et al., 2004a).

Os nematóides parasitas de animais domésticos são invertebrados, possuem corpo cilíndrico e alongado, simétrico bilateralmente, não segmentado e envolvido por uma cutícula externa que pode ser acinzentada ou avermelhada, dependendo da presença ou não de sangue (MACIEL, 2005).

O ciclo biológico desses parasitas compreende duas fases: parasitária e de vida livre. No ambiente, misturado ao bolo fecal, os ovos eclodem para primeiro estágio de desenvolvimento (L_1), prosseguindo o desenvolvimento,

passando pela fase L₂ e culminando com uma larva de terceiro estágio (L₃) que corresponde à fase infectante. As larvas L₁ e L₂ alimentam-se no ambiente de microrganismos acumulando reservas nas células intestinais. As formas infectantes apresentam dupla cutícula para proteção e resistência às intempéries. Não se alimentam, consumindo as reservas acumuladas nas células intestinais. Resistem às condições adversas do ambiente por meses, exceto no verão, quando em altas temperaturas e alta umidade, as larvas se movimentam mais, gastando mais rapidamente suas reservas. A fase parasitária começa quando o animal ingere a forma infectante que está na pastagem, estas vão se desenvolver para L₄ e L₅ culminando na maturação sexual das larvas, no órgão de eleição do hospedeiro, dependendo do parasita. Após esse período, já se tem ovos nas fezes (URQUHART et al., 1998).

Existem várias espécies de nematóides, com diferentes graus de patogenicidade. A frequência em um local de uma determinada espécie varia em função das condições climáticas. Como exemplo, pode ser citado o parasita abomasal *Haemonchus contortus*, que possui maior prevalência em regiões de clima tropical, subtropical e temperado, especialmente em condições quentes e úmidas (JABBAR et al. 2008; PARAUD et al. 2010; KHAN et al. 2010). No Brasil, é o principal nematóide parasita de ovinos (AMARANTE et al., 2004b). É o mais patogênico de todos os nematóides e o que causa maior impacto econômico, encontrado em 75% a 100% dos exames de contagem de ovos por grama de fezes – (OPG) (MORTENSEN et al., 2003). Estudos realizados por Leal (2012) revelam que mais de 80% da carga parasitária dos ovinos são compostos por esse parasita.

O alto grau de virulência do *H. contortus* está relacionado à hematofagia. Possui uma lanceta bucal, que é responsável não somente por sugar o sangue, como também por lançar uma substância anticoagulante capaz de impedir a formação da rede de fibrina no local que estava sendo sugado. Cada verme pode remover em torno de 0,05 mL de sangue ao dia por ingestão e por perda pelas lesões da região do abomaso do hospedeiro. Exemplificando, um ovino com 5.000 *H. contortus* pode perder cerca de 250mL ao dia. Em casos hiperagudos, pode ocorrer morte súbita por gastrite hemorrágica (TAYLOR et al., 2007).

Rocha et al. (2008), destacam que os principais agentes causadores da verminose nas condições brasileiras de criação de ovinos além do *Haemonchus*

contortus, também sobressai o *Trichostrongylus colubriformis* e que praticamente 100% dos animais criados a campo são portadores de uma ou mais espécie de endoparasitas.

Especificamente na região sul, os mais prevalentes são *H. contortus*, *Trichostrongylus axei*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Teladorsagia circumcincta*, *Ostertagia ostertagi*, *Cooperia* spp, *Nematodirus spatigher*, *Oesophagostomum venulosum* e *Trichuris ovis* (RAMOS et al., 2004). Entretanto, além da sua alta patogenicidade, *H. contortus* é o maior responsável pelo rápido desenvolvimento da resistência em nematóides de pequenos ruminantes (SANGSTER, 2001), sendo o mais prevalente e de maior intensidade também em populações parasitárias resistentes a anti-helmínticos na região sul do Brasil (FARIAS et al., 1997)

H. contortus desenvolve resistência mais rapidamente que os demais parasitas nematóides devido ao seu alto potencial biótico (ECHEVARRIA; TRINDADE, 1989), ademais, também possui uma grande variabilidade genética e alberga o alelo que causa diminuição da susceptibilidade a uma droga (BLACKHALL et al., 1998).

A utilização de anti-helmínticos tem se mostrado como uma maneira eficaz de controlar o parasitismo. Entretanto, seu uso exclusivo propiciou o surgimento de nematóides resistentes a essa classe de fármacos (SUTHERLAND; LEATHWICK, 2011; KAPLAN, 2004; MOLENTO, 2004). Além da resistência parasitária como consequência, há uma crescente preocupação mundial em relação a contaminantes químicos na carne, bem como o risco de contaminação ambiental (SUTHERLAND; LEATHWICK, 2011), assim como os efeitos tóxicos a organismos não alvos no meio ambiente (STRONG et al., 1996).

Vários fatores podem ser atribuídos à problemática da resistência dos parasitas. Molento et al. (2004), elencam como principais: tratamentos supressivos, tratamento de todos os animais do rebanho, uso contínuo da mesma base química do composto por longos períodos (mais de um ano), utilização de compostos de longa persistência, a aquisição de animais contaminados com parasitas resistentes, doses administradas superiores às recomendadas pelo fabricante, descaso à categoria em que se encontra o animal e estratégias errôneas de manejo tendo como exemplo: tratar os animais e mudar de piquete.

Em suma, os tratamentos são realizados sem base técnica, e como consequência, são selecionados os nematóides resistentes às drogas disponíveis no mercado (SILVA, 2007).

Segundo Molento (2009), a resistência parasitária é o fenômeno que impede um fármaco de manter a mesma eficácia contra os parasitas, se utilizada nas mesmas condições e após um determinado período de tempo. Sob o aspecto farmacológico, esse fenômeno é caracterizado por uma redução no potencial da droga que, normalmente é efetivo contra uma população de parasitos (SANGSTER, 1996), tendo, portanto a capacidade de sobreviver aos tratamentos nas doses terapêuticas recomendadas (TAYLOR; HUNT, 1989). O diagnóstico será "positivo para resistência" quando determinada droga que apresentava redução da carga parasitária (OPG) acima de 99% obtém redução inferior a 80% para dado organismo (MOLENTO, 2009).

O desenvolvimento da resistência aos antiparasitários é devido à seleção de alelos de um ou mais genes (PRICHARD, 1990; BLACKHALL et al., 1998), sendo que a eficácia desses fármacos diminui consideravelmente devido a este caráter seletivo, favorecendo a permanência de organismos resistentes e a eliminação de indivíduos susceptíveis (MOLENTO, 2005).

Diante do exposto, a preservação da *refugia* no ambiente deve ser o objetivo de todo controle parasitário. Refugia é um termo utilizado para definir toda a população parasitária que não foi exposta ao processo de seleção pelas drogas, permanecendo com sua característica primária de susceptibilidade e contribui para a diluição dos genes da resistência anti-helmíntica (COSTA et al., 2011).

Quanto maior for o tamanho da população em refugia, menor será a pressão de seleção e conseqüentemente o desenvolvimento da resistência será retardado. Portanto, o tamanho da população em *refugia* pode ter um papel fundamental na manutenção da eficácia dos fármacos, retardando o processo de seleção (MOLENTO, 2005).

A capacidade dos ovinos de adquirirem e expressarem imunidade contra os nematóides gastrintestinais é transmitida aos seus descendentes geneticamente, variando entre as diferentes raças, bem como entre os indivíduos de uma mesma raça (STEAR; MURRAY, 1994). Nos últimos 40 anos, o melhoramento genético realizado selecionou apenas melhorias de características ligadas à produtividade

dos animais, tais como produção e lã, deixando de lado o melhoramento da resistência aos parasitas (AMARANTE, 2008).

A resistência anti-helmíntica foi registrada pela primeira vez em 1964, nos Estados Unidos, por Drudge et al. (1964). Já no Brasil, o primeiro relato ocorreu no Rio Grande do Sul (DOS SANTOS; GONÇALVES, 1967).

A resistência frente aos diferentes princípios ativos utilizados tem ocorrido com maior frequência e velocidade nos últimos anos (KAPLAN; VIDYASHANKAR, 2012). Atualmente, as classes de anti-helmínticos mais utilizadas para o tratamento de nematóides são: levamisole e seus análogos (morantel e pirantel), lactonas macrocíclicas (avermectinas e milbemicinas) e benzimidazoles (tiabendazole) (PRICHARD, 1990).

Os levamisoles agem como agonistas colinérgicos na membrana das células da musculatura dos nematóides (MOLENTO, 2004), produzindo paralisia espástica do parasito (PRICHARD, 1980), determinando uma contração muscular estável, o que facilita a eliminação do mesmo (KÖHLER, 2001).

As lactonas macrocíclicas são produzidas pela fermentação do fungo actinomiceto *Streptomyces avermitilis*. São responsáveis por causar uma hiperpolarização da musculatura dos nematóides, abrindo irreversivelmente os canais de cloro (ARENA et al., 1991).

Os benzimidazoles ligam-se, irreversivelmente à tubulina de nematóides (LUBEGA et al., 1991), uma proteína de peso molecular de 25.000 daltons, impedindo sua polimerização em microtúbulos (LACEY; GILL, 1994, MARTIN, 1997). Microtúbulos são organelas citoplasmáticas que formam o citoesqueleto da célula, movimentam partículas celulares e formam o fuso mitótico durante a divisão celular (MARTIN, 1997). Suas funções são: formação do fuso mitótico, motilidade e secreção celular, absorção de nutrientes e transporte celular (JASMER et al., 2000). Devido a grande importância dos microtúbulos em alguns dos processos celulares, esta destruição induzida pelo fármaco, induz a morte desse organismo (KÖHLER, 2001), pois ocorre uma interrupção do equilíbrio tubulina/microtúbulo, levando a uma cascata de mudanças bioquímicas e fisiológicas que podem ser diretas ou indiretas resultando na perda da homeostasia celular (LACEY, 1988). Secundariamente, inibe a enzima fumarato redutase no transporte de glicose, alterando os mecanismos energéticos do parasito (LANUSSE, 1996).

Em relação aos resíduos, os benzimidazoles e a sua utilização em animais produtores de alimentos devem ser monitorados, uma vez que a FAO/WHO (1989), alertam para seu efeito tóxico, incluindo alguns estudos sobre efeitos carcinogênicos, genotóxicos e teratogênicos (LANUSSE et al., 2009).

As avermectinas também imprimem seu impacto em produtos de origem animal. O leite tem maior importância do que a carne, uma vez que as avermectinas são lipofílicas e a gordura presente no leite facilita a ligação com a droga. Dessa forma, a mesma concentra-se em tecidos adiposos (FLAJS et al., 2005). A moxidectina é considerada ainda mais lipofílica que a ivermectina, o que a faz ainda mais persistente no corpo do animal (IMPERIALE et al., 2004).

No meio ambiente, o principal impacto das avermectinas é a excreção pelas fezes dos animais, o que pode afetar a população de espécies dos invertebrados. As fezes dos animais são degradadas por uma variedade de invertebrados especializados incluindo insetos, outros artrópodes e oligoquetos (EDWARDS et al., 2001).

Diante dos problemas que o tratamento exclusivo com fármacos apresenta estratégias para minimizar o alastramento da resistência com a utilização de tratamentos alternativos estão recebendo muita atenção (CABARET, 2008; KENYON et al., 2009) .

Os problemas supracitados enfatizam a necessidade de serem implementadas outras formas de controle, que possam agir isoladamente ou de forma sinérgica com os fármacos antiparasitários. Para tanto, opções estão sendo constantemente pesquisadas como: vacinas (KNOX; SMITH, 2001), seleção genética dos hospedeiros (GASBARRE; MILLER, 1999), técnicas de tratamento seletivo como Famacha (MOLENTO, 2004), plantas detentoras de taninos (ATHANASIADOU et al., 2001), rotação de pastagens (LARSSON et al., 2007) e utilização de controladores biológicos (ARAÚJO et al., 2006).

Segundo Gronvold et al. (1996a), o controle biológico define-se como um método ecológico que visa diminuir a população parasitária ou conservá-la em níveis não prejudiciais Este método se aplica à utilização de antagonistas naturais disponíveis no ambiente, para diminuir a um limiar subclínico e economicamente aceitável a população de um agente causador de perdas produtivas à atividade pecuária ou agrícola.

Na prática, esse tipo de controle não atua sobre estágios internos de parasitos (dentro do animal), mas sim, concentra suas ações sobre os hospedeiros intermediários, paratênicos, vetores e estágios larvais de vida livre, diminuindo a fonte de infecção para os hospedeiros finais, além de causarem menos efeitos negativos no ambiente que os métodos químicos (MOTA et al., 2003). Visam complementar os métodos tradicionais utilizados, assumindo que toda e qualquer população é regulada por antagonistas de forma espontânea na natureza e na ausência desses, uma população poderia aumentar indiscriminadamente.

As formas mais utilizadas como controles biológicos são bactérias (STIRLING, 1985), artrópodes (LEHMAN; REID, 1993) e fungos nematófagos (BARRON, 1977).

Pesquisas utilizando fungos nematófagos vêm se intensificando cada vez mais (ARAÚJO, 2006). Os fungos nematófagos estão classificados na divisão Deuteromycetes, classe Hyphomycetes, ordem Hyphomycetales e família Moliniaceae. Apresentam micélio septado e bem desenvolvido, reproduzem-se agamicamente por esporos formados sobre ramificações do micélio (DRESCHLER, 1937). Entretanto, Griffin (1994), observou estádios de reprodução sexuada em algumas espécies destes fungos, e por esse motivo, algumas espécies pertencem ao filo Ascomycota.

A primeira citação de um fungo agindo sobre os nematóides, foi no século XIX. Os primeiros registros foram feitos por Lohde em 1874 com o fungo endoparasita *Harposporium anguillulae* e posteriormente com Zopf em 1888, o qual fez as primeiras observações da captura de um nematóide vivo através do fungo *Arthrobotrys oligospora* (PANDEY, 1973).

Até 1964, a maioria dos fungos era classificada como pertencentes aos gêneros *Arthrobotrys*, *Dactylaria*, *Dactylella* e *Trichothecium*. Posteriormente, vários novos gêneros foram descritos, incluindo *Duddingtonia*, *Monacrosporium*, *Genicularia* e *Dactylariopsis* (GRAY, 1987). Atualmente são aceitos os gêneros *Arthrobotrys*, *Dactylaria*, *Dactylella*, *Duddingtonia*, *Lactydina*, *Monacrosporium* e *Trichothecium* (RUBNER, 1996). Apesar do grande número de fungos estarem catalogadas em mais de 150 espécies (BARRON, 1977), a maioria dos estudos tem sido com as espécies *Duddingtonia flagrans* e *Arthrobotrys oligospora* (LARSEN, 2006).

Os fungos nematófagos vivem na matéria orgânica do solo (GRAY, 1983). O controle biológico com essa classe de fungos baseia-se na redução de larvas infectantes na pastagem. Portanto, técnicas que objetivam diminuir a contaminação nesses locais, significam um grande avanço no controle dessa enfermidade (CASTRO et al., 2002), e a aplicação do controle biológico tem apresentado resultados promissores *in vitro* e *in vivo* (GRAMINHA et al., 2005) tornando-se uma alternativa sustentável de combate às parasitoses (CESAR et al., 2008).

Existem três grupos deste tipo de fungos: predadores, endoparasitas e ovicidas. O grupo dos predadores produzem armadilhas após apreensão do nematóide, enquanto que os endoparasitas infectam nematóides por meio de esporos e podem aderir à cutícula do mesmo ou necessitam ser ingeridos. Já os ovicidas, penetram suas hifas à casca do ovo por meio de poros presentes na camada vitelínica, alterando a permeabilidade da casca e expandindo seu volume, colonizando assim o conteúdo do ovo (MORGAN-JONES; RODRÍGUEZ- KÁBANA, 1988).

Os fungos nematófagos predadores são os organismos antagonistas de nematóides mais pesquisados, pois têm mostrado capacidade de reduzir efetivamente as populações de nematóides em condições de laboratório e campo (LARSEN, 1999).

No meio ambiente, produzem um extensivo sistema de hifas e a intervalos ao longo da hifa, são formadas armadilhas que capturam os nematóides mecanicamente ou por adesão. As armadilhas são divididas em: hifas adesivas não modificadas ou não diferenciadas, ramificações hifais anastomosadas formando redes adesivas tridimensionais, ramificações adesivas que algumas vezes formam redes simples e na maioria das vezes bidimensionais, nódulos adesivos, anéis constritores e anéis não constritores (BARRON, 1977). A infecção de nematóides por fungos nematófagos predadores envolve uma sequência de eventos: primeiramente ocorre adesão das estruturas de infecção na superfície desta larva, com posterior penetração na sua cutícula; digestão de tecidos internos e translocação dos nutrientes para partes do micélio (FIELD; WEBSTER, 1977).

Estudos demonstram que os fungos nematófagos não causam desequilíbrio ao meio ambiente. Yeates et al. (1997), ofereceram blocos do fungo nematófago predador *Duddingtonia flagrans* para ovinos e trataram outro grupo com anti-helmíntico para verificar o efeito dos nematóides do solo. Os resultados

demonstraram que não houve alterações significativas na fauna de nematóides nesse ambiente. Ainda, Fernández et al. (1999), demonstraram que a presença maciça de *Duddingtonia flagrans* em bolos fecais não afetou os valores de matéria seca e conteúdo de matéria orgânica. Em outras pesquisas de Faedo et al. (2002) e Knox et al. (2002), os autores verificaram que a presença de clamidósporos nas fezes não afetou a abundância de nematóides de vida livre no solo e microartrópodes que habitam na interface desse solo.

Portanto, uma vez implantado e estabelecido, o controle biológico com fungos nematófagos possui algumas vantagens, como: possui especificidade, pois quando inserido em ecossistema, não induz profundas transformações no mesmo. É de fácil multiplicação e dispersão no ambiente. Possui efeito prolongado ou secundário afetando gerações subseqüentes do alvo, tendo, portanto, um efeito mais duradouro. Possibilidade de emprego em associações medicamentosas. Sem resíduos ou toxicidade, baixo custo e pequena possibilidade de indução da resistência (ARAÚJO et al., 2004).

Waller et al. (2004), considera as vantagens do fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* em relação aos demais, devido a sua rápida taxa de crescimento, além de sua afinidade para capturar e digerir nematóides.

A atividade nematofágica de *D. flagrans* foi testada contra várias espécies de nematóides parasitas de ovinos (CHANDRAWATHANI et al, 2004.; FONTENOT et al, 2003.; WAGHORN et al., 2003). Segundo Faedo et al. (2000) e Fontenot et al. (2003), a redução de infestação na forragem pode exceder a 60% para os ovinos. Entretanto, é importante salientar que existem variações da eficácia do fungo. A atividade pode oscilar dependendo do isolado fúngico utilizado, das espécies de parasitas presentes, da gestão do sistema da propriedade, além das condições ambientais.

