

Avaliação de fungos predadores de nematóides do gênero *Monacrosporium* sobre larvas infectantes de *Haemonchus contortus* de caprinos

Evaluation of nematode predacious fungi of the genus *Monacrosporium* on infective *Haemonchus contortus* larvae of goats

Rafaela Carolina Lopes Assis,* Jackson Victor de Araújo,* Jefferson Rodrigues Gandra, Artur Kanadani Campos

Resumo

Fungos nematófagos têm sido considerados como uma alternativa promissora para o controle biológico de nematóides gastrintestinais de ruminantes, dentre eles o gênero *Monacrosporium*. Dois isolados de fungos predadores de nematóides, *M. sinense* SF 470 e *M. appendiculatum* CGI foram testados quanto a capacidade de passagem através do trato gastrintestinal de caprinos sem perda da capacidade predatória sobre larvas infectantes(L3) de *Haemonchus contortus* de caprinos. Três caprinos da raça Saneen, de quatro meses de idade e do sexo masculino, foram inoculados com 5000 L3 de *H. contortus*. Cem gramas de *pellets* contendo os isolados fúngicos *M. sinense* SF 470 e *M. appendiculatum* CGI foram administrados a dois animais, por via oral, em separado. O controle foi constituído por um animal que recebeu 100 gramas de *pellets* sem a presença de isolados fúngicos. Amostras fecais foram coletadas às 12, 18, 24, 48, 72 e 96 horas após os tratamentos e foram alocadas em placas de Petri e coproculturas e incubadas a 25°C, por 15 dias. Houve redução significativa ($p < 0,05$) no número de larvas recuperadas após os tratamentos dos animais com os isolados fúngicos em relação ao animal controle, que foi aproximadamente de 60%. De acordo com os resultados, pode-se afirmar a viabilidade dos fungos *M. sinense* e *M. appendiculatum* na passagem pelo trato gastrintestinal de caprinos sem perda de capacidade em predação L3 de *H. contortus* de caprinos.

Palavras-chave: fungos nematófagos, *Monacrosporium*, *Haemonchus contortus*, controle biológico, caprinos.

Abstract

The biological control of gastrointestinal nematodes of ruminants using nematophagous fungi is a promising alternative, included the genus *Monacrosporium*. Two isolates of predators nematodes fungi, *M. sinense* SF 470 and *M. appendiculatum* CGI were evaluated regarding the capacity of supporting passage through the gastrointestinal tract of goats without losing the ability to entrap infective *Hemonchus contortus* larvae (L3). Three saneen goats of four months old, males were infected with 5000 L3 of *H. contortus*. One hundred grams of pellets of the isolates SF 470 and CGI were managed orally, separately to two goats. One goat (control) received orally 100g of pellets without fungi. Collected fecal Samples 12, 18, 24, 48, 72 and 96 hours after the treatments were allocated in Petri dishes and performed fecal cultures at 25°C during fifteen days. At the end of the experiment, there was significant reduction ($p < 0.05$) of the average number of nematodes larvae recovered of the Petri dishes and the fecal cultures in the animals treated with fungi when compared with the control animal, around 60%. Such evidences confirm the transit of these fungi pellets by the digestive tract of the goats without loss of the predatory viability on infective *H. contortus* larvae.

Keywords: nematophagous fungi, *Monacrosporium*, *Haemonchus contortus*, biological control, goats.

Introdução

A criação de caprinos é uma atividade de crescente importância socioeconômica no mundo. A caprinocultura de corte e de leite são alternativas, tanto para a produção de alimentos, quanto para a diversificação da renda da propriedade e geração de empregos no campo. Os mercados nacional e internacional têm grande demanda por carnes e peles destes

animais e, por suas características naturais, o Brasil tem grande potencial como exportador destes produtos. Entre os fatores que interferem no desenvolvimento da produção de pequenos ruminantes, as helmintoses ocupam grande destaque, por causarem retardamento do desenvolvimento animal e gastos excessivos com manejo, levando a uma baixa produtividade do rebanho e, conseqüentemente, a elevadas perdas econômicas (Silva, 2003).

