

MARCELO DE ANDRADE MOTA

**EFEITOS DE PROCESSOS DE PRESERVAÇÃO SOBRE OS FUNGOS
Arthrobotrys robusta e *Monacrosporium thaumasium* PREDADORES DE
NEMATÓIDES.**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Medicina
Veterinária, para obtenção do título de
“Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2002

“Só sei que nada sei”.

Sócrates

“São duas coisas verdadeiramente diferentes: saber e crer que se sabe.

A ciência consiste em saber; em crer que se sabe está a ignorância.”.

Hipócrates.

AGRADECIMENTO

A minha família, que através de seu apoio permitiu-me ultrapassar mais um obstáculo nesta caminhada.

Ao professor Jackson Victor de Araújo, pela iniciação na linha de pesquisa em controle biológico.

Aos professores Maria de Lurdes Rodrigues, Marcos Pezzi, Robert Barreto e Vânia Bittencourt, pela paciência com que leram o trabalho e as pelas valiosas sugestões apresentadas.

Ao amigo e colega de curso Artur Kanadani Campos, sem o qual a realização deste trabalho não seria possível.

À equipe do Laboratório de Doenças Parasitárias: Geraldo, Luís, Nilo, Paulo Henrique, Priscila, Rafael, Rafaela e Valdir.

A equipe da Clínica de Doenças de Plantas do Departamento de Fitopatologia da UFV.

Aos amigos de todas as horas Paulo Henrique Lima Oliveira e João Luís Aguiar.

Aos companheiros de república César Simas Teles, Luciano Manfroi, Gaspar Antônio Scheidt, Robson Maia Geraldine e Rogério Satoru Tanabe. E viva a arte da convivência!

Aos amigos de Viçosa: Bráulio, Bruno, Cláudio, Cleverson, Júnior, Gerson, Marcos e Maurílio.

Aos colegas de mestrado: Daniela Resende, Jorge Couto, Juan Carlos Carrascal, Mayra Sanabria, Roberto Dias.

Aos funcionários do Departamento de Veterinária, sempre dispostos a cooperar quando solicitados.

A Universidade Federal de Viçosa, que possibilitou, através de sua estrutura: aperfeiçoamento profissional e a realização do trabalho de pesquisa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo auxílio financeiro destinado ao projeto.

A Coordenação do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária DVT/UFV.

BIOGRAFIA

Marcelo de Andrade Mota, filho de Antônio de Souza Mota e Maria Marlene Freitas de Andrade, nasceu no Rio de Janeiro, RJ em 11 de janeiro de 1976. Formou-se em Medicina Veterinária na Universidade Estadual do Ceará em 29 de fevereiro de 2000. Ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós Graduação do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa em setembro de 2000.

CONTEÚDO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	Página vi
ABREVIACÕES.....	viii
RESUMO	ix
SUMARY.....	xi
INTRODUÇÃO GERAL	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	5
OBJETIVOS.....	16
CAPÍTULO 1. Esporulação, Crescimento Radial e Produção de Biomassa dos Fungos <i>A. robusta</i> e <i>M. thaumasium</i> Submetidos a Diferentes Processos de Preservação.	
INTRODUÇÃO.....	18
MATERIAL E MÉTODOS.....	19
RESULTADOS.....	22
DISCUSSÃO.....	25
CAPÍTULO 2. Avaliação da Capacidade Predatória a Nematóides Parasitos Gastrintestinais de Bovinos dos Fungos Nematófagos <i>Arthrobotrys robusta</i> e <i>Monacrosporium thaumasium</i> Submetidos a Diferentes Processos de Preservação.	
INTRODUÇÃO.....	28
MATERIAL E MÉTODOS.....	29
RESULTADOS.....	31
DISCUSSÃO.....	33
CAPÍTULO 3. Influência de Diferentes Processos de Preservação sobre a Capacidade Predatória dos Fungos <i>Arthrobotrys robusta</i> e <i>Monacrosporium thaumasium</i> após Passagem pelo Trato Gastrintestinal de Bovinos.	
INTRODUÇÃO.....	36
MATERIAL E MÉTODOS.....	37
RESULTADOS.....	40
DISCUSSÃO.....	43
CONCLUSÕES GERAIS	45
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

APÊNDICES.....