Um grande desafio na implementação de fungos nematófagos como controladores biológicos contra larvas de nematoides de ovinos, é o desenvolvimento de formulações fúngicas que sejam economicamente viáveis e de fácil administração. Uma das aplicações compreende alimentar animais com clamidósporos misturados em concentrado (FONTENOT et al., 2003; EPE et al., 2009). Outra alternativa para administração de fungos nematófagos é o fornecimento de péletes, a base de uma formulação de clamidósporos em cápsula de alginato de sódio (ARAÚJO et al., 2004).

Outro obstáculo é a vida de prateleira. Segundo Braga et al. (2011) e Carvalho et al. (2011), a aplicação de fungos como agente biológico de controle, ainda precisa de muita pesquisa para se obter sucesso na produção em larga escala e no armazenamento. Após o isolamento, estes organismos precisam ser preservados por longos períodos de tempo e avaliados, a fim de ser selecionado como potencialmente útil em programas de controle. Sua manutenção em laboratório é um requisito básico para o sucesso biológico em programas de controle. O processo de manutenção dos fungos requer replicação periódica. A exposição da cultura a contaminações favorecem mutações que podem alterar sua capacidade predatória (BRAGA et al., 2011).

Aliado a isso, é escasso o discernimento da fisiologia e ecologia dos fungos como uma base para preparados biológicos. A compreensão dos fatores que controlam várias etapas do ciclo de vida do fungo se faz necessária para a aplicação bem sucedida. Os conídios perdem sua viabilidade depois de alguns meses, enquanto que os clamidósporos podem permanecer viáveis por vários anos. (ANAN'KO; TEPLYAKOVA, 2011). Gronvold et al. (1996b), conseguiram uma vida útil superior a 20 meses de clamidósporos de fungo acondicionados a vácuo.

Entretanto, a viabilidade dos clamidósporos para utilização varia de acordo com o ambiente. Ambientes úmidos podem permitir a germinação que torna clamidósporos vulneráveis ao passar através do trato gastrointestinal. Isso pode reduzir a vida de prateleira para menos de uma semana (LARSEN, 2006).

Embora existam alguns desafios para a implementação do controle biológico com fungos nematófagos, é imprescindível que pesquisas cada vez mais sejam estimuladas, a fim de que se consiga, de modo efetivo, implementar essa forma de controle parasitário nos sistemas de manejo da produção de pequenos ruminantes.

2 OBJETIVO GERAL

Isolar e identificar fungos nematófagos autóctones de diferentes municípios do Rio Grande do Sul e eleger um isolado para cultivo e testes *in vitro* e *in vivo*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Ensaio *In vitro*: Isolar fungos nematófagos de diferentes municípios do Rio Grande do Sul e eleger o mais promissor para utilização em testes *in vivo*;
- 2- Ensaio *In vivo* 1: Administrar substrato fúngico eleito para ovinos e avaliar a taxa de passagem íntegra dos clamidósporos, após passagem pelo trato gastrintestinal dos animais;
- 3- Ensaio *In vivo* 2: Administrar substrato fúngico eleito para ovinos e avaliar a sobrevivência e eficácia em condições ideais (estufa) e condições adversas (ambiente).

3 ARTIGOS

3.1 Artigo 1

Levantamento de fungos nematófagos predadores em amostras de solos de municípios do Rio Grande do Sul.

AUTORES: Flávia Biasoli de Araújo^{1*}, Sergio Silva da Silva², Patrícia da Silva Nascente³, Emanoele Figueiredo Serra¹; Renata Osório Faria¹; Clóvis de Paula Santos⁴, Mário Carlos Araújo Meireles¹

Foi submetido à revista: Arquivos do Instituto Biológico

1 **Levantamento de fungos nematófagos predadores em amostras de solos de municípios**
2 **do Rio Grande do Sul.**

3

4 **Flávia Biasoli de Araújo^{1*}, Sergio Silva da Silva², Patrícia da Silva Nascente³, Emanoele**
5 **Figueiredo Serra¹, Renata Osório Faria¹; Clóvis de Paula Santos⁴, Mário Carlos Araújo**
6 **Meireles¹**

7

8 **RESUMO**

9 Fungos nematófagos predadores são os mais estudados e promissores agentes de biocontrole
10 das nematodioses gastrintestinais dos animais de produção. O isolamento de espécies
11 autóctones destes fungos deve ser considerado ao se visar uma futura aplicação já que estas
12 podem ser mais bem adaptadas à região de sua utilização. Neste sentido, o objetivo deste
13 estudo foi isolar e identificar fungos nematófagos predadores em solos oriundos de
14 municípios do Rio Grande do Sul. Para isto, 72 amostras de solo em 12 municípios foram
15 coletadas até a profundidade de 10 cm e uma parcela de dois gramas foi depositada
16 individualmente em uma placa de Petri com ágar-água (2%), formando uma cruz. *Panagrellus*
17 *spp.* foram adicionados às placas como isca para estimular o crescimento dos fungos. As
18 placas foram fechadas e incubadas à temperatura ambiente (25±3) durante um mês, sendo

¹ Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Laboratório de Micologia (MICVET)

² Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Laboratório de Doenças Parasitárias
(LADOPAR)

³ Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Laboratório de Biologia e Parasitologia.

⁴ Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy-Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologias,
Laboratório de Biologia Celular e Tecidual

*Autor correspondente: flaviaaraujo_vet@yahoo.com.br

19 observadas uma vez semanalmente ao microscópio estereoscópico. Os fungos nematófagos,
20 quando presentes, foram isolados e identificados, um isolado de *Arthrobotrys oligospora*,
21 quatro de *A. musiformis* e um isolado de *Duddingtonia flagrans* foram obtidos. Em 58 % das
22 amostras não foram encontrados fungos nematófagos. Avaliação destes isolados para o uso no
23 controle biológico de nematóides gastrintestinais de ovinos na região do Rio grande do Sul
24 está em andamento.

25 **PALAVRAS-CHAVE: Fungos nematófagos; Nematóides Gastrintestinais; Ovinos.**

26

27 **ABSTRACT**

28 Predators nematophagous fungi are the most studied and promising biocontrol agents of
29 gastrointestinal nematodiosis animal production. The isolation of native species of these fungi
30 should be considered when aiming at a future application since they can be better adapted to
31 the region of their use. The aim of this study was to isolate predators nematophagous fungi in
32 soils originating from municipalities in Rio Grande do Sul. For this, 72 soil samples were
33 collected in 12 counties to a depth of 10 cm and a portion of two grams was individually
34 placed in a petri dish with water-agar (2%), forming a cross. *Panagrellus* spp. were added to
35 the plates as bait to encourage the growth of fungi. The plates were sealed and incubated at
36 room temperature for one month were observed once weekly under the stereomicroscope. The
37 nematophagous fungi, when present, were isolated and identified, one isolate of *Arthrobotrys*

¹ Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Laboratório de Micologia (MICVET)

² Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Laboratório de Doenças Parasitárias
(LADOPAR)

³ Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Laboratório de Biologia e Parasitologia.

⁴ Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy-Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologias,
Laboratório de Biologia Celular e Tecidual

*Autor correspondente: flaviaaraujo_vet@yahoo.com.br

38 *oligospora*, four isolates of *A. musiformis* four and one isolate of *Duddingtonia flagrans* were
39 obtained. In 58 % of the samples nematophagous fungi were found. Evaluation of these
40 isolates for use in the biological control of gastrointestinal nematodes of sheep in the Rio
41 Grande do Sul is underway.

42

43 **KEYWORDS: Nematophagous fungi; Gastrointestinal nematodes, Sheep**

44

45 Os fungos nematófagos representam um grupo peculiar de microrganismos capazes
46 de se alimentar de nematóides através de sua ação predatória ou parasítica (BARRON,
47 1977). Além disto, vivem na matéria orgânica do solo, como saprófitas e são
48 predominantemente cosmopolitas, sendo que poucas espécies estão restritas
49 geograficamente (GRAY, 1983).

50 Os fungos nematófagos têm tido uma utilidade crescente como um meio de estudo
51 no controle biológico e segundo WALLER (1998), eles poderão ser futuramente usados
52 em formulações biológicas para o controle dos nematóides trichostrongilídeos de
53 ruminantes em diferentes regiões e programas de Manejo.

54 Em território brasileiro, alguns estudos foram feitos em solos de várias localidades
55 (SANTOS, et al. ,1991; SILVA, CAMPOS,1991; DALLA PRIA et al.,1991; NAVES e
56 CAMPOS, 1991; DIAS, et al.,1995; RIBEIRO, et al. 1999; RIBEIRO, et al. 2003;

¹ Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Laboratório de Micologia (MICVET)

² Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Laboratório de Doenças Parasitárias
(LADOPAR)

³ Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Laboratório de Biologia e Parasitologia.

⁴ Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy-Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologias,
Laboratório de Biologia Celular e Tecidual

*Autor correspondente: flaviaaraujo_vet@yahoo.com.br

57 MARTINELLI, et al., 2009) e fezes (SAUMELL, 1999; SAUMELL, 2000, SANTOS, et
58 al. 2008). O Brasil é um país de tamanho continental marcado por regiões com
59 características próprias, o que torna necessário obterem-se informações de diversos pontos
60 para gerar conhecimentos sobre a biodiversidade destes microrganismos. Além disso, a
61 obtenção de cepas autóctones é um fator importante para o uso destes fungos no controle
62 biológico, devido a existência de restrições para a importação e liberação em campo de
63 organismos exóticos e à possibilidade de cepas autóctones sobreviverem melhor em
64 condições da própria região que cepas derivadas de coleções de fungos centralizados
65 (WALLER,1998).

66 Este trabalho teve como objetivo isolar fungos nematófagos predadores em solos de
67 12 municípios do Rio Grande do Sul. Para obtenção dos fungos nematófagos foram
68 coletadas amostras de solo, dos seguintes municípios do Rio Grande do Sul: Pelotas,
69 Capão do Leão, Porto Alegre, Caxias do Sul, Santana do Livramento, Montenegro, Santa
70 Maria, Santa Vitória do Palmar, Rio Grande, Dom Pedrito, Bagé e São Jorge.

71 Cada amostra foi coletada a uma profundidade de dez centímetros, identificada e
72 acondicionada em sacos plásticos dentro de caixa isotérmica para transporte até o Laboratório
73 de Micologia da Faculdade de Veterinária da UFPel.

74 A técnica de LARSEN, et al. (1991), foi utilizada para o isolamento dos fungos. Esta
75 consiste no espalhamento de dois gramas do solo em forma de cruz, em placas de Petri

¹ Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Laboratório de Micologia (MICVET)

² Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Laboratório de Doenças Parasitárias
(LADOPAR)

³ Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Laboratório de Biologia e Parasitologia.

⁴ Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy-Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologias,
Laboratório de Biologia Celular e Tecidual

*Autor correspondente: flaviaaraujo_vet@yahoo.com.br

76 contendo ágar- água (2%) acrescido de um mililitro de uma suspensão contendo em média
77 5.000 *Panagrellus spp.* para estimular o crescimento dos fungos. As placas foram fechadas
78 com parafilm e incubadas à temperatura ambiente (25 ± 3) durante um mês, sendo observadas
79 uma vez semanalmente ao microscópio estereoscópico. Foram feitas seis placas por
80 município. Os fungos quando presentes foram isolados e identificados com base nas chaves
81 taxonômicas de COOKE, GODFREY (1964); DE HOOG, OORSCHOT (1985), RUBNER
82 (1996) e com auxílio das descrições originais. Os nematóides de vida livre, *Panagrellus spp.*,
83 foram cedidos pelo Setor de Biologia Parasitária do Laboratório de Biologia Celular e
84 Tecidual da Universidade do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro (UENF), RJ e mantidos em
85 meio de ágar-aveia (HEINTZ, 1978) e repicados para novos cultivos a cada quinze dias.

86 Um isolado de *Arthrobotrys oligospora*, quatro de *A. musiformis* e um isolado de
87 *Duddingtonia flagrans* foram obtidos. Em 58% das amostras não foram encontrados fungos
88 nematófagos (Tabela 1). O número de isolados e a diversidade de espécies de fungos
89 nematófagos encontrados neste estudo foram relativamente baixos em relação a outros
90 estudos realizados no Brasil (SANTOS, et al., 1991; SILVA, CAMPOS, 1991; DALLA PRIA
91 et al., 1991; NAVES, CAMPOS, 1991; DIAS, et al., 1995; RIBEIRO, et al. 1999; RIBEIRO, et
92 al. 2003; SAUMELL, 1999; SAUMELL, 2000; SANTOS, 2000; MARTINELLI, et al., 2009).

93

94

¹ Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Laboratório de Micologia (MICVET)

² Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR)

³ Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Laboratório de Biologia e Parasitologia.

⁴ Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy-Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologias, Laboratório de Biologia Celular e Tecidual

*Autor correspondente: flaviaaraujo_vet@yahoo.com.br

95 *Arthrobotrys oligospora* e em especial, *D. flagrans*, estão entre as espécies de fungos
 96 nematófagos mais estudadas visando o biocontrole de nematóides gastrintestinais dos animais de
 97 produção (LARSEN, 1999; LARSEN, 2006; SANTOS, 2008). A avaliação da atividade
 98 predatória *in vitro* e *in vivo* das espécies isoladas neste estudo para o uso no controle
 99 biológico de nematóides gastrintestinais de ovinos na região do Rio grande do Sul está em
 100 andamento.

101

102 Tabela 1. Identificação dos fungos isolados com seus respectivos municípios do RS e
 103 localizações geográficas.

MUNICÍPIO	LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA	FUNGOS ISOLADOS
Pelotas	31° 45' 43" S 52° 20' 33" W	-
Capão do Leão	31° 45' 48" S 52° 29' 02" W	<i>Arthrobotrys oligospora</i>
Porto Alegre	30° 05' 47" S 51° 06' 49" W	<i>Arthrobotrys musiformis</i>
Caxias do Sul	29° 10' 05" S 51° 10' 46" W	-
Santana do Livramento	30° 53' 27" S 55° 31' 58" W	-
Montenegro	29° 41' 19" S 51° 27' 40" W	-
Santa Maria	29° 41' 03" S 53° 48' 25" W	<i>Arthrobotrys musiformis</i>

¹ Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Laboratório de Micologia (MICVET)

² Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR)

³ Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Laboratório de Biologia e Parasitologia.

⁴ Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy-Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologias, Laboratório de Biologia Celular e Tecidual

*Autor correspondente: flaviaaraujo_vet@yahoo.com.br

Santa Vitória do Palmar	33° 31' 08" S 53° 22' 05" W	-
Rio Grande	32° 02' 06" S 52° 05' 55" W	- <i>Arthrobotrys musiformis</i>
Dom Pedrito	30° 58' 58" S 54° 40' 23" W	<i>Arthrobotrys musiformis</i>
Bagé	31° 19' 53" S 54° 06' 25" W	<i>Duddingtonia flagrans</i>
São Jorge	28° 30' 02" S 51° 42' 13" W	-

104 * - Nenhum fungo isolado.

105 **AGRADECIMENTOS**

106 A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela
107 Bolsa de doutorado e custeio do experimento.

108 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

109

110 BARRON, G. L. The nematode-destroying fungi. Ontario: Canadian Biological Publications,
111 p. 140, 1977.

112

113 COOKE, R. C.; GODFREY, B. E. S. A key of nematode destroying fungi. *Transactions*
114 *British Mycological Society*, Cambridge, v. 47, p. 61-74, 1964.

¹ Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Laboratório de Micologia (MICVET)

² Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR)

³ Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Laboratório de Biologia e Parasitologia.

⁴ Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy-Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologias, Laboratório de Biologia Celular e Tecidual

*Autor correspondente: flaviaaraujo_vet@yahoo.com.br

115 DALLA PRIA, M.; FERRAZ, S.; MUCHOVEJ, J.J. Isolamento e identificação de fungos
116 nematófagos de amostras de solo de diversas regiões do Brasil. *Nematologia Brasileira*, v.15,
117 p.170-176, 1991.

118

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

122

123 DE HOOG, GS, VAN OORSCHOT, C.A.N. Taxonomy of the Dactylaria complex. *Studies in*
124 *Mycology*, v. 26, p.1–122, 1985

125

126 GRAY, N.F. Ecology of nematophagous fungi: distribution and habitat. *Annals of Applied*
127 *Biology*, v.102, p.501-509, 1983.

128

129 LARSEN, M Biological control of nematode parasites in sheep. *Journal Animal Science*, v.
130 84, n. 1, p. 33-139. 2006.

131

¹ Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Laboratório de Micologia (MICVET)

² Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Laboratório de Doenças Parasitárias
(LADOPAR)

³ Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Laboratório de Biologia e Parasitologia.

⁴ Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy-Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologias,
Laboratório de Biologia Celular e Tecidual

*Autor correspondente: flaviaaraujo_vet@yahoo.com.br

- 132 LARSEN, M., WOLSTRUP, J., HENRIKSEN, S.A., DACKMAN, C., GRØNVOLD, J.,
133 NANSEN, P. 1991. *In vitro* stress selection of nematophagous fungi for biocontrol of
134 parasitic nematodes in ruminants. *Journal of Helminthology*, v.65, p.193–200, 1991
135
- 136 MARTINELLI, P.R.P; SANTOS, J. M., SANT’ANNA, S.J., SOARES, P.L.M. Fungos
137 Nematófagos em Pomares de Citros nos Estados de São Paulo e Goiás. *Nematologia*
138 *Brasileira*, v.33, n.2, p.123-131, 2009.
139
- 140 NAVES, R.L., CAMPOS, V.P. Ocorrência de fungos predadores de nematóides no sul de
141 Minas Gerais e estudo da capacidade predatória e crescimento *in vitro* de alguns de seus
142 isolados. *Nematologia Brasileira*, v.15, p.152-162, 1991.
143
- 144 RIBEIRO, R.C.F.; FERRAZ, S.; MIZOBUTSI, E.H.; MENEZES, M. Levantamento de
145 espécies de *Monacrosporium* predadoras de nematoides em diversas regiões brasileiras.
146 *Nematologia Brasileira*, v.23, n.2, p. 40-47, 1999.
147

¹ Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Laboratório de Micologia (MICVET)

² Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR)

³ Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Laboratório de Biologia e Parasitologia.