* Bolsistas do CNPq – Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570-000, Viçosa-MG, Brazil, Phone: 55 0xx31 38991464, Fax: 55 0xx31 38992317, E-mail: jvictor@ufv.br

Os caprinos são considerados, dentre os ruminantes domésticos, como os animais mais susceptíveis aos nematóides gastrintestinais; dessa forma, estes são considerados o maior problema sanitário e econômico da caprinocultura. Os efeitos das helmintoses são mais evidentes nos animais jovens, os quais ainda não adquiriram resistência imunológica a esses nematóides. As pastagens contaminadas constituem um importante elemento epidemiológico, por funcionar como principal veículo de transmissão de larvas infectantes de nematóides para os animais. Assim, a higienização das pastagens através da redução do número de larvas infectantes é um dos objetivos do controle das verminoses (Araújo et al. 2004a). O controle tem sido realizado com a aplicação de anti-helmínticos, no entanto, o aparecimento de resistência aos princípios ativos anti-helmínticos, a existência de resíduos na carne e no leite e a ecotoxicidade de alguns compostos despertaram o interesse no desenvolvimento de novas práticas de controle das nematodioses gastrintestinais que possam contribuir para um menor uso de anti-helmínticos (Woolaston e Baker, 1996). Novas práticas de controle alternativo, que interfiram na contaminação de pastagens, como o controle biológico, poderão ajudar a solucionar os problemas decorrentes das verminoses.

A utilização de fungos nematófagos parece ser altamente promissora para animais em pastejo que estão sendo constantemente infectados (Araújo et al., 1998).

Esses fungos são os mais estudados organismos usados no controle de nematóides de animais domésticos. Espécies do fungo predador de nematóides *Monacrosporium* têm comprovada capacidade de controlar fitonematóides, nematóides de vida livre e nematóides parasitos de animais domésticos (Araújo et al., 1992; Gomes et al., 1999).

O objetivo do presente estudo foi comprovar a capacidade de passagem dos fungos *Monacrosporium sinense* (isolado SF 470) e *M. appendiculatum* (isolado CGI) através do trato gastrintestinal de caprinos sem perder a capacidade predatória no controle biológico de larvas infectantes de *Haemonchus contortus* de caprinos.

Material e métodos

Larvas infectantes de *Haemonchus contortus* (L₃) foram obtidas a partir de coprocultura dos excrementos de caprinos naturalmente infectados. Em três caprinos da raça Saneen, do sexo masculino, de quatro meses de idade e provenientes da região de Viçosa, Minas Gerais, foram inoculadas 5000 L3 individualmente. Após um mês, nos animais procedeu-se a contagem de ovos por grama de fezes (OPG) de acordo com a técnica descrita por Gordon e Whitlock (1939). Fungos predadores de nematóides do gênero *Monacrosporium* foram oriundos de solo do Brasil pelo método de espalhamento do solo de Duddington (1955), modificado por Santos et al. (1991). Isolados fúngicos das espécies *M. sinense* (isolado SF 470) e *M. appendiculatum* (isolado CGI) foram, periodicamente, repicados e mantidos em tubos de ensaio, contendo *corn meal* agar 2% (CMA 2%), a 4°C e no escuro.

Micélios de cada isolado fúngico foi obtido através da inoculação de discos de cultura de CMA 2% de aproximadamente 5mm de diâmetro após sete dias de incubação, a 25°C,

em erlenmeyers de 250 ml, contendo 150 ml de meio líquido GPY (glicose, peptona sódica e extrato de levedura), pH 6,5, no escuro e sob agitação de 120 rpm.

Pellets dos isolados fúngicos em matriz de alginato de sódio foram feitos como descrito por Walker e Connick (1983) e modificado por Lackey et al. (1993).