61

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Página

Figura 4.1. Diâmetro médio das colônias (cm) dos isolados I31 e NF34a submetidos a diferentes processos de armazenamento, ao sexto dia de cultivo em superfície de ágar água 2%.

22

Figura 4.2. Produção massal (mg) dos isolados I31 e NF34a submetidos a diferentes métodos de armazenamento, ao sétimo dia de cultivo em meio Batata Dextrose.

23

Figura 5.1. Percentual médio de redução de larvas de nematóides parasitos gastrintestinais recuperadas após interação durante sete dias, em superfície de ágar água 2%, com *A. robusta* (I31) e *M. thaumasium* (NF34a) submetidos a diferentes métodos de armazenamento.

31

Figura 6.1. Percentuais de redução de nematóides parasitos gastrintestinais predados por *Arthrobotrys robusta* (I31) e *Monacrosporium thaumasium* (NF34a), submetidos a diferentes métodos de preservação.

42

Tabela 4.1. Estimativa do número de conídios $\times 10^4$ por placa de Petri, produzida pelos isolados I31 de *A. robusta* e NF34a de *M. thaumasium*, em superfície de AELA, após dez dias de cultivo.

24

Tabela 5.1. Médias dos números de larvas mistas de nematóides parasitos gastrintestinais recuperadas pelo método de Baermann após sete dias de predação em superfície de ágar água 2%, por *A. robusta* (I31) e *M. thaumasium* (NF34a) submetidos a diferentes processos de preservação.

32

Tabela 6.1. Percentuais médios de redução de nematóides parasitos gastrintestinais de bovinos, por *Arthrobotrys robusta* e *Monacrosporium thaumasium* submetidos a diferentes métodos de preservação, após passagem pelo trato gastrintestinal de bezerros.

41

Tabela 10.1. Análise de variância do crescimento radial dos isolados *A. robusta* (I31) e *M. thaumasium* (NF34a) submetidos a diferentes processos de armazenamento, ao sexto dia de cultivo em superfície de ágar água 2%.

61

Tabela 10.2. Tabela do diâmetro médio (cm) dos isolados *A. robusta* (I31) e *M. thaumasium* (NF34a) submetidos a diferentes processos de armazenamento, ao sexto dia de cultivo em superfície de ágar água 2%. Média de dez repetições.

61

Tabela 10.3. Análise de variância das médias de produção massal (mg) dos isolados *A. robusta* (I31) e *M. thaumasium* (NF34a) submetidos a diferentes métodos de armazenamento, ao sétimo dia de cultivo em meio Batata Dextrose.

62

Página
(cont.)

Tabela 10.4. Médias da produção massal (mg) dos *A. robusta* (I31) e *M. thaumasium* (NF34a) submetidos a diferentes métodos de armazenamento, ao sétimo dia de cultivo em meio Batata Dextrose. Média de cinco repetições.

62

Tabela 10.5. Análise de variância das médias de produção esporos dos isolados *A. robusta* (I31) e *M. thaumasium* (NF34a) submetidos a diferentes métodos de armazenamento, após dez dias de cultivo em superfície de AELA.

63

Tabela 10.6. Médias da produção de esporos dos isolados *A. robusta* (I31) e *M. thaumasium* (NF34a) submetidos a diferentes métodos de preservação, cultivo em superfície de AELA. Média de cinco repetições.

63

Tabela 10.7. Análise de variância das médias dos números de larvas mistas de nematóides parasitos gastrintestinais recuperadas pelo método de Baermann após sete dias de predação em superfície de ágar água 2%, por *A. robusta* (I31) e *M. thaumasium* (NF34a) submetidos a diferentes processos de preservação.

64

Tabela 10.8. Médias dos números de larvas mistas de nematóides parasitos gastrintestinais recuperadas pelo método de Baermann após sete dias de predação em superfície de ágar água 2%, por *A. robusta* (I31) e *M. thaumasium* (NF34a) submetidos a diferentes processos de preservação. Média de cinco repetições.

64

Tabela 10.9. Análise de variância dos Percentuais de redução de nematóides parasitos gastrintestinais predados por *A. robusta* (I31) e *M. thaumasium* (NF34a), submetidos a diferentes métodos de preservação, após a passagem pelo trato gastrintestinal de bovinos.

65

Tabela 10.10. Percentuais médios de redução de nematóides parasitos gastrintestinais de bovinos, por *A. robusta* (I31) e *M. thaumasium*

(NF34a) submetidos a diferentes métodos de preservação. Média de cinco repetições.