⁴ Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy-Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologias, Laboratório de Biologia Celular e Tecidual

*Autor correspondente: flaviaaraujo_vet@yahoo.com.br

- 148 RIBEIRO, R.C.F.; RODRIGUES, T.T.M.S.; XAVIER, A.A.; GOMES, L.I.S. Ocorrência de
149 fungos predadores de Nematóides sob solos de bananais, no norte de Minas Gerais.
150 *Unimontes Científica*, v.5, n.1, p. 1-8, 2003.
- 151
- 152 RUBNER, A. Revision of predacious hyphomycets in the *Dactylella-Monacrosporium*
153 complex. *Studies in mycology*, v.39, p. 1-135, 1996.
- 154
- 155 SANTOS, M. A. DOS; FERRAZ, J; MUCHOVEJ, J. Detection and ecology of
156 nematophagous fungi from Brazilian soils. *Nematologia Brasileira*, v.15, p.131-134, 1991.
- 157
- 158 SANTOS, C.P. *Isolamento, identificação, produção de fungos nematófagos e avaliação de*
159 *algumas características biológicas do fungo Duddingtonia flagrans*. Tese de doutorado,
160 UFRRJ, 2000. 90p.
- 161
- 162 SANTOS, C. P. Fungos Nematófagos. In: Cecília José Veríssimo. (Org.). Alternativas de
163 controle da verminose em pequenos. Nova Odessa: 2008, p. 83-103.
- 164

¹ Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Laboratório de Micologia (MICVET)

² Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR)

³ Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Laboratório de Biologia e Parasitologia.

⁴ Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy-Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologias, Laboratório de Biologia Celular e Tecidual

*Autor correspondente: flaviaaraujo_vet@yahoo.com.br

165 SAUMELL, C.A; PADILHA, T.; SANTOS, C. P.; ROQUE, M. V.C. Nematophagous fungi
166 in fresh feces of cattle in the mata region of minas gerais state, Brazil. *Veterinary*
167 *Parasitology*, v. 82, n. 1, p. 217-220, 1999.

168

169 SAUMELL, C.A; PADILHA, T.; SANTOS, C. P.; ROQUE, M. V.C. Nematophagous fungi
170 in sheep faeces in the Mata Region of Minas Gerais State, Brazil. *Mycological Research*, v.
171 104, n. 8, p. 1005-1008, 2000.

172

173 SILVA, J.F.V.; CAMPOS, V.P. Fungos endoparasitas de nematóides que ocorrem no Sul de
174 Minas Gerais, Brasil 2. Resultados de levantamento e avaliação in vitro da capacidade
175 parasitária de *Haptoglossa heterospora* Dreschler. *Nematologia Brasileira*, v.15, p.105-
176 110.1991.

177

178 VAN OORSCHOT C.A.N. Taxonomy of the *Dactylaria* complex. A review of *Arthrobotrys*
179 and allied genera. *Studies in Mycology*, v. 26, p.61-95, 1985.

180

181 WALLER, P.J. Parasite epidemiology, resistance and the prospects for implementation of
182 alternative control programs. Proceedings of a workshop organized by FAO and the Danish
183 Centre for Experimental Parasitology, Ipoh, Malaysia, 5-12 October 1997, p. 11-14. 1998.

¹ Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Laboratório de Micologia (MICVET)

² Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Laboratório de Doenças Parasitárias
(LADOPAR)

³ Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Laboratório de Biologia e Parasitologia.

⁴ Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy-Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologias,
Laboratório de Biologia Celular e Tecidual

*Autor correspondente: flaviaaraujo_vet@yahoo.com.br

3.2 ARTIGO 2

**Taxa de integridade e viabilidade do fungo nematófago *Duddingtonia flagrans*
após passagem pelo trato digestório de ovinos**

**AUTORES: ARAÚJO, F. B.; SILVA, S. S; MARMITT, I. V. P.; SERRA, E. F.;
SANTOS, C. P.; NASCENTE, P. S.; FARIA, R. O.; MEIRELES, M. C. A.**

Será submetido à revista: Acta Scientiae Veterinariae

1 **Taxa de integridade e viabilidade do fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* após**
2 **passagem pelo trato digestório de ovinos**

3

4 **Integrity and viability rate of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* after**
5 **passage through the digestive tract of sheep**

6

7 **Flávia Biasoli de Araújo^{1*}, Sergio Silva da Silva², Iuri Vladimir Pioly Marmitt², Patrícia**
8 **da Silva Nascente³, Emanoele Figueiredo Serra¹, Clóvis de Paula Santos⁴, Renata Osório**
9 **Faria¹, Mário Carlos Araújo Meireles¹**

10

11 **ABSTRACT**

12

13 The use of nematophagous fungi as biological controllers against gastrointestinal infective
14 larvae of sheep has been widely studied as a promising alternative because of the many
15 undesirable consequences caused by chemical compounds. However, in order to be
16 implemented as controller, the fungus must not only be able to pass through the

¹ Laboratório de Micologia (MICVET), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

² Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

³ Laboratório de Biologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

⁴ Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Centro de Biociências e Biotecnologias Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy-Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

17 gastrointestinal tract of animals with integrity but also remain viable in the feces to perform
18 their nematocidal activity on the environment. In view of the above, the aim of this study was
19 to quantify the intact chlamyospores of autochthonous nematophagous fungus *Duddingtonia*
20 *flagrans* after passage through the gastrointestinal tract of sheep and evaluate their viability,
21 using as parameter its reisolation. For the analyzes, the *D. flagrans* production was
22 performed in scale, using substrate and administered 5×10^5 chlamyospores/kg/body weight,
23 orally to seven sheep for six consecutive days. On the first day of fungal administration, feces
24 were collected directly from the rectum of animals at eight, 16 and 24 hours. Within five days
25 the collections were performed only 24 hours after administration. The results showed an
26 average recovery of 0.94% of intact chlamyospores, however, on the sixth day of
27 administration there was an increase in the recovery of chlamyospores of *D. flagrans*,
28 suggesting that there is a cumulative effect of the administration. Its viability was also tested
29 and attested by reisolation of *D. flagrans* from conidia present the feces of sheep. Therefore,
30 chlamyospores were able to cross the hostile environment of the gastrointestinal tract of
31 sheep and is therefore able to be used as a method of ecological control against
32 gastrointestinal nematodiosis small ruminants.

33

34 Key words: Biological control. *D. flagrans*. Sheep. Nematodes

35

36 **INTRODUÇÃO**

37

38 As pesquisas visando à utilização do biocontrole com fungos nematófagos contra as
39 nematodioses gastrintestinais de ovinos estão cada vez mais sendo estimuladas, visto os
40 grandes malefícios que os produtos químicos têm acarretado para o homem, animais e meio
41 ambiente [14].

42 Estes fungos são geofílicos [12] e vivem na matéria orgânica do solo [3], podendo ser
43 isolados de fezes de animais.

44 Estão sendo pesquisados como importantes agentes controladores de larvas
45 infectantes de ovinos, devido às inúmeras vantagens que apresentam, dentre elas, a
46 inocuidade e a especificidade, pois quando inserido em ecossistema, não induz profundas
47 transformações no mesmo [2]. Não são patógenos para os animais [17] e agem nas formas de
48 vida livre dos parasitas presentes no ambiente [10], portanto, não atuam dentro do animal
49 como as moléculas químicas presentes no mercado. A utilização do controle biológico parece
50 ser uma realidade, oferecendo uma alternativa eficiente e segura na redução da população de
51 larvas infectantes no ambiente [17, 19].

52 Em relação à administração, a melhor forma é a oral [25]. Uma vez ingerido, os
53 esporos atravessam o trato gastrintestinal do animal e são depositados nas fezes juntamente
54 com ovos de nematóides presentes. Nas fezes, germinam formando estruturas de captura que
55 são capazes de imobilizar as larvas que estão eclodindo, à medida que migram através da
56 massa fecal [9].

57 No entanto, os esporos da maioria das espécies de fungos não têm altas taxas de
58 sobrevivência ao passar pelo trato gastrintestinal de ruminantes. Pesquisadores compararam a
59 sobrevivência do fungo *Duddingtonia flagrans* com outros membros deste grupo, e *D.*
60 *flagrans* demonstrou taxas de sobrevivência maiores [9]. Desta forma, o objetivo do trabalho
61 foi avaliar a integridade e a viabilidade de *D. flagrans* após passagem pelo trato gastrintestinal
62 de ovinos.

63

64 **MATERIAIS E MÉTODOS**

65

66 O experimento foi conduzido na Faculdade de Veterinária, da Universidade Federal de
67 Pelotas, município de Capão do Leão, Rio Grande do Sul e foi aprovado pelo Comitê de Ética
68 em Experimentação Animal (CEEA), desta universidade, sob o número 2526.

69 A produção do isolado de *Duddingtonia flagrans* em substrato foi realizada no
70 Laboratório de Micologia da UFPel, segundo a técnica de [5], e consistiu em utilizar o cereal
71 milho como substrato. Foram adicionados 150 gramas de substrato úmido na proporção
72 107g/43mL de água destilada estéril, em garrafas de Roux, sendo, posteriormente,
73 autoclavadas a 121°C durante 15 minutos. Os fungos foram transferidos para as garrafas, e
74 estas, levadas à estufa, na temperatura controlada de 25°C e ausência de luz, por 21 dias.
75 Posteriormente, o material foi retirado das garrafas, homogeneizado, sendo acondicionado em
76 camadas finas (3-4 cm) em caixas plásticas para secagem em estufa a 25°C, e posterior
77 contagem dos clamidósporos produzidos pelo fungo. Após secagem, o cultivo de milho e
78 fungo foi homogeneizado, e retirado uma amostragem de 10 gramas. Foi realizada uma
79 maceração da amostra em gal e pistilo acrescido de 100 mL de água destilada. A suspensão
80 foi filtrada em uma peneira com malha de 100 micras de abertura. Então, retirou-se uma
81 alíquota da amostra para contagem na câmara de Neubauer, que foi realizada apenas nos
82 quadrantes maiores da câmara. Da contagem, obteve-se o número de clamidósporos/mL,
83 onde, posteriormente, fez-se a correlação entre o volume utilizado e o peso do animal, para
84 obtenção da quantidade de clamidósporos por grama. Após esse processo, foi obtido o
85 quantitativo de 650.000 clamidósporos/grama. O inóculo produzido foi administrado por via
86 oral, para sete ovinos, durante seis dias consecutivos, de acordo com o peso vivo.

87 Para avaliação da integridade dos clamidósporos, foram realizadas administrações que
88 consistiram em dois momentos: no primeiro dia, foi administrado substrato fúngico aos
89 animais, por uma única vez, e realizada coleta de fezes diretamente da ampola retal para

90 contagem de clamidósporos em três períodos: 8 horas após administração, 16 horas após
91 administração e 24 horas após a administração fúngica.

92 Nos dias subsequentes, que corresponderam ao segundo momento, os animais
93 receberam o substrato fúngico e as coletas de fezes foram realizadas no horário em que se
94 obteve maior quantidade de clamidósporos recuperados observado no primeiro momento (1º
95 dia), estabelecido em 24 horas após administração de *D. flagrans*.

96 Para quantificação desses esporos nas fezes, foi realizada a técnica de quantificação de
97 clamidósporos de *D. flagrans* [20], que consiste na contagem dos clamidósporos presentes nas
98 fezes em câmara de McMaster. Cada clamidósporo encontrado na câmara foi considerado
99 como 50 clamidósporos por grama de fezes (CPG). Os resultados das contagens provenientes
100 das amostras foram extrapolados para estimar a contagem total de clamidósporos eliminados
101 no dia, para uma quantidade diária de 1000g de fezes por ovino, de acordo com as pesquisas
102 sobre os dejetos sólidos de ovinos [6, 23].

103 Para análise da viabilidade do fungo, foram semeadas cinco gramas de fezes de cada
104 animal, provenientes do 6º dia de administração fúngica, uma amostra para cada placa,
105 contendo ágar-água 2%, adicionado do nematóide de vida livre *Panagrellus redivivus* e
106 mantidos em temperatura ambiente. Após 24 e 48 horas todas as placas foram observadas
107 com o auxílio de um microscópio óptico. Os conídios de *D. flagrans*, quando presentes nas
108 placas, foram coletados com auxílio de alça de platina e semeados em novas placas de Petri
109 contendo meio de cultura Potato Dextrose Agar (PDA), com adição de 5.000 *Panagrellus*
110 *redivivus*. As placas foram colocadas em estufa a 27°C e umidade de 80%. Após 48 na estufa,
111 estas placas foram observadas diariamente quanto à presença de anelamentos do fungo nos
112 nematóides, durante 10 dias.

113

114 RESULTADOS

115

116 A recuperação de clamidósporos relativa aos horários oito e 16 horas foi relativamente
117 baixa, portanto, apenas o horário das 24 horas foi considerado, e obteve uma média de
118 recuperação de clamidósporos entre os animais de $1,28 \times 10^6$. A recuperação de
119 clamidósporos desse primeiro dia de administração obteve uma média de 0,94%, ambos os
120 resultados estão demonstrados na tabela 1 e a recuperação dos dias subsequentes (dias 2, 3, 4,
121 5 e 6) está expressa na Tabela 2. Nas análises individuais de cada animal, não ocorreram
122 recuperações diárias de clamidósporos no mesmo ovino em todos os dias consecutivos.

123 Em relação às taxas de recuperação de clamidósporos acumuladas no período (dias 2,
124 3, 4, 5 e 6), expressos na Tabela 3, se obteve a taxa média de recuperação acumulada (0,57%).

125 Em relação à viabilidade de *D. flagrans* (reisolamento), após 24 horas das fezes dos
126 ovinos em presença do nematóide *Pangrellus redivivus* nas placas de Petri, já foi possível
127 identificar as estruturas do fungo. Foram observados os aglomerados de conídios de formato
128 ovóides, os conidióforos septados, eretos, retos e alongados com vários crescimentos
129 subapicais. A literatura refere que o cacho de conídios ocorre com a formação do primeiro
130 conídio e, na sequência, um novo ponto de crescimento aparece em seu lado ou levemente
131 abaixo, sendo o segundo conídio ali formado, sendo esse processo repetido várias vezes [4].

132

133 DISCUSSÃO

134 O presente trabalho demonstrou a passagem pelo trato gastrintestinal de ovinos.
135 Outros registros foram realizados após observação da passagem de *D. flagrans* pelo trato
136 gastroentérico por um período de até 24 horas [28]. Em outros relatos, também foi observado
137 em fezes de equinos, o desenvolvimento do fungo nematófago *Monacrosporium thaumasium*
138 por até 48 horas após uma única administração, sendo que os horários observados foram às

139 10, 13, 16, 19, 24, 48 e 72 horas [22]. Quando foram administrados micélios e conídios de
140 fungos nematófagos em terneiros, foram observadas eliminações nos horários de 15, 18, 21,
141 24, 48, 72, 96 e 110 horas [1].

142 Embora a taxa de passagem íntegra obtida (integridade dos clamidósporos), tenham
143 sido relativamente baixas no presente trabalho, foram consideradas satisfatórias. O resultado
144 da baixa recuperação pode estar associado à possibilidade de destruição dos clamidósporos
145 pelas enzimas estomacais e intestinais dos animais, visto que mais de 90% dos clamidósporos
146 são destruídos durante a passagem pelo trato digestório [13]. Outro fator relevante é a dose,
147 pois a quantidade de clamidósporos administrada é correlacionada fortemente às taxas de
148 eliminação. As dosagens recomendadas para ovinos variam entre $2,5 \times 10^5$ a 5×10^5
149 clamidósporos/kg/PV [16]. Em testes de campo são utilizadas doses diárias de um milhão ou
150 mais de clamidósporos/Kg/PV [21]. Outros pesquisadores obtiveram taxas de recuperação
151 variando entre 6,2 a 12,3%, entretanto as doses administradas por esses pesquisadores foram
152 mais altas em comparação ao ensaio realizado, as quais variaram entre 19,5 e $177,5 \times 10^6$
153 clamidósporos/Kg/PV [20].

154 Taxas ainda maiores foram recuperadas: 30,13%, entretanto, os clamidósporos foram
155 administrados em pélets [26]. A forma de administração é outro fator a ser discutido em
156 relação às altas taxas de eliminação. A administração do clamidósporo em cápsula dá a
157 certeza que o animal ingeriu a exata quantidade de fungo fornecida, ao contrário do que
158 ocorre quando se oferece ao animal os clamidósporos associados à matéria-prima como sorgo
159 ou milho [15], como foi o fornecimento do presente trabalho. Portanto, outro fator relativo à
160 baixa recuperação de clamidósporos, pode também ser associado ao substrato fornecido.

161 Pesquisadores demonstraram que o efeito do fungo no ambiente é dependente da dose:
162 quanto maior a dose administrada de clamidósporos, maior a eliminação desses esporos, mas
163 que acima de determinado nível, uma maior dose de clamidósporos não causa uma maior

164 eliminação [20]. Isso significa que a quantidade de fungo estipulada de acordo com o peso
165 vivo do animal, é suficiente para ser realizado um controle efetivo. Portanto, permite-se
166 extrapolar e predizer que os animais que não eliminaram clamidósporos todos os dias
167 consecutivos no presente trabalho, não comprometeram a efetividade do controle. O controle
168 biológico visa estabelecer uma situação em que os animais em regime de pasto sejam
169 expostos a um baixo nível de larvas infectantes, isto é, não objetivam exterminar todos os
170 parasitas, mas sim, assegurar o desenvolvimento da imunidade natural adquirida [43].

171 Embora esta tenha sido menor que a taxa de recuperação de 0,94% encontrada nas
172 primeiras 24 horas, os resultados inferem uma tendência de aumento na recuperação total de
173 clamidósporos no último dia de avaliação, sugerindo que o efeito de recuperação pode ser
174 acumulativo com a continuidade da aplicação de doses nos animais, como demonstra a figura
175 1.

176 Em relação ao reisolamento do fungo a partir das fezes, outros pesquisadores também
177 obtiveram êxito com a mesma metodologia utilizada nesse trabalho. Foram obtidos dois
178 isolados de *D. flagrans*, um em fezes bovinas e outro em fezes caprinas, no estado do Ceará
179 [24]. O solo é um excelente ambiente à proliferação de fungos nematófagos, e onde houver
180 matéria orgânica em devida proporção, a probabilidade é ainda maior de ocorrer essa
181 proliferação, como as fezes, que constituem um meio rico para a germinação fúngica [7].

182 As placas que foram incubadas na estufa contendo conídios e *Panagrellus redivivus*,
183 foram observadas estruturas de anelamentos (redes adesivas) envolvendo os nematóides.

184 As estruturas de predação dos fungos nematófagos são importantes dados a serem
185 constituídos e catalogados, pois reflete na prática o que ocorre natural e fisiologicamente no
186 bolo fecal dos animais.

187 CONCLUSÕES

188 O isolado autóctone de *Duddingtonia flagrans*, utilizado para testes de persistência, foi
189 capaz de atravessar o trato gastrintestinal de ovinos, e quando reisolado a partir das fezes, foi
190 desafiado pelos nematóides de vida livre *Panagrellus redivivus* demonstrando atividade
191 predatória.

192 A comprovação da integridade e da viabilidade deste isolado após a passagem pelo
193 trato gastroentérico de ovinos, permite novos estudos sobre seu potencial de biocontrole de
194 nematóides.