Amostras fecais foram coletadas diretamente do reto de cada animal às 12, 18, 24, 48, 72 e 96 horas após a administração oral de 100 gramas de *pellets* contendo o isolado fúngico *M. sinense* SF 470 ao animal 1. Este apresentou OPG inicial de 4600. Foram administrados 100 gramas de *pellets* contendo o isolado fúngico *M. appendiculatum* CGI, por via oral, ao animal 2 que apresentou OPG de 4400. O controle foi realizado no animal 3, que recebeu 100 gramas de *pellets* sem a presença de isolados fúngicos, e este animal apresentou OPG de 2800. Os horários de coleta das amostras fecais nos animais 2 e 3 foram os mesmos do animal 1. Dois gramas de fezes obtidas das amostras referentes a cada horário foram distribuídos em placas contendo agar-agar 2%, incubadas a 25°C, no escuro, durante 15 dias. Foram realizadas cinco repetições para cada horário, totalizando trinta amostras. Após 24 horas da colocação do material fecal nas placas, iniciou-se a observação diária ao microscópio óptico (10x) para detecção de estruturas típicas do desenvolvimento fúngico, como conídios, conidióforos ou armadilhas de larvas. Posteriormente, procedeu-se à coleta das L3 com a utilização do funil de Baermann com água a 42°C por seis horas.

Ao mesmo tempo, foram realizadas as coproculturas, em que 20g de fezes dos animais foram misturadas com carvão vegetal fragmentado e umedecido e incubadas a 25°C, no escuro e durante 15 dias. Foram realizadas cinco repetições com as amostras referentes a cada horário de coleta fecal, totalizando 30 coproculturas. Decorridos os 15 dias de incubação, realizou-se com o funil de Baermann com água a 42°C por seis horas a coleta das L3 de *H. contortus*.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e de regressão linear, a nível de significância de 5%.

Resultados e discussão

O isolamento dos fungos nas fezes ocorreu, principalmente, 24 horas após a administração do fungo por via oral. Resultados similares foram observados por Silva (2003), que após administrar conídios de um isolado de *M. thaumasium* em caprinos observou o tempo de passagem do fungo, com formação de armadilhas de 21 a 24 horas. Mota et al. (2000) e Castro (2000) demonstraram a eficácia de um isolado de *M. thaumasium* em testes *in vitro* sobre L3 de *H. contortus* de caprinos e ciatostomíneos de equinos, respectivamente. Rédua (2002), Rédua et al. 2002 e Melo et al. (2003) conseguiram a passagem de *M. thaumasium* pelo trato gastrintestinal de equinos e caprinos, respectivamente, sem perda de viabilidade para predação L3 de *H. contortus*. Alves et al. (2003) obtiveram redução de 88,8% no OPG de bovinos tratados com 20 gramas de *pellets* de *M. thaumasium*, duas vezes por semana, durante quatro meses, em relação aos animais do grupo controle e Araújo et al. (2004b) obtiveram redução de quase 100% quando se administrou *pellets* por seis meses. Em testes *in vitro* Araújo et al. (2000) testaram

pellets de *M. thumasiium* em condições de diferentes temperaturas e em sal mineral e observaram a viabilidade destes pellets após quatro meses de estocagem. Silva (2003) comprovou a resistência do fungo *M. thumasiium* em passar pelo trato gastrintestinal de caprinos sem perder sua capacidade predatória sobre larvas infectantes de nematóides gastrintestinais, observando ainda menor carga parasitária, menor número de ovos por grama de fezes e maior ganho de peso nos caprinos tratados. A Tabela 1 representa os valores médios do número de L3 de *H. contortus* recuperadas das placas de Petri nos respectivos tempos e diferentes tratamentos avaliados. Observou-se redução progressiva do número médio de larvas infectantes recuperadas nos tempos avaliados indicando atividade predatória crescente e aumento do número de larvas infectantes predadas pelo fungo.

Ao longo do experimento, o número médio de L3 recuperadas do animal controle apresentou-se maior em relação ao dos tratados, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Esta diferença ao final do experimento foi de 62,61% no animal tratado com *M. sinense* (SF 470) e de 60,36% no tratado com *M. appendiculatum* (CGI).

Os valores médios do número de larvas infectantes recuperadas das coproculturas incubadas com 20 gramas de fezes dos animais tratados, que receberam pellets contendo os isolados fúngicos *M. sinense* SF 470 e *M. appendiculatum*

CGI, e do animal controle, que recebeu pellets sem quaisquer isolados fúngicos, estão representados na Tabela 2.