66

ABREVIATURAS

µl	microlitros
®	marca registrada
AA	ágar água
AELA	ágar extrato de levedura e amido
AEM	ágar extrato de milho
BD	meio líquido batata dextrose
C	Celsius
cm	centímetros
DMSO	Dimetil-sulfóxido ((CH ₃) ₂ SO)
g	gramas
GPL	meio líquido glucose peptona extrato de leveduras
h	horas
I31	isolado de <i>Arthrobotrys robusta</i>
K ₂ HPO ₄	fosfato de potássio monobásico
l	litro
L ₃	larva infectante de nematóide parasito
mg	miligrama
MgSO ₄ ·7H ₂ O	sulfato de magnésio hidratado
NF34a	isolado de <i>Monacrosporium thaumasium</i>
OPG	ovos de nematóides parasitos por grama de fezes
rpm	rotações por minuto

RESUMO

MOTA, Marcelo de Andrade, M.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2002. **Efeitos dos Processos de Preservação Sobre os Fungos *Arthrobotrys robusta* e *Monacrosporium thaumasium* Predadores de Nematóides**. Orientador: Jackson Victor de Araújo. Conselheiros: Maria Catarina Megumi Kasuya e Robert Weingart Barreto.

O controle biológico de helmintos parasitos de bovinos é uma forma alternativa ao uso dos fármacos e tem como principal objetivo a redução do número de larvas infectantes disponíveis na pastagem. Os fungos nematófagos produzem estruturas em forma de armadilha, responsáveis pela captura e morte dos estágios pré-parasitários dos nematóides. A manutenção contínua da atividade predatória dos isolados fúngicos é um dos pré-requisitos básicos para o sucesso desta forma de controle. Neste trabalho foi verificado o comportamento dos isolados I31 de *Arthrobotrys robusta* e NF34a de *Monacrosporium thaumasium*, submetidos a manutenção em temperatura de 4°C, criopreservados com e sem adição de DMSO e glicerol e mantidos em sílica-gel. Os resultados demonstraram que os isolados NF34a e I31 não apresentaram variação no crescimento radial, quando armazenados em temperatura de 4°C e congelados com ou sem adição de crioprotetores. Não houve diferença na produção massal de micélio seco dos isolados quando armazenados a temperatura de 4°C e congelados com adição de crioprotetores. O armazenamento em sílica-gel e o congelamento sem crioproteção pareceram interferir negativamente na capacidade dos fungos em produzir massa micelial. O armazenamento de NF34a em temperatura de 4°C e o congelamento com adição de DMSO foram os tratamentos em que se obteve maior redução das larvas infectantes *in vitro*. Não foi verificada diferença na capacidade predatória *in vitro* do isolado I31 quando mantido em temperatura de 4°C ou quando congelado com adição de DMSO ou glicerol. A manutenção dos isolados em sílica-gel e o congelamento sem crioproteção interferiram negativamente na capacidade predatória, porém estes ainda foram capazes de reduzir a população de larvas infectantes em relação ao grupo controle. No teste de passagem dos isolados pelo trato gastrointestinal de bovinos, a administração de 20 g de micélio aos animais foi suficiente para recuperação de material fúngico nas fezes e pico de redução no número de larvas infectantes nas fezes após 24 horas da administração das amostras. O isolado NF34a foi responsável pelos maiores índices de redução das populações de larvas de helmintos após a passagem pelo

trato gastrointestinal dos animais e o armazenamento em 4°C foi o tratamento em que se observou maior taxa de redução. A criopreservação parece ser um método eficiente para manutenção dos isolados, porém neste trabalho foi evidenciada diminuição da capacidade predatória do isolado NF34a. A manutenção dos isolado em sílica-gel deve ser utilizado para manutenção das amostras por períodos prolongados, quando não houver disponibilidade de nitrogênio líquido.

ABSTRACT

MOTA, Marcelo de Andrade, M.S., Federal University of Viçosa, February 2002.
Effects of Long-term Storage of *Arthrobotrys robusta* and *Monacrosporium thaumasium* Nematode Trapping Fungi. Adviser: Jackson Victor de Araújo,
Committee Members: Maria Catarina Megumi Kasuya and Robert Weingart Barreto.