195

196 **REFERÊNCIAS**

197

198 1 **ARAÚJO, J. V.; STEPHANO, M.A.; & SAMPAIO, W. M.** 1999. Passage of
199 nematode trapping fungi through the gastrointestinal tract of calves. *Veterinary*
200 *Archives*. 69 (2): 69-78.

201

202 2 **ARAÚJO, J. V.; ASSIS, R. C. L.; CAMPOS, A. K.; & MOTA, M.** 2004. Atividade
203 *in vitro* dos fungos nematófagos dos gêneros *Arthobotrys*, *Duddingtonia* e
204 *Monacrosporium* sobre nematóides trichostrongilídeos (Nematoda:
205 Trichostrongyloidea) parasitos gastrintestinais de bovinos. *Revista Brasileira de*
206 *Parasitologia Veterinária*, São Paulo. 13: 65-71.

207

208 3 **BARRON, G. L.** 1977. *The nematode-destroying fungi*. Ontario: Canadian Biological
209 Publications. 140.

210

211 4 **COOKE, R. C.** 1969. Two Nematode-Trapping *Hyphomycetes*, *Duddingtonia*
212 *flagrans* gen. et comb. Nov. and *Monacrosporium mutabilis* sp. nov. *Transactions of*
213 *the British Mycological Society*, Cambridge. 53: 315-319.

214

215 5 **CRUZ, D. G.; CORDEIRO, R. C.; LOPES, A.J.O. ; ROCHA, L. V.; & SANTOS,**
216 **C. P.** 2008. Comparação da eficácia de diferentes isolados dos fungos nematófagos
217 *Arthrobotrys* spp. e *Duddingtonia flagrans* na redução de larvas infectantes de
218 nematóides após a passagem pelo trato digestivo de ovinos. *Revista Brasileira de*
219 *Parasitologia Veterinária*. 17: 133-137.

220

- 221
- 222 6 **DAVID, D. B.** 2012. Uso de indicadores fecais e urinários para monitoramento
223 nutricional de ovinos em pastejo. Tese (doutorado em Zootecnia) – Universidade
224 Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de Pós-Graduação
225 em Zootecnia. Porto Alegre.
- 226
- 227 7 **FAEDO, M.; LARSEN, M.; DIMANDER, S. O.; YEATES, G. W.; HOGLUND,**
228 **J.; & WALLER, P. J.** 2002. Growth of the fungus *Duddintognia flagrans* in soil
229 surrounding faeces deposited by cattle or sheep fed the fungus as a means of
230 controlling the free living stages of nematode parasite. *Biological Control*, Orlando.
231 23: 64-70.
- 232
- 233 8 **FERNÁNDEZ, A. S.; LARSEN, M.; NANSEN P.; HENNINGSEN E.;**
234 **GRØNVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; HENRIKSEN, S. A.; & BJORN, H.** 1999. The
235 ability of the nematode trapping fungus *Duddingtonia flagrans* to reduce the
236 transmission of infective *Ostertagia ostertagi* larvae from faeces to herbage. *Journal*
237 *of Helminthology*, London. 73: 115-122.
- 238
- 239 9 **FONTENOT, M. E.; MILLER, J. E.; PEÑA, M. T.; LARSEN, M.; &**
240 **GILLESPIE, A.T.** 2003. Efficiency of feeding *Duddingtonia flagrans*
241 chlamydospores to grazing ewes on reducing availability of parasitic nematode larvae
242 on pasture. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam. 118: 203-213.
- 243

- 244 10 **GILL, H. S. & LE JAMBRE, L. F.** 1996. Novel approaches to the control of
245 helminth parasites of livestock. *International Journal for Parasitology*, Oxford. 26:
246 915-925.
- 247
- 248 11 **GOMES, A. P. S.** 1998. Controle biológico *in vivo* de nematódeos parasitos
249 gastrintestinais de bovinos pelo fungo *Arthrobotrys robusta* e atividade *in vitro* de
250 isolados do fungo *Monacrosporium* sobre nematódeos. 81 p. Dissertação (Mestrado
251 em Medicina Veterinária) - Departamento de Veterinária, Universidade Federal de
252 Viçosa.
- 253
- 254
- 255 12 **GRAY, N. F.** 1987. Nematophagous fungi with special reference to their ecology.
256 *Biology Revision*. 62: 245-397.
- 257
- 258 13 **GRONVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; LARSEN, M.; GILLESPIE, A.; &**
259 **GIACOMAZZI, F.** 2004. Interspecific competition between the nematode trapping
260 fungus, *Duddingtonia flagrans*, and select microorganisms and the effect of spore
261 concentration on the efficacy of nematode trapping. *Journal of Helminthology*. 78: 41-
262 46.
- 263
- 264 14 **JACKSON, F. & MILLER, J.** 2006. Alternative approaches to control – Quo vadit?
265 *Veterinary Parasitology*. 139: 371-384.
- 266

- 267 15 **JOBIM, M. B.; SANTURIO, J. M.; & DE LA RUE, M. L.** 2008. *Duddingtonia*
268 *flagrans*: controle biológico de nematódeos de bovinos a campo. *Ciência Rural*. 38
269 (8): 2256-2263.
- 270
- 271 16 **KETZIS, J. K.; VERCRUYSSSE, J.; STROMBERG, B. E.; LARSEN, M.;**
272 **ATHANASIADOU, S.; & HOUDIJK, J. G.** 2006. Evaluation of efficacy
273 expectations for novel and non-chemical helminth control strategies in ruminants.
274 *Veterinary Parasitology*, Amsterdam. 139: 321-335.
- 275
- 276 17 **LARSEN, M.** 1999. Biological control of helminths. *International Journal for*
277 *Parasitology*, Oxford. 29: 139-146.
- 278
- 279 18 **MELO, L. M; BEVILÁQUA, C. M. L; ARAÚJO, J. V; & MELO, A. C. F. L.**
280 2003. Atividade predatória do fungo *Monacrosporium thaumasium* contra o
281 nematóide *Haemonchus contortus*, após passagem pelo trato gastrintestinal de
282 caprinos. *Ciência Rural*. 33: 169-171.
- 283
- 284 19 **MOTA, M. A.; CAMPOS, A. K.; & ARAÚJO, J. V.** 2003. Controle Biológico de
285 helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. *Pesquisa*
286 *Veterinária Brasileira*, Brasília. 23: 93-100.
- 287
- 288 20 **OJEDA-ROBERTOS, N. F.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; AYALA-BURGOS,**
289 **A.; AGUILAR-CABALLERO, A.J.; COB-GALERA L. A.; & MENDOZA-DE-**
290 **GIVES P.** 2008. A technique for the quantification of *Duddingtonia flagrans*
291 chlamydospores in sheep faeces. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam. 152: 339-343.

292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316

21 PEÑA, M. T.; MILLER, J. E.; FONTENOT, M. E.; GILLESPIE, A.; & LARSEN, M. 2002. Evaluation of *Duddingtonia flagrans* in reducing infective larvae of *Haemonchus contortus* larvae in feces off sheep. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam. 103: 259-265.

22 RÉDUA, C. R. O; SICILIANO, S; MUJICA, F; ARAÚJO, J. V; & RODRIGUES, M. L.A. 2002. Avaliação da passagem do fungo nematófago *Monacrosporium thaumasium* pelo trato gastrintestinal de equinos. *Ciência Animal*, 12 (2): 133-136.

23 RODRIGUES, D.J.; EZEQUIEL, J. M. B.; & HOMEM JUNIOR, A.C. et al. 2009. Indicadores internos para estimativas de digestibilidade, produção fecal e consumo em cordeiros. In: Congresso Brasileiro de Zootecnia. Águas de Lindóia. **Anais...** São Paulo: Zootecnia. CD-ROM.

24 SANTOS, C. P.; SAUMELL, C. A.; PADILHA, T.; & LARSEN, M. 1998. Nematophagous fungi in decomposing ruminant and equine feces in Brazil. In: *International conference novel approaches to the control of helminths parasites of livestock, Baton Rouge. Proceedings.* (Baton Rouge). pp. 59.

25 SANYAL, P.K. 2000. Screening for Indian isolates of predacious fungi for use in biological control against nematode parasites of ruminants. *Veterinary Research Communications*. 24: 55-62.

- 317
- 318 26 **SILVA, A. S.; ZANETTE, R. A.; GRESSLER, L.T.; DALLA ROSA, L.;**
319 **SANTURIO, J. N.; & MONTEIRO, S. G.** 2009. Técnicas Parasitológicas adaptadas
320 para quantificação de clamidósporos do fungo *Duddingtonia flagrans* em fezes ovinas
321 e na pastagem. *Veterinária e Zootecnia*. 16 (2): 373-378.
- 322
- 323 27 **THAMSBORG, S. M.; POEPSTORFF, A.; & LARSEN, M.** 1999. Integrated and
324 biological control of parasites in organic and conventional production systems.
325 *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, 84: 169-186.
- 326
- 327 28 **WALLER, P.J., LARSEN, M., & FAEDO, M. et al.** 1994. The potential of
328 nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of
329 sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. *Veterinary Parasitology*. 51: 289-299.

Tabela 1. Dose de clamidósporos administrada aos ovinos de acordo com o peso do animal, número de clamidósporos recuperados nas fezes após 24 horas e taxa de passagem íntegra do isolado autóctone de *Duddingtonia flagrans*

Ovino	Peso do animal (Kg)	Dose administrada/dia	Número de clamidósporos recuperados após 24 horas	Taxa de passagem íntegra
1	25	$12,5 \times 10^6$	1×10^5	0,80%
2	30	$1,5 \times 10^7$	-	0,00%
3	26	$1,3 \times 10^7$	1×10^5	0,77%
4	30	$1,5 \times 10^7$	3×10^5	2,00%
5	30	$1,5 \times 10^7$	1×10^5	0,67%
6	25	$12,5 \times 10^6$	1×10^5	0,80%
7	26,5	$13,25 \times 10^6$	2×10^5	1,51%
Média	27,5	$13,75 \times 10^6$	128.571	0,94%

Tabela 2. Contagens individuais de clamidósporos recuperados ao dia das fezes dos sete ovinos, média das contagens e total de clamidósporos do isolado autóctone de *Duddingtonia flagrans* recuperados no período de cinco dias de administração

Ovino	C. Cl.* - Dia 2	C. Cl.* - Dia 3	C. Cl.* - Dia 4	C. Cl.* - Dia 5	C. Cl.* - Dia 6	Total
1	1x10 ⁵	-	-	1x10 ⁵	1x10 ⁵	3x10 ⁵
2	-	-	-	1x10 ⁵	1x10 ⁵	2x10 ⁵
3	1x10 ⁵	1x10 ⁵	-	-	1x10 ⁵	3x10 ⁵
4	3x10 ⁵	-	1x10 ⁵	1x10 ⁵	3x10 ⁵	8x10 ⁵
5	1x10 ⁵	1x10 ⁵	-	-	1x10 ⁵	3x10 ⁵
6	1x10 ⁵	-	4x10 ⁵	-	4x10 ⁵	9x10 ⁵
7	2x10 ⁵	1x10 ⁵	-	-	2x10 ⁵	5x10 ⁵
Média	128.571	42.857	71.428	42.857	185.714	471.428

C.Cl.*: contagem de clamidósporos

Tabela 3. Dose total de clamidósporos administrada aos ovinos nos dias 2, 3, 4, 5 e 6, número total de clamidósporos recuperados nas fezes durante esse período e a taxa de passagem íntegra acumulada do isolado autóctone de *Duddingtonia flagrans*

Ovino	Peso do animal (Kg)	Dose administrada total	Número de clamidósporos recuperados	Taxa de passagem íntegra acumulada
1	25	$7,5 \times 10^7$	3×10^5	0,40%
2	30	9×10^7	2×10^5	0,22%
3	26	$7,8 \times 10^7$	3×10^5	0,38%
4	30	9×10^7	8×10^5	0,89%
5	30	9×10^7	3×10^5	0,33%
6	25	$7,95 \times 10^7$	9×10^5	1,20%
7	26,5	$6,625 \times 10^7$	5×10^5	0,63%
Média	27,5	$6,875 \times 10^7$	471.429	0,57%

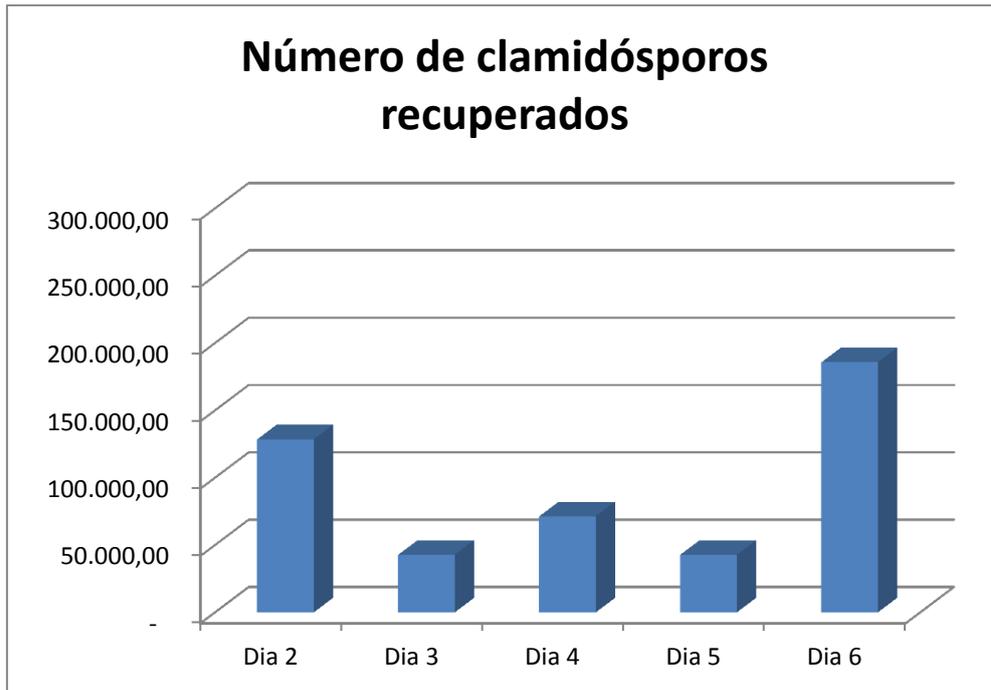


Figura 1. Médias das contagens de clamidósporos do isolado autóctone de *Duddingtonia flagrans* recuperados nas fezes dos sete ovinos por dia

3.3 ARTIGO 3:

Efeito nematofágico de *Duddingtonia flagrans* no controle de larvas de ovinos em estufa e campo

Autores: ARAÚJO, F. A.; SILVA, S. S.; MARMITT, I. V. P.; SERRA, E. F.; SANTOS, C. P.; FARIA, R. O.; NASCENTE, P. S.; MEIRELES, M. C. A.

Será submetido à revista: Brazilian Journal of Veterinary Parasitology

Efeito nematofágico de *Duddingtonia flagrans* no controle de larvas de ovinos em estufa e campo.

***Duddingtonia flagrans* nematophagic effect in the control of sheep larvae in bacteriological oven and field.**

Flávia Biasoli de Araújo¹; Sergio Silva da Silva²; Iury Vladimir Piolly Marmitt²; Emanuele Figueiredo Serra¹; Clóvis de Paula Santos³; Renata Osório Faria¹; Patrícia da Silva Nascente⁴; Mário Carlos Araújo Meireles¹.

¹ Laboratório de Micologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

² Laboratório de Doenças Parasitárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

³ Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Centro de Biociências e Biotecnologias Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy-Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

⁴ Laboratório de Biologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

ABSTRACT

Biocontrol using nematophagous fungi against gastrointestinal nematodiosis sheep is being widely researched, because this species is very susceptible to parasitism and the harm caused by chemical molecules are numerous. This study aimed to quantify and test the effectiveness of nematocidal *Duddingtonia flagrans*, administering the chlamydospores of the fungus to eight sheep at three different doses, for six consecutive days. To do so, the feces of the animals were collected by adult diapers in three shifts: 8am (shift I), 16h (shift II) and 24 (shift III), with a part devoted to bacteriological oven

* Campus Universitário, S/Nº - CEP 96160-000 – Capão do Leão, RS, Brasil..

Telefone: 32757140. Email: flaviaaraujo_vet@yahoo.com.br

incubation and another in deposits of field plots. The results showed no difference in the reduction of larvae between shifts, however there was a reduction in the number of infective larvae in the cultures of both bacteriological oven and in the field ($p < 0,05$). The average recovery of larvae in treated groups was lower than in the control group, in both evaluations of the fungus as in controlled environment (oven), and in the recovery of the fungus adverse environments (field). The recovered larvae were counted and identified, and the most prevalent nematode was *Haemonchus contortus*. It was concluded that the *D. flagrans* is capable of being used as a biological controller for gastrointestinal larvae of sheep, due to its elimination in sheep feces and thus reducing contamination in the field.

Key words: Biological Control. *D. flagrans*. Sheep. Worms

RESUMO

O biocontrole utilizando fungos nematófagos contra as nematodioses gastrintestinais de ovinos está sendo amplamente pesquisado, pois essa espécie é muito suscetível à verminose e os malefícios causados pelas moléculas químicas são inúmeros. O presente trabalho objetivou quantificar e testar a eficácia nematicida de *Duddingtonia flagrans*, administrando os clamidósporos do fungo para oito ovinos, em três doses distintas, durante seis dias consecutivos. Para tanto, as fezes dos animais foram coletadas por meio de fraldas geriátricas em três turnos: às 8h (turno I), 16h (turno II) e 24h (turno III), sendo uma parte destinada à incubação em estufa e outra, em depósitos de parcelas no campo. Os resultados revelaram que não houve diferença na redução de larvas entre os turnos, entretanto ocorreu redução no número de larvas infectantes tanto nas culturas da estufa como no campo ($p < 0,05$). A média de recuperação de larvas nos grupos tratados foi menor em relação ao grupo controle, tanto nas avaliações de ambiente controlado ao fungo (estufa), quanto nas recuperações de ambientes adversos ao fungo (campo). As larvas recuperadas além de contabilizadas foram identificadas, sendo o nematóide *Haemonchus contortus* o mais prevalente. Foi possível concluir que *D. flagrans* é passível de ser utilizado como controlador biológico de larvas gastrintestinais de ovinos, pois demonstrou eliminação nas fezes com conseqüente diminuição da contaminação no campo.

Palavras – Chave: Controle Biológico. *D. flagrans*. Ovinos. Verminose

INTRODUÇÃO

O parasitismo gastrointestinal em ovinos é fator limitante significativo nos sistemas de produção de animais criados a campo, no mundo todo (WAGHORN, 2003).

A forma mais utilizada para controlar o endoparasitismo é a utilização de compostos químicos (MOLENTO, 2004). Entretanto, a resistência dos parasitas frente aos fármacos, propicia cada vez mais o estudo de métodos alternativos de controle (ARAÚJO, 2004).