Ao longo do experimento, o número médio de larvas do animal controle apresentou-se maior em relação ao dos tratados, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Esta diferença ao final do experimento foi de 60,63% no animal tratado com *M. sinense* e de 47,00% no tratado com *M. appendiculatum*. O coeficiente de regressão linear calculado através da análise das médias dos animais tratados com fungos foi de $r = -0,94$ para o isolado de *M. sinense* (SF 470) e $r = -0,88$ para o isolado de *M. appendiculatum* (CGI). O valor negativo indica a existência de correlação inversa entre as variáveis, comprovando a viabilidade da capacidade predatória dos *M. sinense* e *M. appendiculatum*, após a passagem pelo trato gastrintestinal de caprinos, pela redução do número de larvas infectantes recuperadas das fezes até 96 horas após a administração fúngica.

Conclusão

Os resultados mostraram que os isolados fúngicos testados *M. sinense* e *M. appendiculatum* são agentes promissores a serem usados no controle biológico do nematóide *Haemonchus contortus* de caprinos.

Tabela 1 – Valores médios e desvio-padrão do número de larvas infectantes de *Haemonchus contortus* recuperadas das placas de Petri amostradas nos tempos de 12, 18, 24, 48, 72 e 96 horas após o tratamento com os fungos predadores de nematóides *Monacrosporium sinense* (isolado SF 470), *M. appendiculatum* (isolado CGI) e do animal controle.

TRATAMENTO	TEMPO (horas)					
	12	18	24	48	72	96
SF 470	611±1,39	576±1,72	563±2,16	506,1±1,08	454,5±1,98	202,2±1,27
CGI	756±2,03	591±1,58	424±1,79	407,2±2,38	369,8±1,81	209,6±1,70
CONTROLE	674±1,86	570±3,05	494±1,77	433±2,62	508,2±2,57	535,4±2,39

Tabela 2 – Valores médios e desvio-padrão do número de larvas infectantes de *Haemonchus contortus* recuperadas das coproculturas amostradas nos tempos de 12, 18, 24, 48, 72 e 96 horas após o tratamento com os fungos predadores de nematóides *Monacrosporium sinense* (isolado SF 470), *M. appendiculatum* (isolado CGI) e do animal controle.

TRATAMENTO	TEMPO (horas)					
	12	18	24	48	72	96
SF 470	599,2±3,67	539,3±3,08	314,5±2,54	300,8±2,78	229±2,19	218,9±2,08
CGI	702±2,81	622,6±2,09	554,6±3,11	497±2,18	303±1,85	295±1,45
CONTROLE	568±2,91	498±2,73	748±2,27	668,4±2,56	582,6±3,01	556±2,76

Referências

- ALVES, P. H.; ARAÚJO, J. V.; GUIMARÃES, M. P.; ASSIS, R. C. L.; SARTI, P.; CAMPOS, A. K. Aplicação de formulação do fungo predador de nematóides *Monacrosporium thaumasium* (Drechsler, 1937) no controle de nematóides de bovinos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v. 55, 2003, p. 568-573, 2003.
- ARAÚJO, J. V.; SANTOS, M. A.; FERRAZ, S.; MAGALHÃES, A. C. M. Controle de larvas infectantes de *Haemonchus placei* por fungos predadores da espécie *Monacrosporium ellypsosporum* em condições de laboratório. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 44, p. 521-526, 1992.
- ARAÚJO, J. V.; GOMES, A. P. S.; GUIMARÃES, M. P. Biological control of bovine gastrointestinal nematode parasites in southeastern Brazil by the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys robusta*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 7, p. 117-122, 1998.
- ARAÚJO, J. V.; STEPHANO, M. A.; SAMPAIO, W. M. Passage of nematode-trapping fungi through the gastrointestinal tract of calves. *Vet. Arhiv.*, v. 69, p. 69-78, 1999.
- ARAÚJO, J. V.; SAMPAIO, W. M.; VASCONCELLOS, R. S.; CAMPOS, A. K. Effects of different temperatures and mineral salt on "pellets" of *Monacrosporium thaumasium* – a nematode-trapping fungus. *Vet. Arhiv.* v. 70, p. 181-190, 2000.
- ARAÚJO, J. V.; MOTA, M. A.; CAMPOS, A. K. Controle biológico de helmintos parasitos de animais por fungos nematófagos. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 13, p. 165-170, 2004a.
- ARAÚJO, J. V.; GUIMARÃES, M. P.; CAMPOS, A. K.; SÁ, N. C.; SARTI, P.; ASSIS, C. L. Control of bovine gastrointestinal nematode parasites using pellets of the nematode-trapping fungus *Monacrosporium thaumasium*. *Cienc. Rural.*, v. 34, p. 457-463, 2004b.
- CASTRO, A. C. *Avaliação de fungos Deuteromycetos sobre fases pré-parasíticas de Cyathotominae (Nematoda-Strongylidae)*. 2000. 100 p. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Parasitologia Animal – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2000.
- DUDDINGTON, C. L. Notes on the technique of handling predaceous fungi. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, v. 38, p. 97-103, 1955.
- GOMES, A. P.S.; ARAÚJO, J. V.; RIBEIRO, R. C.F. Differential *in vitro* pathogenicity of the genus *Monacrosporium* for phytonematodes, free-living nematodes and parasitic nematodes of cattle. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 32, p. 79-83, 1999.
- GORDON, H. M.; WHITLOCK, H. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *J. Counc. Sci. Ind. Res.*, v.12, p. 50-52, 1939.
- LACKEY, B. A.; MULDOON, A. E.; JAFFE, B. A. Alginate pellet formulation of *Hirsutella rossiliensis* for biological control of plant-parasitic nematodes. *Biologic. Control.*, v. 3, p. 155-160, 1993.
- MELO, L. M.; BEVILACQUA, C.; ARAÚJO, J. V.; MELO, A. C. F. Atividade predatória do fungo *Monacrosporium thaumasium* contra o nematóide *Haemonchus contortus*, após passagem pelo trato gastrintestinal de caprinos. *Ciênc. Rural.*, v. 33, p. 169-171, 2003.
- MOTA, M.; BEVILACQUA, C.; ARAÚJO, J. V. Atividade predatória dos fungos *Arthrobotrys conoides* e *Monacrosporium thaumasium* sobre larvas infectantes de *Haemonchus contortus* de caprinos. *Ciênc. Animal.*, v. 10, p. 37-41, 2000.
- RÉDUA, C. R. O. *Avaliação do fungo Monacrosporium thaumasium sobre nematóides estrongilídeos de equinos*. 2002. 48 p. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Parasitologia Animal – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2002.
- RÉDUA, C. R. O.; SICILIANO, S.; MUJICA, F.; ARAÚJO, J. V.; RODRIGUES, M. L. A. Avaliação da passagem do fungo nematófago *Monacrosporium thaumasium* pelo trato gastrintestinal de equinos. *Ciênc. Animal.*, v. 12, p. 133-136, 2002.
- SANTOS, M. A.; FERRAZ, S.; MUCHOVEJ, J. Detection and ecology of nematophagous fungi from Brazilian soils. *Nematol. Bras.*, v. 15, p. 121-134, 1991.
- SILVA, W. W. *Aspectos epidemiológicos e controle biológico de nematóides gastrintestinais de caprinos pelo fungo Monacrosporium thaumasium (Drechsler, 1937) em ecossistema semi-árido do Nordeste-Brasil*. 2003. 53 p. Tese (Doutorado) – Departamento de Parasitologia Animal – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2003.
- WALKER, H. L.; CONNICK, Jr. Sodium Alginate for production and formulation of mycoherbicides. *Weed Science.* v. 31, p. 333-338, 1983.
- WOOLASTON, R. R.; BAKER, R. L. Prospects of breeding for parasite resistance. *Inter. J. Parasitol.*, v. 26, p. 845-855, 1996.