O conhecimento sobre a disponibilidade de larvas no ambiente, detecção e fontes de infecção, conhecimento sobre as exigências climáticas para a eclosão de ovos, viabilidade larvar e o sistema de produção, são os requisitos mais importantes no estabelecimento de um sistema de controle efetivo do parasitismo (MOTA et al., 2003). Portanto, estratégias de manejo da pastagem, que visem reduzir a ingestão de L₃ pelos animais, são importantes para o estabelecimento de medidas de controle das infecções por nematóides gastrintestinais. Dessa forma, a estimativa do número de larvas infectantes (L₃) nas pastagens é de suma importância nos estudos epidemiológicos (KRECEK; MAINGI, 2004).

Os fungos nematófagos estão sendo cada vez mais pesquisados como forma de utilização no controle biológico de larvas de nematóides gastrintestinais de ruminantes. Possuem várias vantagens, como: alta atividade reprodutiva e ciclo de vida curto; sendo que algumas espécies produzem esporos o que aumenta sua resistência dentro e fora dos animais; a exemplo de *Duddingtonia flagrans*; mantém-se em fase saprofítica na ausência do hospedeiro e, principalmente, não são patógenos para os animais (LARSEN, 1999).

Este trabalho teve por objetivo testar o efeito nematófágico do isolado *Duddingtonia flagrans* em diferentes concentrações na dieta de ovinos, sobre larvas infectantes de nematóides gastrintestinais em condições controladas (estufa) e adversas (campo).

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, município de Capão do Leão, Rio Grande do Sul, latitude 31°42'S e longitude 52°24'O e altitude de 57m. A área é caracterizada por um clima subtropical úmido, com temperatura média anual de 17,8°C e precipitação 1367mm (EMBRAPA).

O experimento foi registrado no Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA), desta universidade, sob o número 2526.

A produção de fungo em substrato foi realizada segundo Santos et al. (2001), em que consistiu na associação do cereal milho com clamidósporos do isolado *DfBage#215* de *Duddigtonia flagrans*. Com o inóculo final, foi obtido o quantitativo de 175.000 clamidósporos/grama, o qual foi administrado por via oral em ovinos, doses variando entre 1×10^5 a 5×10^5 clamidósporos/Kg/PV.

Durante os meses de outubro e novembro de 2013, oito ovinos (*Ovis aries*) naturalmente infectados com nematóides gastrintestinais, com dois anos de idade, fêmeas com peso médio de 29,7 Kg ($\pm 2,20$) foram divididos em quatro grupos, aleatoriamente, de dois animais cada ($n=2$ /grupo), homogêneos por idade e peso, os quais foram estabelecidos, individualmente, por todo período experimental.

Durante os primeiros trinta dias, os animais receberam ração 16% de proteína bruta, alfafa peletizada e água *ad libitum* para promover a adaptação ruminal à dieta como preparo para recebimento do inóculo de fungo. Posterior a esse período de adaptação, amostras de sangue foram colhidas da veia jugular dos animais utilizando-se sistema BD vacutainer com anticoagulante (Becton & Dickinson), nos dias -2, -1 e 0. Após a colheita, as amostras foram enviadas ao Laboratório de Doenças Parasitárias da UFPel para a aferição do hematócrito. Os animais também foram analisados clinicamente pelo método Famacha (VAN WYK et al., 2002). A partir do dia 0, os quatro grupos de ovinos permaneceram estabelecidos por mais seis dias consecutivos para administração de clamidósporos do isolado autóctone de *D. flagrans* e coleta de material fecal. Os animais do Grupo I (controle) receberam apenas substrato sem o fungo. Os animais do Grupo II receberam a dosagem de 1×10^5 clamidósporos/Kg/PV; os animais do Grupo III receberam $2,5 \times 10^5$ clamidósporos/Kg/PV e os animais do Grupo IV receberam 5×10^5 clamidósporos/Kg/PV. As administrações de substrato fúngico foram realizadas diariamente, uma única vez. As coletas de fezes dos animais

foram realizadas três vezes ao dia: turno I (conteúdo fecal do interstício das 0h à 8h), turno II (conteúdo fecal do interstício das 8h à 16h) e turno III (conteúdo fecal do interstício das 16h às 24h) com o auxílio de fraldas geriátricas, as quais eram trocadas a cada turno. O material recolhido das fraldas foi pesado individualmente, sendo posteriormente identificados e enviados ao Laboratório de Doenças Parasitárias da UFPel para processamentos.

As amostras de fezes foram processadas segundo a técnica de Gordon & Withlock (1939), em triplicata, para quantificação dos ovos por grama de fezes (OPG). Na sequência, foram submetidas ao teste de CPG (OJEDA- ROBERTOS, 2008), que significa quantificar os clamidósporos por grama de fezes, utilizando câmara de McMaster.

Para análise do fungo em ambiente controlado, foram realizadas coproculturas, as quais foram incubadas em estufa BOD com temperatura de 28°C e umidade de 80% (ROBERT'S; O'SULLIVAN, 1950), na quantidade de 10g e realizados nos dias 2, 4 e 6 após administração fúngica (DAAF). O material foi incubado em estufa BOD, para obtenção de L₃. Após 14 dias de incubação, foi realizada a contagem e identificação de larvas dos quatro grupos (UENO; GONÇALVES, 1998).

Paralelamente, amostras de fezes de quatro dos oito animais (um de cada grupo), dos turnos I e II, foram depositadas em campo nativo, com altura de 20 cm de vegetação, em quantidade de 500 g do material recolhido das fraldas. Foi realizado um prévio experimento, utilizando o método de lavagem de pasto (CORT et al., 1922), para obter-se a comprovação do campo livre de nematóides gastrintestinais de ovinos.

O módulo experimental para obtenção de L₃ da pastagem foi constituído por vinte e quatro parcelas de campo de 40 x 40 cm (1600 cm²) cada uma, constituídas de pastagem nativa. As parcelas foram separadas com fios de arame, estacas de madeira e limitadores de grama, para que as larvas presentes nas fezes não migrassem para a parcela vizinha. As parcelas foram dispostas longitudinalmente em três linhas e oito colunas: oito parcelas em cada linha, correspondentes aos depósitos de fezes dos turnos I e II do dia 2 DAAF (primeira linha), depósito de fezes do dia 4 DAAF (segunda linha) e depósito de fezes do dia 6 DAAF (terceira linha). Portanto, cada duas parcelas da mesma linha continham fezes do mesmo animal e do mesmo dia, distintos por turnos: I e II. Após 14 dias de deposição dos bolos fecais da primeira linha (2 DAI), as forragens

correspondentes às parcelas de vegetação foram coletadas. Para a colheita das amostras de forragens das parcelas correspondentes às linhas 2 e 3, também foram respeitados os 14 dias de incubação no ambiente (4 DAI e 6 DAI).

As colheitas das fezes e do pasto das parcelas foram feitos por meio de cortes rasteiros, às 6 horas da manhã (período de maior umidade e probabilidade de recuperação de larvas) e pesadas individualmente. As amostras de pasto foram imersas em baldes plásticos, contendo água à 42°C, segundo a técnica de Baermann (CORT et al., 1922), onde ficaram sedimentando por 24 horas, com o propósito das larvas presentes migrarem do pasto por termohidrotropismo para o fundo do balde. O sobrenadante contendo as forrageiras foi removido e o sedimento ficou por mais 4 horas em copos de Hoffman. Após esse período, o material foi conservado em álcool 70% para identificação do número de larvas (UENO; GONÇALVES, 1998).

Dois gramas das fezes remanescentes de cada uma das 24 parcelas foram recolhidos e colocados em sacos plásticos identificados para processamentos no laboratório. As larvas destas alíquotas foram separadas das fezes e colocadas em placas de Petri, sendo colocado um papel filtro umedecido com água na tampa superior da placa. O material permaneceu em estufa a 25°C durante sete dias. Após o período, as amostras fecais foram colocadas sobre um lenço de papel, dentro de uma peneira, que por sua vez, foi colocada em cálice de Hoffman, no qual foi adicionada água até que a amostra de fezes tivesse coberta. As amostras permaneceram no cálice por 24 horas, obtendo assim, as larvas infectantes das fezes (AMARANTE et al., 2008).

Os resultados obtidos da lavagem de pasto foram correlacionados com umidade e temperaturas máxima e mínima do período, obtidos da estação Agroclimatológica de Pelotas/Capão do Leão – Clima Temperado.

Para os resultados referentes às larvas recuperadas em estufa e em pastagem, a normalidade dos dados foi confirmada pelo teste de Shapiro-Wilk e posteriormente submetidos à Análise de Variância (ANOVA), comparando os quatro grupos, pelo teste de Tukey com nível de significância de 5% de probabilidade pelo software Statistix® (2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As recuperações de clamidósporos variaram de acordo com as dosagens administradas, sendo que em nenhuma câmara de McMaster do grupo controle foi demonstrada quaisquer estruturas fúngicas durante as observações realizadas (figura 1).

A figura 1 demonstra a recuperação média diária (grupos II, III, IV) de clamidósporos entre os grupos tratados. As linhas de tendências indicam que quanto maior a dosagem fúngica utilizada, maior a eliminação, de clamidósporos eliminados com a confiabilidade de 0,843%, 0,982% e 0,986%, correspondentes aos grupos, II, III e IV, respectivamente. Portanto, os altos coeficientes de determinação (R^2) obtidos, evidenciaram satisfatoriedade no modelo ao explicar os dados obtidos, pois indicaram uma tendência de aumento de eliminação de clamidósporos com a continuidade das administrações de fungo.

Esses resultados corroboram com os resultados de Ojeda-Robertos et al. (2008), que também obtiveram maior recuperação quanto maior a dosagem de fungo. Ojeda-Robertos et al. (2009), justificam as altas taxas de destruição do fungo ao local gastroentérico ser um ambiente inóspito. Especificamente, demonstraram que as maiores perdas ocorrem no abomaso, e que o número de clamidósporos perdidos na digestão no rúmen era insignificante, pois as enzimas do estômago são em principal, responsáveis pela destruição. Gronvold et al. (2004), em seus trabalhos, concluíram que mais de 90% dos clamidósporos foram destruídos durante a passagem pelo trato digestório de ovinos.

Ojeda-Robertos et al. (2008), obtiveram resultados semelhantes ao presente trabalho, aos quais obtiveram percentuais de recuperação de clamidósporos variando entre 6 e 12%.

Os resultados das avaliações clínicas e físicas realizadas nos animais estão descritas na Tabela 1. Os valores de hematócrito estiveram fortemente relacionados com os respectivos graus Famacha. Segundo Molento et al. (2004), o exame de Famacha é uma eficiente ferramenta para o controle da sanidade dos animais, visto que na verminose ovina, o principal parasita é hematofágico, o *Haemonchus contortus*. Já a correlação é baixa entre ovos por grama de fezes (OPG) e hematócrito, pois existem outros vermes além do *Haemonchus contortus* que não são hematofágicos, mas são responsáveis pelo aumento do valor de OPG. Entretanto, esse exame foi de fundamental importância nesse estudo, pois constituiu um parâmetro que permitiu avaliar não só os níveis de infecção dos animais, mas também o de contaminação das pastagens por

larvas de nematóides gastrintestinais (AMARANTE et al., 1996), visto que o biocontrole com fungos é realizado no ambiente.

A recuperação absoluta de larvas infectantes no campo dos turnos I e II foi de 180 e 160 L₃, respectivamente. Não foi observada diferença entre os turnos ($p > 0,05$).

As figuras 2, 3 e 4 demonstram a percentagem de larvas recuperadas em estufa oriundas das fezes dos dias 2 DAAF, 4 DAAF e 6 DAAF, respectivamente, nos dois turnos realizados.

Em todas as culturas dos grupos tratados com fungo houve diminuição no percentual de L₃ comparados ao controle. Os resultados obtidos vão ao encontro dos trabalhos de Rocha et al. (2008), que obtiveram taxas de recuperação de L₃, também em ambiente controlado de 30,5%. Nos grupos tratados com fungo, foi possível observar que houve diminuição da quantidade de larvas infectantes (L₃) obtidas em relação ao grupo controle, em todos os dias (2 DAAF, 4 DAAF e 6 DAAF), até mesmo no Grupo II, em que a quantidade administrada de fungo foi a mais baixa, apenas 1×10^5 clamidósporos/Kg/PV. Nas outras dosagens, os percentuais de recuperação foram menores ainda em relação ao controle, comprovando a atividade nematicida do isolado utilizado. Ketzis et al. (2006), também obtiveram diminuição de larvas recuperadas quando utilizaram dosagens de fungo variando entre $2,5 \times 10^5$ a 5×10^5 clamidósporos/Kg/PV.

A grande maioria dos pesquisadores utiliza dosagens para ovinos variando entre $2,5 \times 10^5$ e 5×10^5 clamidósporos/Kg/PV, entretanto Aguilar et al. (2008), trataram ovinos durante dez dias com pellets de *Duddingtonia flagrans* com a dosagem de 2×10^6 clamidósporos/Kg/peso vivo e conseguiram um percentual de redução de 81,2% da contaminação larval em relação ao grupo controle. Esse resultado é pouco significativo no que tange a quantidade de fungo administrada, pois pesquisadores já utilizaram doses relativamente menores e obtiveram eficácias semelhantes. Waghorn et al. (2003), obtiveram uma eficácia bem similar: 78% apenas com dosagens fúngicas entre $2,5 \times 10^5$ e 5×10^5 clamidósporos/Kg/PV.

A figura 5 demonstra as diferenças estatísticas na recuperação de L₃ entre os grupos tratados com o fungo e o grupo não tratado (controle), em estufa. As avaliações do 2 DAAF e 6 DAAF, obtiveram os mesmos resultados: o grupo I diferiu dos grupos II e III, isto é, houve uma menor recuperação larval em relação ao grupo I, comprovando a

eficácia do isolado de *D. flagrans*. Sobre L₃. O grupo IV respondeu de forma mais satisfatória, diferiu não apenas do grupo I, mas também dos grupos II e III. No 4 DAAF, todos grupos diferiram entre si, comprovando não só a atividade nematicida de *D. flagrans* como uma maior atividade quanto maior a quantidade de fungo administrada.

As avaliações estatísticas de recuperação nas parcelas do campo estão representadas na figura 6. No 2 DAAF e 4 DAAF, os grupos II, III e IV diferiram do grupo I, comprovando a eficiência de *D. flagrans*. No 6 DAAF, o grupo II diferiu do grupo I (controle), e os grupos III e IV diferiram dos grupos I e II, atestando que o aumento da dose, sugere um maior efeito.

A percentagem de larvas recuperadas (2 DAI) das oito parcelas oriundas do campo depositadas no dia 2 DAAF (primeira linha), estão demonstradas no figura 7. A percentagem de larvas recuperadas (4 DAI) das oito parcelas oriundas do campo depositadas no dia 4 DAAF (segunda linha), estão demonstradas na figura 8 e a percentagem de larvas recuperadas (6 DAI) das oito parcelas oriundas do campo depositadas no dia 6 DAAF (terceira linha), estão demonstradas na figura 9.

As figuras 7, 8 e 9, demonstram que em todas as colheitas ocorreu uma relação inversamente proporcional: as percentagens de recuperação, pois diminuíram conforme o aumento da dose fúngica.

O discernimento da quantidade de larvas infectantes no campo é de extrema importância, pois a utilização do controle biológico com fungos nematófagos baseia-se na redução de larvas infectantes na pastagem. Portanto, técnicas que objetivam diminuir a contaminação da pastagem, significam um grande avanço no controle das helmintoses, reduzindo o uso de anti-helmínticos (CASTRO et al., 2002). Padilha; Mendoza-De-Gives (1996) corroboram com a afirmação de que a redução do número de larvas infectantes seja um dos principais objetivos no controle das verminoses. Essa redução pode se dar por meio da higienização das pastagens com a ingestão passiva de larvas, pois a forragem é o maior veículo de transmissão das nematodioses aos animais (CASTRO et al., 2002).

As baixas taxas de recuperação de L₃ das fezes podem ser justificadas pela não migração das mesmas do bolo fecal. Segundo Andersen; Levine (1968), outra justificativa de baixa recuperação de L₃ na pastagem, deve-se a elevada mortalidade de larvas de primeiro e segundo estágio que são bastante susceptíveis à dessecação. Portanto, é adequada a mensuração das fezes sobressalentes do campo para obter-se uma maior precisão da contaminação.

As figuras 10, 11 e 12, demonstram a percentagem de recuperação de larvas infectantes das fezes, oriundas das parcelas do campo. Os resultados evidenciam percentagens menores de recuperação nos grupos em que foram utilizados *D. flagrans*.

Os resultados das percentagens de recuperação de L₃ entre os grupos comprovam estatisticamente o potencial nematofágico do fungo *D. flagrans* de acordo com a figura 13. No 2 DAAF e 4 DAAF, todos os grupos diferiram entre si, evidenciando que o aumento da dose fúngica foi capaz de predação mais L₃. No 6 DAAF, os grupos II e III, diferiram do grupo I e o grupo IV foi o mais efetivo em relação a morte de larvas infectantes.

Outros pesquisadores também comprovaram a eficácia de *D. flagrans* nas reduções de L₃. Chandrawathani et al. (2003), na Malásia, compararam os exames de OPG's. Os animais que receberam tratamento com fungo, obtiveram valores de até 500 OPG, enquanto que os que não recebiam, chegavam em níveis que excediam a 3000 OPG. Nos Estados Unidos, Fontenot et al. (2003), obtiveram uma redução de larvas infectantes na pastagem e em culturas fecais após administração diária de *D. flagrans*, superior a 80%. Waghorn et al. (2003), alimentaram borregos por dois dias consecutivos e obtiveram uma eficácia de 78%.

Santurio et al. (2011), na região sul do Brasil, administraram 1x10⁶ clamidósporos/Kg/PV em ovinos parasitados com nematóides gastrintestinais, obtendo uma diminuição de 37,6% de diminuição da carga larval na forragem, em relação ao grupo controle. Durante esse período, os animais precisaram ser tratados com anti-helmíntico por três vezes, enquanto que os animais tratados com fungo mantinham os níveis de infecção baixos.

Os resultados referentes à identificação das larvas recuperadas tanto em ambiente controlado (estufa), como do ambiente adverso (campo), foram obtidos os seguintes percentuais: *Haemonchus* spp. (89%), *Cooperia* (4%), *Trichostrongylus* spp. (4%), *Oesophagostomum* spp. (2%) e *Nematodirus* spp. (1%). Segundo (Mortensen et al., 2003), *Haemonchus contortus* é o mais patogênico de todos os nematóides e o que causa maior impacto econômico, encontrado em 75% a 100% dos exames de contagem de ovos por grama de fezes – (OPG). Estudos realizados por Leal (2012) revelam que mais de 80% da carga parasitária dos ovinos são compostos por esse parasita, corroborando com os resultados obtidos.

Em relação à obtenção dos dados climáticos em uma pesquisa que envolva o controle biológico, estes são de extrema relevância, na medida em que a atividade que

vai ser estudada e avaliada ocorre no ambiente, e está inteiramente exposta a todos fatores externos (adversos). A meteorologia interfere diretamente tanto na eclodibilidade dos ovos dos nematóides, como na atividade nematofágica do fungo. Braga (1986) define que o índice de precipitação pluviométrica é o principal fator pelo aumento das infecções parasitárias, pois o déficit hídrico, assim como seu excesso, prejudica significativamente o desenvolvimento de larvas infectantes no pasto, e o processo de translação que é a taxa de contaminação dos animais com larvas infectantes (L₃) apresenta variações decorrentes do clima. Roberts; O'Sullivan. (1950), corroboram e relatam que o índice regular de precipitação pluvial é extremamente necessário para a migração de larvas para a pastagem.

No presente trabalho, tanto nos dias de deposição das fezes no campo (D2, D4 e D6), como nos dias de coleta de pastagem (2DAI, 4DAI e 6DAI) não houve amplitudes e/ou alterações que interferissem nos resultados, pois o índice de precipitação pluviométrica, a umidade e a temperatura média, permaneceram constantes por todo esse período. A umidade relativa do ar foi de 82%, a temperatura média 22°C. Os dois primeiros dias que choveram foram responsáveis pela umidade do solo durante o período experimental, aliado a taxa de umidade relativa do ar, que se manteve favorável para suprir a carência de água, facilitar a eclosão dos ovos e a atividade fúngica. Urquhart et al. (1998), salientam que em tempos secos, o microclima das fezes ou da superfície do solo pode ter umidade suficiente para permitir o desenvolvimento das larvas. Segundo Carneiro; Amarante (2008), o microclima nas pastagens é de fundamental importância para o desenvolvimento e para a sobrevivência dos estágios de vida livre dos nematóides, sendo que as pastagens altas propiciam um ambiente mais favorável para a sobrevivência do nematóide *Haemonchus contortus* do que as forragens mantidas baixas.

CONCLUSÃO

Os clamidósporos do isolado autóctone de *D. flagrans* foram capazes de atravessar o trato gastrointestinal de ovinos nas diferentes concentrações administradas e realizar sua atividade nematicida nas larvas infectantes de ovinos, tanto nos cultivos de campo quanto nos cultivos da estufa, sendo que o gênero predominante de larvas infectantes presentes no estudo foi *Haemonchus* spp.

REFERÊNCIAS

AGUILAR, J. A. C. MENDOZA DE GIVES, P.; L'OPEZ ARELLANO, M. E.; HERNANDEZ E. L. Evaluation of Multinutritional Pellets Containing *Duddingtonia flagrans* Chlamydospore for the Control of Ovine Haemonchosis. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2008; 1149:161–163.

AMARANTE, A. F. T.; PADOVANI, C. R.; BARBOSA, M.A. Contaminação de pastagens por larvas de nematóides gastrintestinais parasitos de bovinos e ovinos em Botucatu - SP. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, São Paulo 1996; 5 (2): 25-73.

AMARANTE A. F. T. Fatores que afetam a resistência dos ovinos à verminose. In: VERÍSSIMO, C.J. *Alternativas de controle da verminose em pequenos ruminantes*. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, p. 15-21, 2008.

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*. *Ciência Rural* 2004; 34: 457–463.

BRAGA, R. M. Sobrevivência de larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais de bovinos, sob condições naturais. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, Rio de Janeiro, 1986; 8: 186-188.

CARNEIRO, R. D.; AMARANTE, A. F. T. Seasonal effect of three pasture plants species on the free-living stages of *Haemonchus contortus*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 2008; 60(4): 864-872.

CASTRO, A. A.; ALMEIDA, L. R.; GUEDES JÚNIOR, D. S.; FARIA, M. F. R.; FONSECA, A. H. Migração vertical de larvas infectantes de nematóides gastrintestinais de ruminantes em pastagens, durante a estação chuvosa, no município de Seropédica, RJ, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA,

12, 2002, Rio de Janeiro. *Anais...* Rio de Janeiro: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2002.

CHANDRAWATHANI, P.; JAMNAH, O.; WALLER, P. J.; LARSEN, M.; GILLESPIE, A. T.; ZAHARI, W. M. Biological control of nematode parasites of small ruminants in Malaysia using the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans*. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam 2003; 117: 173-183.

CORT, W. W.; ACKERT, J. E.; AUGUSTINE, D. L.; PAYNE, F. K. Investigations on the control of hookworm disease. II. The description of an apparatus for isolating infective hookworm larvae from soil. *American Journal of Hygiene*, Baltimore 1922; 2 (1): 1-16.

FONTENOT, M. E.; MILLER, J. E.; PEÑA, M. T.; LARSEN, M.; GILLESPIE, A.T. Efficiency of feeding *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to grazing ewes on reducing availability of parasitic nematode larvae on pasture . *Veterinary Parasitology*, Amsterdam 2003; 118:203-213.

GRONVOLD, J; WOLSTRUP, J; LARSEN, M; GILLESPIE, A; GIACOMAZZI, F. Interspecific competition between the nematode-trapping fungus, *Duddingtonia flagrans*, and selected microorganisms and the effect of spore concentration on the efficacy of nematode trapping. *Journal of Helminthology* 2004; 78:41-46.

KAPLAN, R.; VIDYASHANKAR, A. An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam 2012; 186:70- 78.

KRECEK, R.C.; MAINGI, N. Comparison of two techniques used for the recovery of third-stage strongylid nematode larvae from herbage. *Veterinary Parasitology*, v. 122, n. 3, p. 233-243, 2004.

LARSEN, M., 2000. Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious micro fungi. *Parasitology*, 2000; 20: 121-131.

LEAL, T. M. A redução de anti-helmínticos no controle da verminose em caprinos e ovinos. *Portal dia de campo*. Acesso em: 21 set. 2012. Disponível em: <<http://www.diadecampo.com.br/>>.

MOLENTO, M. B.; TASCA, C.; GALLO, A.; FERREIRA, M.; BONONI, R.; STECCA, E. Método Famacha como parâmetros clínico individual de infecção por *Haemonchus contortus* em pequenos ruminantes. *Ciência Rural*, Santa Maria 2004; 34: 1139- 1145.

MORTENSEN, L. L.; WILLIAMSON, L. H.; TERRILL, T. H.; KIRCHER, R. A.; LARSEN, M.; KAPLAN, R. M. Evaluation of revalence and clinical implications of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of goats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, New York 2003; 223 (4): 495-500.

MOTA, M. A.; CAMPOS, A. K.; ARAÚJO, J. V. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 2003; 23: 93-100.

OJEDA-ROBERTOS N. F.; TORRES-ACOSTA J. F. J.; AYALA-BURGOS A.J.; SANDOVAL-CASTRO C. A.; VALERO-COSS R. O.; MENDOZA-DE-GIVES P. Digestibility of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores in ruminants: *in vitro* and *in vivo* studies. *BMC Veterinary Research* 2009;.5: p.46.

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

ROCHA, R.; ROCHA, G.; BRICARELLO, P. A.; AMARANTE, A. F. T. Recuperação de larvas infectantes de *Trichostrongylus colubriformis* em três espécies de gramíneas contaminadas no verão. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 2008; 17 (4): 227-234.

ROSENWEIG W. D. Role of aminoacids, peptides and medium composition in trap formation by nematode-trapping fungi. *Canadian Journal of Microbiology* 1983; 30: 265–267

SANTOS, C. P.; SAUMELL, C. A.; PADILHA, T.; LARSEN, M. Nematophagous fungi in decomposing ruminant and equine feces in Brazil. In: INTERNATIONAL CONFERENCE NOVEL APPROACHES TO THE CONTROL OF HELMINTHS PARASITES OF LIVESTOCK, 2, 1998, Baton Rouge. *Proceedings...* Baton Rouge. p. 59, 1998.

SANTOS, C. P.; PADILHA, T.; RODRIGUES, M. L. A. Predatory activity of *Arthrobotrys oligospora* and *Duddingtonia flagrans* on pre-parasitic larval stages of cyathostominae under different constant temperatures. *Ciência. Rural* 2001; 31 (5):.839-842.

SANTURIO, J. M.; ZANETTE, R.A.; DA SILVA, A. S. FANFA, V. R. FARRET, M.H.; FAGAGNIN, L.; HECKTHEUER.; MONTEIRO, S, G. A suitable model for the utilization of *Duddingtonia flagrans* fungus in small-flock-size sheep farms. *Experimental Parasitology* 2011; 127: 727–731.

STROMBERG, B. E. Environmental factors influencing transmission, 1997; 72: 247–264.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. *Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes*, 4 ed. Tóquio: Japan International Cooperation Agency, 1998.

VAN WYK J. A., BATH, G.F. The FAMACHA system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. *Veterinary Research*. 2002; 33: 509–529.

WAGHORN, T. S.; LEATHWICK, D. M; CHEN, L. Y; SKIPP. R. A. Efficacy of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against three species of gastrointestinal nematodes in laboratory faecal cultures from sheep and goats. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, 2003;118: 227-234.

Tabela 1: Valores do dia zero de Graus Famacha, hematócrito e OPG dos oito ovinos.

Brinco	Graus FAMACHA	Hematócrito ± (DP)	OPG
Grupo I (1)	3	22,0 ± 1	5.100
Grupo I (2)	3	22,0 ± 1,5	4.800
Grupo II (3)	3	19,3 ± 1,5	5.100
Grupo II (4)	4	17,3 ± 0,57	8.300
Grupo III (5)	3	18,6 ± 1,52	9.800
Grupo III (6)	4	17,3 ± 1,52	14.500
Grupo VI (7)	2	24,3 ± 0,57	2.300
Grupo VI (8)	3	22,6 ± 1,15	3.800

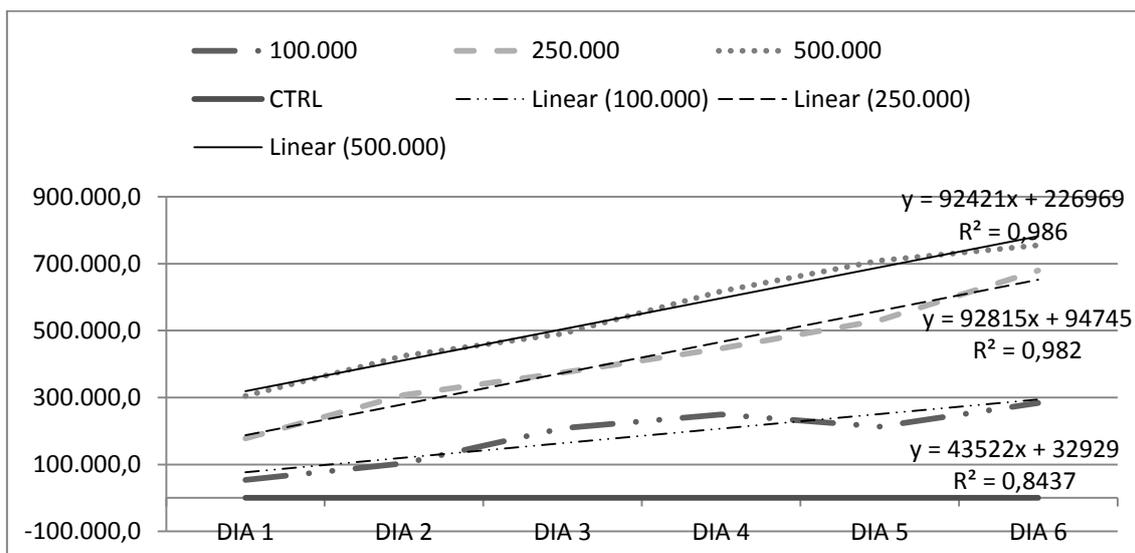


Figura 1. Recuperação total diária de clamidósporos do isolado de *Duddingtonia flagrans* no volume do conteúdo fecal dos oito ovinos durante o período de seis dias (média dos grupos).

Eixo X: Dias de avaliação para recuperação de clamidósporos

Eixo Y: Quantificação de clamidósporos

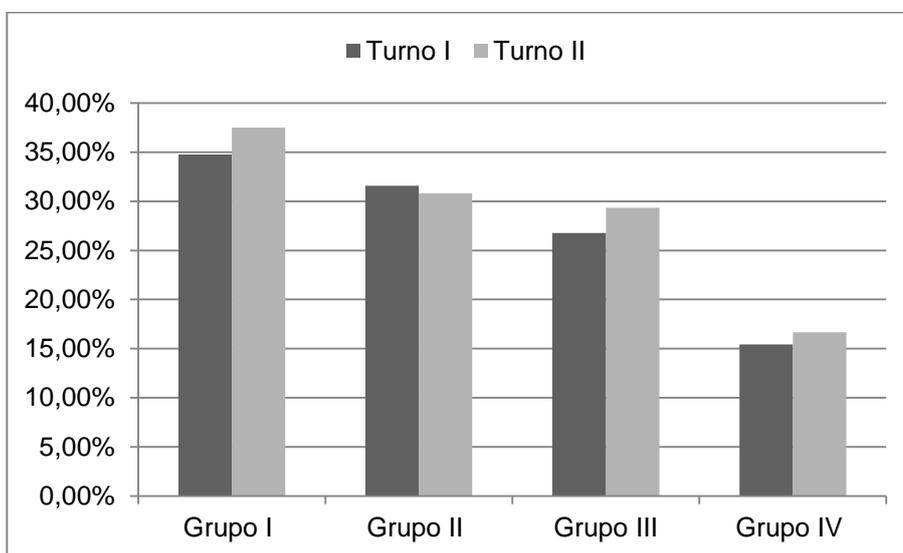


Figura 2 – Percentuais de larvas recuperadas provenientes das fezes do 2 DAAF, dos turnos I e II, após cultura em estufa BOD, por 14 dias.

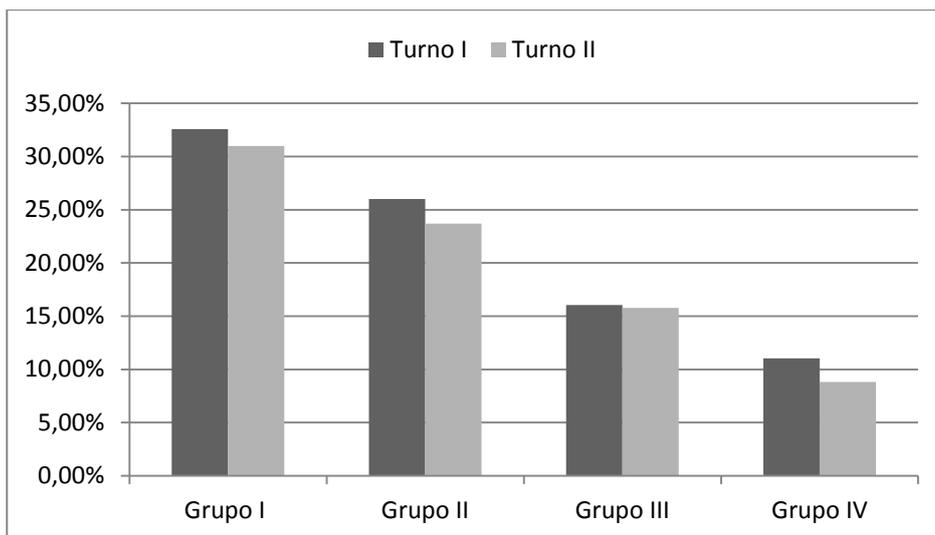


Figura 3 – Percentuais de larvas recuperadas provenientes das fezes do 4 DAAF, dos turnos I e II, após cultura em estufa BOD, por 14 dias.

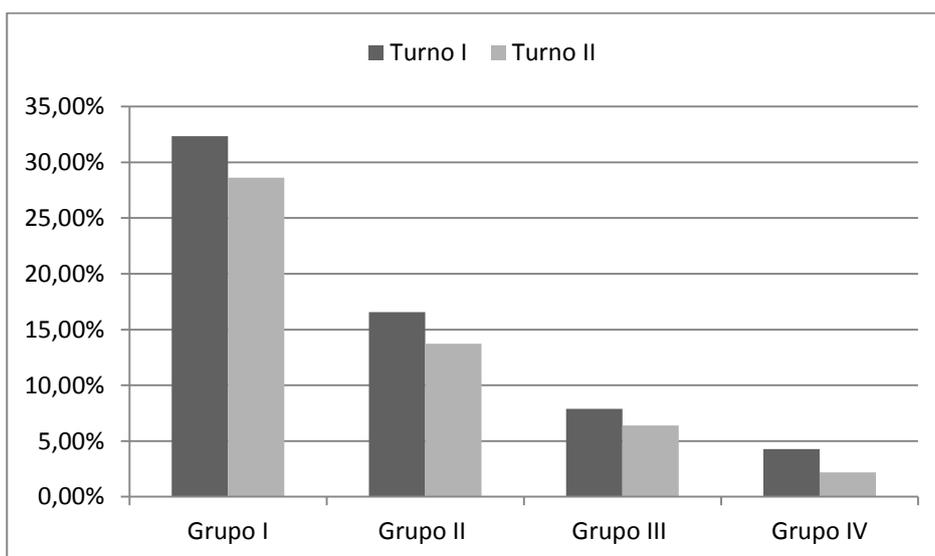


Figura 4 – Percentuais de larvas recuperadas provenientes das fezes do 6 DAAF, dos turnos I e II, após cultura em estufa BOD, por 14 dias.

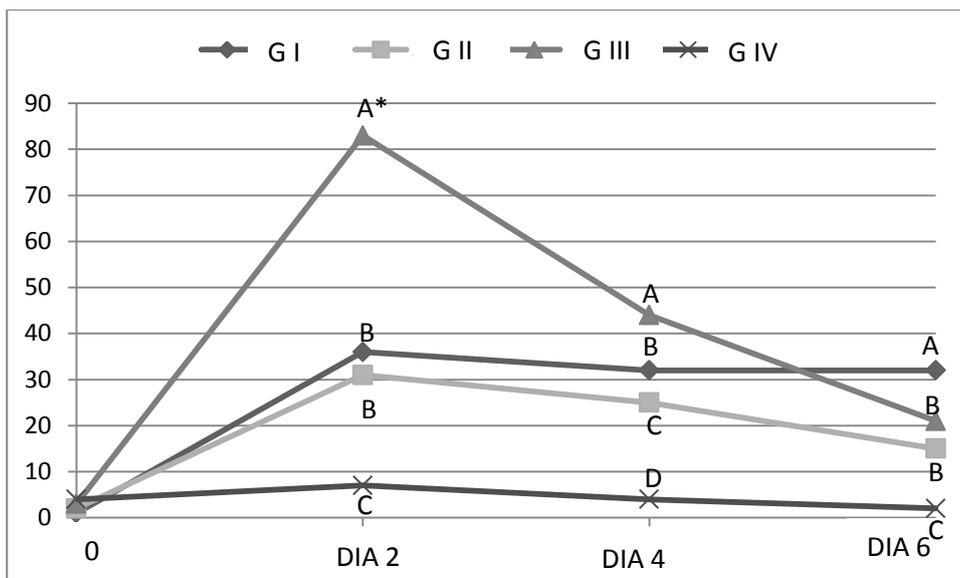


Figura 5 – Quantidade total de larvas recuperadas na estufa dos grupos tratados e controle do 2 DAAF, 4 DAAF e 6 DAAF

*Letras diferentes no mesmo dia, indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

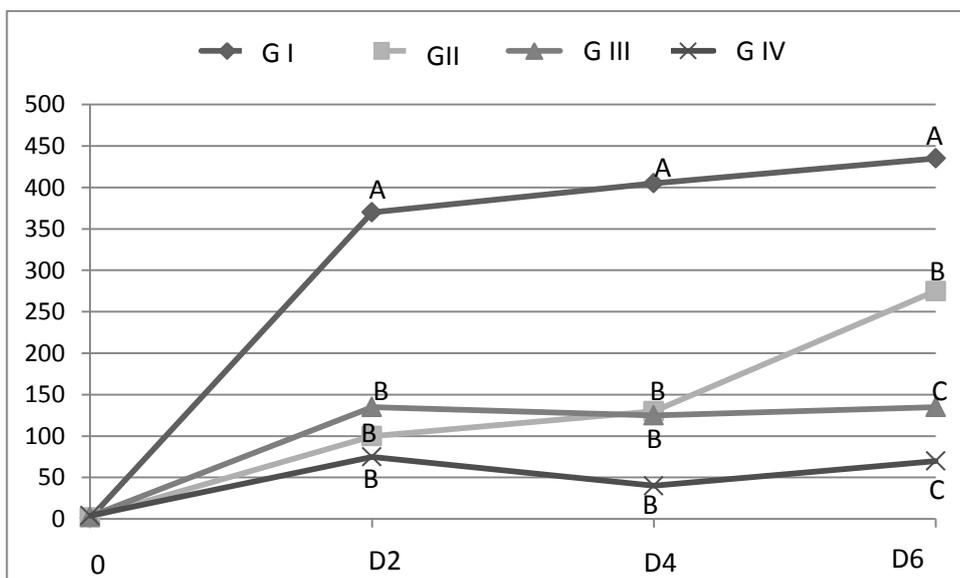


Figura 6 - Quantidade total de larvas recuperadas nas parcelas de campo dos grupos tratados e controle do 2 DAAF, 4 DAAF e 6 DAAF.

*Letras diferentes no mesmo dia, indicam diferença significativa ($p < 0,05$)

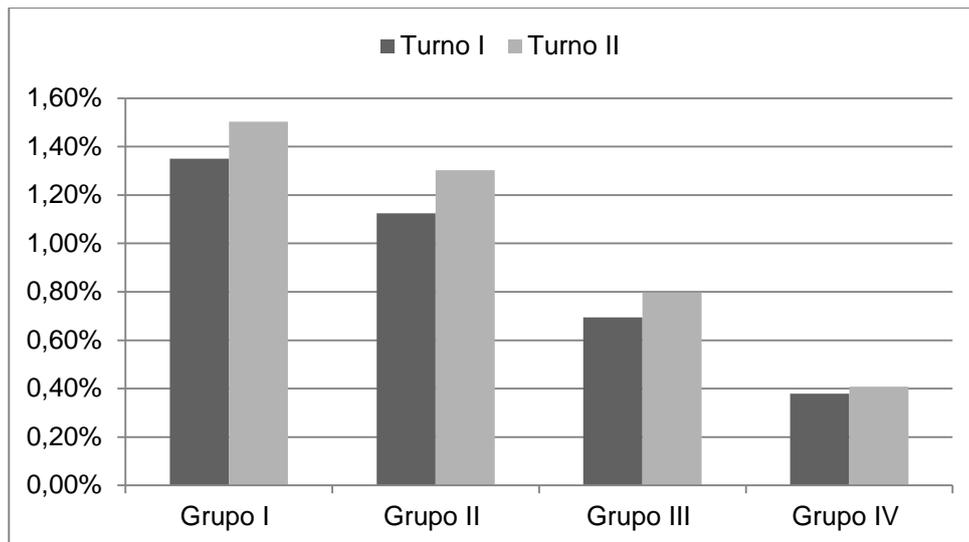


Figura 7 – Percentuais de larvas recuperadas das parcelas de campo oriundas das fezes depositadas no dia 2 DAAF e dos turnos I e II, após 14 dias (2 DAI).

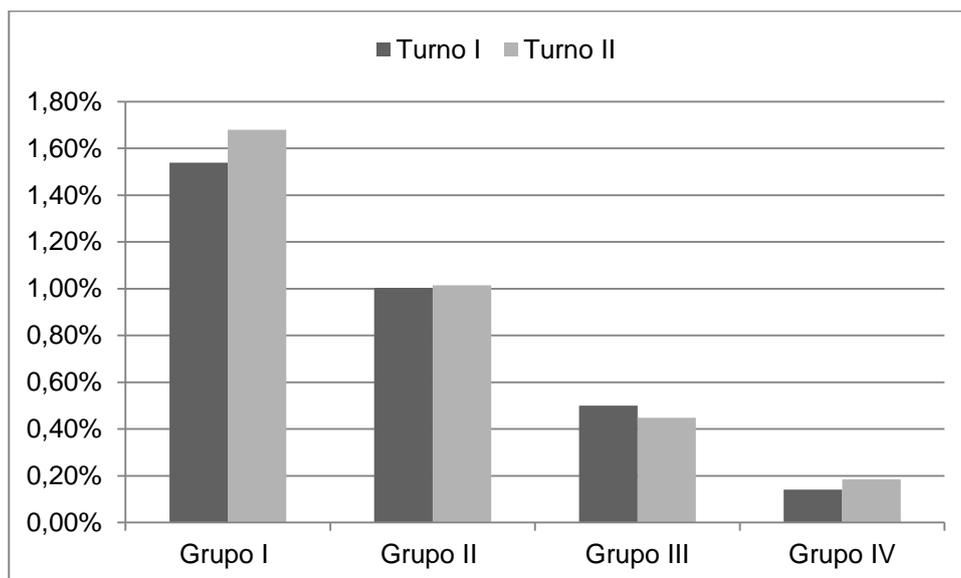


Figura 8 – Percentuais de larvas recuperadas das parcelas de campo oriundas das fezes depositadas no dia 4 DAAF e dos turnos I e II, após 14 dias (4 DAI).

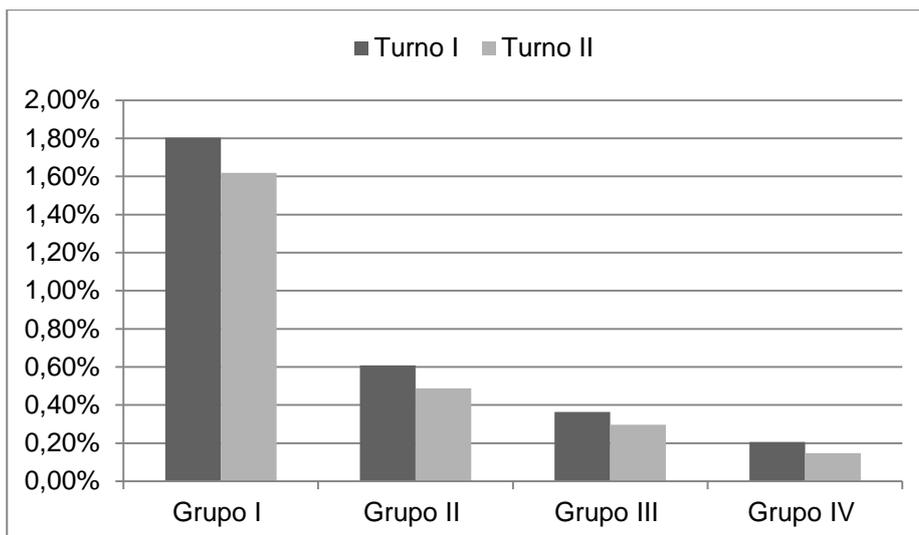


Figura 9 – Percentuais de larvas recuperadas das parcelas de campo oriundas das fezes depositadas no dia 6 DAAF e dos turnos I e II, após 14 dias (6 DAI).

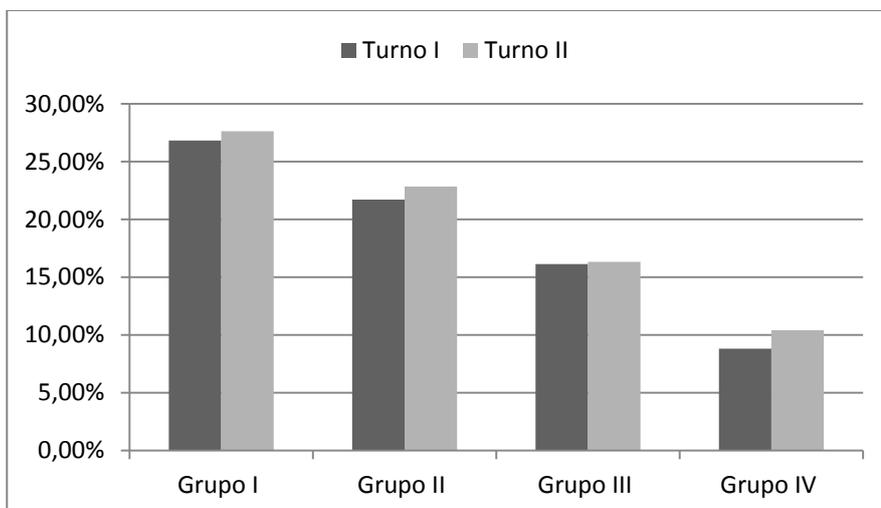


Figura 10 - Percentuais de larvas recuperadas oriundas dos dois gramas de fezes depositadas no campo e cultivadas em estufa do 2 DAAF.

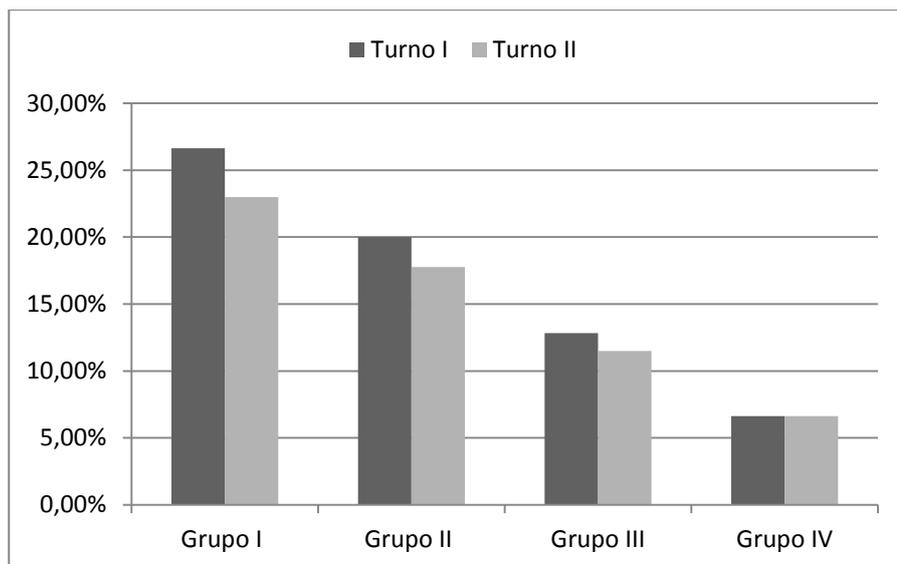


Figura 11 - Percentuais de larvas recuperadas oriundas dos dois gramas de fezes depositadas no campo e cultivadas em estufa do 4 DAAF.

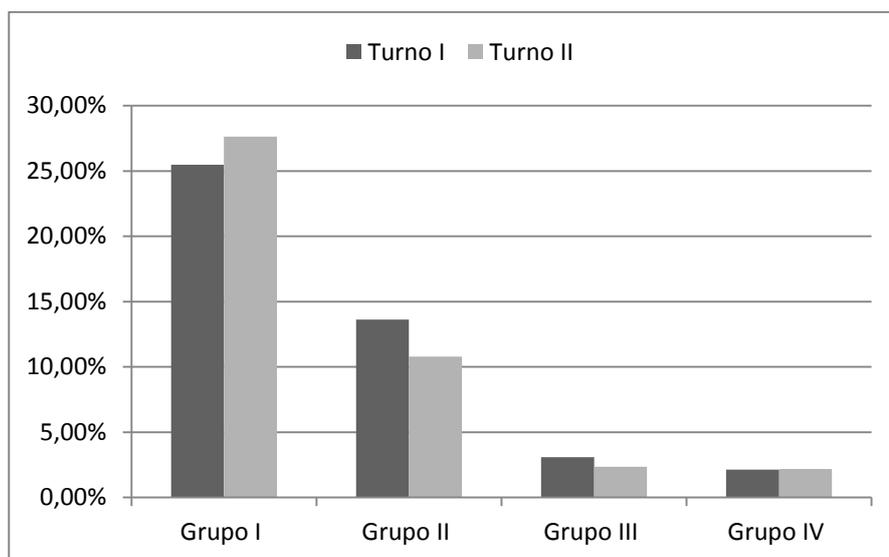


Figura 12 - Percentuais de larvas recuperadas oriundas dos dois gramas de fezes depositadas no campo e cultivadas em estufa do 6 DAAF.

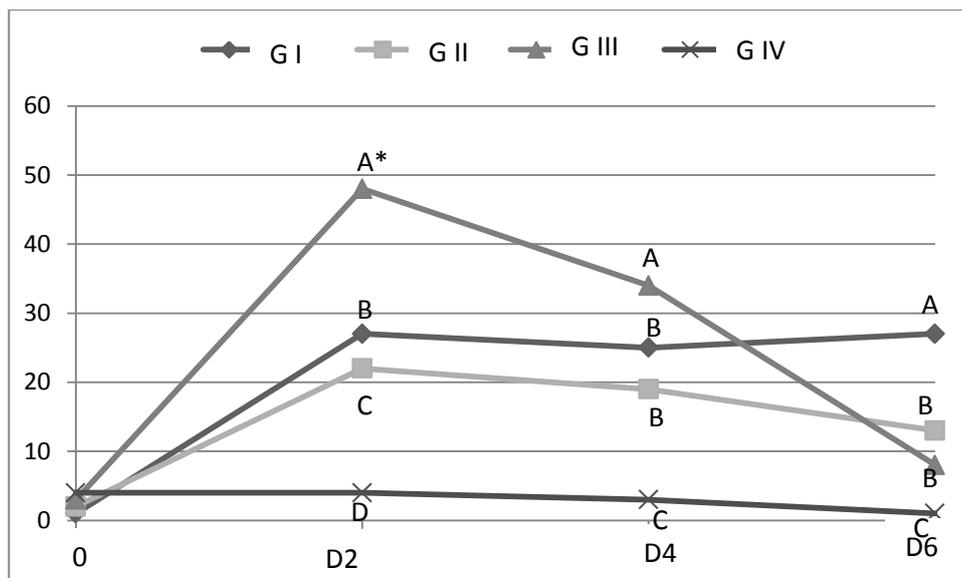


Figura 13 - Quantidade total de larvas recuperadas nas fezes residuais do campo (2 gramas) dos grupos tratados e controle do 2 DAAF, 4 DAAF e 6 DAAF.

*Letras diferentes no mesmo dia, indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

4 CONCLUSÕES GERAIS

Fungos geofílicos isolados no Rio Grande do Sul apresentam potencial nematofágico para o controle de vermes gastrintestinais de ovinos;

O isolado autóctone de *D. flagrans* demonstrou viabilidade ao atravessar o ambiente inóspito do trato gastrintestinal de ovinos, assim como demonstrou seu potencial germinativo e a capacidade de predação de larvas infectantes tanto em ambiente controlado como em adverso.

Como perspectivas, considera-se como potencial, a existência de fungos geofílicos autóctones do Rio Grande do Sul, na realização de novos estudos para a adaptação da tecnologia de controle biológico com organismos fúngicos para auxiliar nas estratégias de controle da verminose ovina.

5 REFERÊNCIAS

AMARANTE, A. F. T. Controle integrado de helmintos de bovinos e ovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, p.68-71, 2004a.

AMARANTE, A.F.T.; BRICARELLO, P.A.; ROCHA, R.A.; GENNARI, S.M. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France lambs to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, v.120, p.91-106, 2004b.

AMARANTE A. F. T. Fatores que afetam a resistência dos ovinos à verminose. In: VERÍSSIMO, C.J. **Alternativas de controle da verminose em pequenos ruminantes**. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, p. 15-21, 2008.

ANAN'KO, G. G, TEPLYAKOVA, T. V. published in. Factors Responsible for Transition of the *Duddingtonia flagrans* Carnivorous Fungus from the Saprotrophic to the Zootrophic Nutrition Type. **Mikrobiologiya**. v. 80, n. 2, p. 200–206, 2011.

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*. **Ciência Rural**, v. 34, p.457– 463, 2004.

ARAÚJO, J. V.; FREITAS, B. W.; VIERA, T. C.; CAMPOS, A. K. Avaliação do fungo predador de nematoides *Duddingtonia flagrans* sobre larvas infectantes de *Haemonchus contortus* e *Strongyloides papillosus* em caprinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, p.76-79, 2006.

ARENA, J. P., LIU, K. K., PARESS, P. S., CULLY, D. F. Avermectin-sensitive chloride currents induced by *Caenorhabditis elegans* RNA in *Xenopus oocytes*. **Molecular Pharmacology**. V.40, p;368-374, 1991

ARMOUR, J. The influence of host immunity on the epidemiology of trichostrongyle infections in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 32, p.5-19, 1989.

BESIER, R.B. Targeted treatment strategies for sustainable worm control in small ruminants. In: Proceedings of the 5th International workshop; novel approaches to the control of helminthes parasites of livestock. 26–29th Feb. 2008, Ipoh, Malaysia. **Trop. Biomed**. p. 9–17, 2008.

BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V.; ARAÚJO, J. M.; TAVELA, A. O.; FERREIRA, S. R.; SOARES, F. E. F.; BENJAMIN, L. A.; FRASSY, L. N. Influence of the preservation period in silica-gel on the predatory activity of the isolates of *Duddingtonia flagrans*

on infective larvae of cyathostomins (Nematoda: Cyathostominae). **Experimental Parasitology**, p.128:460–463, 2011.

CABARET, J. Pro and cons of targeted selective treatment against digestive-tract strongyles of ruminants. **Parasite**. v.15, p.506–509, 2008.

CAMPOS, J.A.; TEJERA, N.A; SANCHEZ, C.J. Substrate role in the accumulation of heavy metals in sporocarps of wild fungi. **BIOMETALS**. V.22, p.835-841, 2009.

CARVALHO, R. O, BRAGA, F. R, ARAÚJO, J. V: Viability and nematophagous activity of the freeze-dried fungus *Arthrobotrys robusta* against *Ancylostoma* spp. infective larvae in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 176, p.236–239, 2011.

CÉSAR, A.P.; RIGO, A.; RAINERI, C.; NADALETTO, C.E.S.; TERCENIO, D.A.B.; SOUZA, F.M.; MARQUES, L.J.; CONDELI, M.; BALDIN, S.R. **Manual de boas práticas para ovinos de corte**. 1ª. Ed. SEBRAE/ ANPOVINOS. São José do Rio Preto: SR Gráfica e Editora. v.62, 2008.

COSTA, V. M. M.; SIMÕES S. V. D.; RIET-CORREA, F. Controle das parasitoses gastrintestinais em ovinos e caprinos na região semiárida do Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 31, p. 65-71, 2011.

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

DOS SANTOS, V. T.; GONÇALVES, P. C. Verificação de estirpe de *Haemonchus* resistente ao thiabendazole no Rio Grande do Sul. **Revista da Faculdade de Agronomia e Veterinária**, Porto Alegre, v. 9, p. 201-209, 1967.

DRUDGE, J. H.; SZANTO, J.; WYATT, Z. N. Field studies on parasite control in sheep: Comparison of thiabendazole, ruelene, and phenothiazine. **American Journal Veterinary Research**, Schaumburg, v. 25, p. 1512-1518, 1964.

ECHEVARRIA, F.A.M., TRINDADE, G.N.P. Anthelmintic resistance by *Haemonchus contortus* to ivermectin in Brazil. **Veterinary Record**. v.124, p.147-148, 1989.

EDWARDS, C.A; ATIYEH, R.M; ROMBTE, Journal of Environment Impact of Avermectins. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 171 : 111-137, 2001.

EPE, C., HOLST, C., KOOPMANN, R., SCHNIEDER, T., LARSEN, M., SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Experiences with *Duddingtonia flagrans* administration to parasitized small ruminants. . **Veterinary Parasitology**. v.159, p.86–90, 2009.

FAEDO, M.; LARSEN, M.; DIMANDER, S. O.; YEATES, G. W.; HOGLUND, J.; WALLER P. J. Growth of the fungus *Duddingtonia flagrans* in soil surrounding Feces

deposited by cattle or sheep fed the fungus to control nematode parasites. **Biological Control**, v. 23, p. 64-70, 2002.

FARIAS, M.T.; BORDIN, E.L.; FORBES, A.B.; NEWCOMB, K. A survey on resistance to anthelmintic in sheep stud farms of southern Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.72. n. 2, p.209-214, 1997.

FIELD, J. I.; WEBSTER, J. Traps of predacious fungi attract nematodes. **Transactions of the British Mycological Society**, v.68, p. 467-469, 1977.

FLAJS, V.C.; GRABNAR, I.; ERZEN, N.K.; MARC, I.; POZGAN, U.; GOMBAC, M.; KOLAR, L.; POGACNIK, M. Pharmacokinetics of doramectin in lactating dairy sheep and suckling lambs. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.529, p. 353-359, 2005.

FONTENOT, M.E., MILLER, J.E., PENA, M.T., LARSEN, M., GILLESPIE, A. Efficiency of feeding *Duddingtonia flagrans* chlamyospores to grazing ewes on reducing availability of parasitic nematode larvae on pasture. **Veterinary Parasitology**, v.118, p.203 – 213, 2003.

GRAMINHA, É.B.N.; MONTEIRO, A.C.; SILVA, H.C. da; OLIVEIRA, G.P.; COSTA, A.J. da. Controle de nematóides parasitos gastrintestinais por *Arthrobotrys musiformis* em ovinos naturalmente infestados mantidos em pastagens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, p.927-933, 2005.

GRAY A., DULL T.J., ULLRICH A. Nucleotide sequence of epidermal growth factor cDNA predicts a 128.000-molecular weight protein precursor. **Nature**. v.303, p. 722-725, 1983.

GRONVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; LARSEN, M.; HENRIKSEN, S.A.; NANSEN, P. Aspects of biological control with special reference to arthropods, protozoans and helminthes of domesticated animals. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 64, p.47-64, 1996.

IMPERIALE, F.; LIFSCHITZ, A; SALLOVITZ,J. et al. Comparative, depletion of ivermectin and moxidectin Milk residues in dairy sheep after oral and subcutaneous Administration. **Journal of Dairy Research**, v.71, p.427-433, 2004.

JABBAR. A.; IQBAL, Z.; SADDIQI, H.A.; BABAR, W.; SAEED, M. Prevalence of multiple anthelmintic resistant gastrointestinal nematodes in dairy goats in a desolated tract (Pakistan). **Parasitology Research**, v.103, p.29–35, 2008.

JASMER, D. P.; YAO, C.; REHMAN, A.; JOHNSON, S. Multiple lethal effects induced by a benzimidazole anthelmintic in the anterior intestine of the nematode *Haemonchus contortus*. **Molecular Biochemical Parasitology**, v. 105, p. 81- 90. 2000.

KENYON, F., GREER, A.W., COLES, G. C., CRINGOLI, G., APADOPOULOS, E., CABARET, J., BERRAG, B., VARADY, M., VAN WYK, J. A., THOMAS, E., VERCRUYSSSE, J.; JACKSON, F. The role of targeted selective treatments in the development of refugia-based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants, **Veterinary Parasitology**. V.164, p.3–11, 2009.

KHAN, M. N.; SAJID, M. S.; KHAN, M. K.; IQBAL, Z.; HUSSAIN, A. Gastrointestinal helminthiasis: prevalence and associated determinants in domestic ruminants of district Toba Tek Singh, Punjab, Pakistan. **Parasitology Research**, v.107, p.787–794, 2010.

KNOX, M. R.; JOSH, P. F.; ANDERSON, L. J. Deployment of *Duddingtonia flagrans* in an improved pasture system: dispersal, persistence, and effects on free-living soil nematodes and microarthropods. **Biological Control**, v. 24, p. 176 -182, 2002.

KÖHLER, P. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 336-345. 2001.

LACEY, E. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. **International Journal of Parasitology**. V.18, pp. 885–936, 1988.

LACEY, E.; GILL, J. H. Biochemistry of benzimidazole resistance. **Acta Tropica**, v. 56, p. 245-62, 1994.

LANUSSE, C.E. **Farmacologia dos compostos anti-helmínticos**. In: CHARLEST.P. (Ed) Controle dos nematódeos gastrintestinais. Juiz de Fora, Minas Gerais, p.1-44. 1996.

LANUSSE, C. E.; ALVAREZ, L. I.; LIFSCHITZ, A, L. **Princípios farmacológicos da terapia anti-helmíntica**. CAVALCANTE, A. C. R.; VIEIRA, L. S.; CHAGAS, A. C. S.; MOLENTO, M. B. (Eds). Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle, p. 549-603, 2009.

LEAL, T. M. A redução de anti-helmínticos no controle da verminose em caprinos e ovinos. **Portal dia de campo**. Disponível em: <<http://www.diadecampo.com.br/>>. Acesso em: 21 set. 2012.

LARSSON, A., DIMANDER, S.-O., RYDZIK, A., UGGLA, A., WALLER, P.J., HÖGLUND, J. A 3- year field evaluation of pasture rotation and supplementary feeding to control parasite infection in first-season grazing cattle – dynamics of pasture infectivity. **Veterinary Parasitology**, v. 145, p.129–137, 2007.

LUBEGA, G. W.; PRICHARD, R. K. Interaction of Benzimidazole anthelmintics with *Haemonchus contortus* tubulin: Binding affinity and anthelmintic efficacy. **Experimental Parasitology**, v. 73, p. 203- 13, 1991.

MOLENTO, M. B.. Resistência de helmintos em ovinos e caprinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, v.13, p.82-87, 2004

MOLENTO, M.B. Resistência Parasitária. In: CAVALCANTE, A.C.R.; VIEIRA, L. da S. et al. **Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p.603, 2009.

MOLENTO, M. B. Resistência parasitária em helmintos de equídeos e propostas de manejo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, p.1469–1477, 2005.

PANDEY, V. S. Predatory activity of nematode trapping fungi against the larvae of *Trichostrongylus axei* and *Ostertagia ostertagi*: A possible method of biological control. **Journal of Helminthology**, London, v.47, n.1, p.35-48, 1973.

PARAUD, C.; PORS, I.; REHBY, L.; CHARTIER, C. Absence of ivermectin resistance in a survey on dairy goat nematodes in France. **Parasitology Research**, v.106, p.1475–1479, 2010.

PRICHARD, R. K. Anthelmintic resistance in nematodes: Extent, recent understanding and future directions for control and research. **Internacional Journal Parasitology**, Oxon, v. 20, n. 4, p. 515-523, 1990.

MARTIN, R. J. Modes of action of anthelmintic drugs. **Veterinary Journal**, v. 154, p.11-34. 1997.

MORTENSEN, L. L.; WILLIAMSON, L. H.; TERRILL, T. H.; KIRCHER, R. A.; LARSEN, M.; KAPLAN, R. M. Evaluation of revalence and clinical implications of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of goats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, New York, v. 223, n. 4, p. 495-500, 2003.

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

ROCHA, R.A.; BRESCIANI, K.D.S.; BARROS, T.F.M.; FERNANDES, L.H.; SILVA, M.B.; AMARANTE, A.F.T. Sheep and cattle grazing alternately: Nematode parasitism and pasture decontamination. **Small Ruminants Research**, v. 75, p. 135-143, 2008.

SAMPAIO, I. B. M. Estatística Aplicada à Experimentação Animal. 2ª.Ed. **Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia**, Departamento de Zootecnia –UFMG, Belo Horizonte – MG, 2002.

SANGSTER, N. C. Managing parasiticide resistance. **Veterinary Parasitology**, v.98, p. 89-109. 2001.

SILVA, L. Fitoterápicos no Controle de Endoparasitoses de Caprinos e Ovinos. **Rev. Brás. Hig. San. Anim.**, v. 1, n. 2, p. 37–43, 2007.

SILVA, M. E.; ARAÚJO. J. V.; BRAGA, F. R.; BORGES, L. A.; SOARES, F. E. F.; LIMA, W. S.; GUIMARÃES, M. P. Mycelial mass production of fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* under different culture conditions. **BMC Research Notes**, V.6, p.340, 2013.

SUTHERLAND, I.A., LEATHWICK, D.M. Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle: a global issue? **Trends Parasitology**, n. 27, p.176–181, 2011.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. **Parasitologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p. 292, 1998.

VAN WYK, J.A. Refugia – overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.68, p.55-67, 2001.

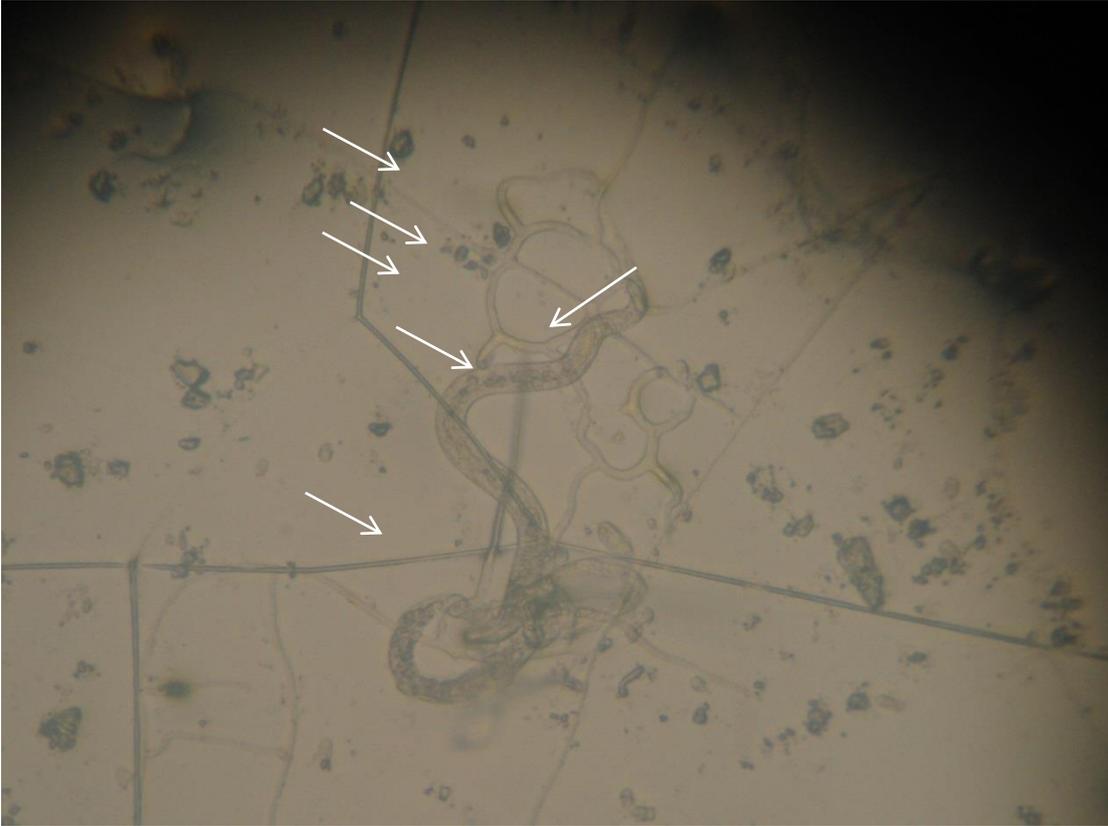
WAGHORN T.S., LEATHWICK D.M., CHEN L.Y., SKIPP R.A. Efficacy of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against three species of gastrointestinal nematodes in laboratory faecal cultures from sheep and goats **Veterinary Parasitology**, v.118, p. 227–234, 2003.

YEATES, G. W.; WALLER, P. J.; KING, K. L. Soil nematodes as indicators of effect of management on grasslands in the new england tablelands (NSW): effect of measures for control of parasites of sheep. **Pedobiologia**, v. 41, p. 537-548, 1997.

ZOPF, W. Zur Kenntnis der Infektions-Krankheiten niederer Thiere und Pflanzen. **Nova Acta der Kaiserlichen Leopoldinischen- Carolinischen Akademie der Naturforscher**, v. 52, p. 314-376, 1888.

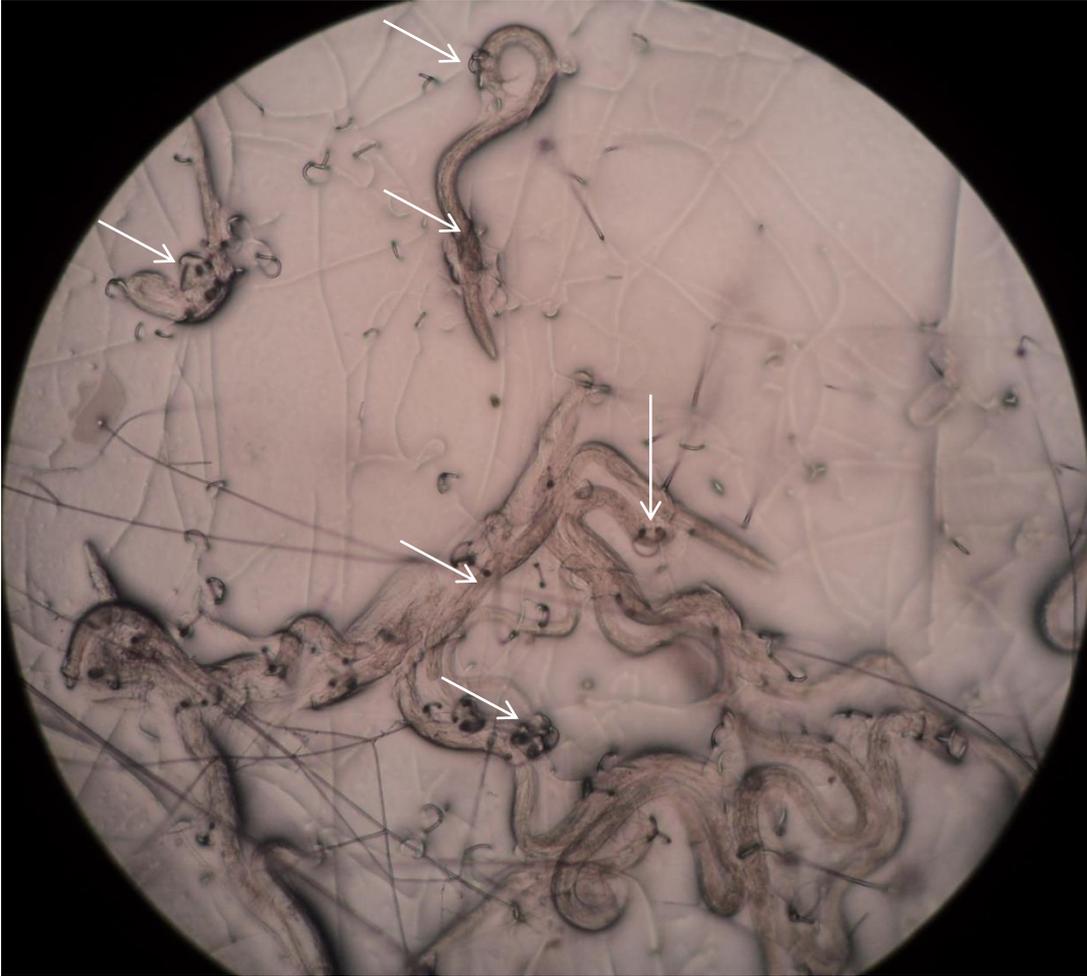
6 APÊNDICES

APÊNDICE A – Nematóide *Panagrellus redivivus* sendo predado por fungo nematófago em placa de Petri



Observação realizada em microscópio estereoscópio 400X. As setas indicam a presença das armadilhas (redes adesivas) realizadas pelo fungo. Laboratório de Micologia/UFPel

APÊNDICE B - Nematóides *Panagrellus redivivus* sendo predado por fungo nematófago em placa de Petri



Observação realizada em microscópio estereoscópio 400X. As setas indicam a presença das armadilhas (redes adesivas) realizadas pelo fungo. Laboratório de Micologia/UFPel

APÊNDICE C – Administração oral do fungo nematófago *D. flagrans* em ovino



Faculdade de Veterinária/UFPeI

APÊNDICE D – Demonstração de ovino utilizando a fralda geriátrica



Fralda geriátrica em ovino para obtenção de fezes (período de 8 horas), contendo clamidósporos do fungo *Duddingtonia flagrans*. Faculdade de Veterinária/UFPel