Biological control of helminths parasites of cattle is an alternative to the use of anthelmintics, and its main goal is to reduce the amount of infective larvae in the pasture. The nematophagous fungi produce trap-shaped structures, which are responsible for capturing and destroying the pre-parasite stages of nematodes. Continuous maintenance of the fungi isolates' predatory activity is one of the basic prerequisites for the success of this form of control. This research analyzed the behaviour of I31 isolates of *Arthrobotrys robusta* and NF34a isolates of *Monacrosporium thaumasium*, submitted to maintenance at a temperature of 4°C, cryopreserved with and without DMSO and glicerol, and kept in silica gel. Results showed that the NF34a and I31 isolates did not present variation in radial growth when stored at a temperature of 4°C and frozen with or without adding cryoprotectants. There was no difference in production of dry biomass by the isolates when stored at a temperature of 4°C and frozen with added cryoprotectants. Silica gel storage and freezing without cryoprotection seemed to interfere negatively with the fungi's capacity to produce biomass. Storing NF34a at a temperature of 4°C and freezing it with DMSO were the treatments in which the largest *in vitro* reduction of infective larvae was obtained. There was no difference in terms of *in vitro* predatory capacity of the I31 when stored at a temperature of 4°C or when frozen with DMSO or glicerol. Storage of the isolates in silica gel and freezing without cryoprotection interfered negatively in their predatory capacity, but they were still able to reduce the population of infective larvae in relation to the control. When the passage of isolates through the gastrointestinal tract of bovines was tested, the administration of 20 g of mycelium was enough to recover fungi material in feces and for a peak reduction of the number of infective larvae in feces 24 hours after the administration of the samples. The NF34a isolate was responsible for the largest reduction rates in helminth larvae populations following passage through the gastrointestinal tract of the animals, and storage at 4°C was the treatment in which the largest reduction rate was observed. Cryopreservation

seems to be an effective method for keeping the isolates, although, in this research, a reduction of the NF34a's predatory capacity became evident. Storage of the isolates in silica gel should be chosen when keeping the samples for long periods of time, whenever liquid nitrogen is not available.

1. INTRODUÇÃO

A atividade pecuária constitui uma das importantes fontes de renda nacional. O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo e ocupa a segunda posição na produção mundial de carne. Porém, a participação brasileira neste setor responde por apenas 8% do volume mundial comercializado. O grande mercado consumidor nacional, o câmbio desfavorável e as barreiras sanitárias impostas pelos Estados Unidos e Comunidade Européia inibiram as exportações na década de 90 (ANÔNIMO, 2000). Entretanto, a abertura do comércio internacional, aliada a tendência mundial de valorizar a produção de animais alimentados no pasto, livres de ingestão de produtos químicos e resíduos de ração de origem animal, pode tornar o mercado externo mais atrativo para os produtores, uma vez que a maioria do gado nacional é criado extensivamente. Para atender a esta possível demanda, há necessidade de se incrementar os níveis de eficiência produtiva, intrinsecamente relacionados a condições adequadas de sanidade animal, seleção genética e nutrição (VERCRUYSSSE e DORNY, 1999).

Dentre os fatores que interferem no desenvolvimento pleno da atividade pecuária, as helmintoses gastrintestinais ocupam lugar de grande destaque (MACRAE, 1993). Os prejuízos estão relacionados ao retardo na produção, custos com tratamentos profilático e curativo e em casos extremos, a morte dos animais. Enquanto nos países desenvolvidos os gastos devidos aos custos com controle são significativos, nos países em desenvolvimento as doenças parasitárias causam prejuízos pela diminuição na produção e na restrição à criação de animais com reduzida susceptibilidade às parasitoses, porém com baixas performances produtivas. As raças de animais com melhores índices produtivos, quase sempre criadas nos países desenvolvidos, raramente se sobressaem em condições ambientais onde há grande disponibilidade de parasitos durante todo ano (PERRY e RANDOLPH, 1999).

No Brasil, a ocorrência anual de larvas de nematóides gastrintestinais nas pastagens, serve de fonte de infecção contínua para os animais. Os gêneros de nematóides *Cooperia*, *Haemonchus*, *Oesophagostomum*, *Trichostrongylus*, *Trichuris* e

Bunostomum são os mais prevalentes e importantes parasitos gastrintestinais de bovinos (HONER e VIEIRA-BRESSAN, 1992). Levantamento epidemiológico sazonal realizado no Estado de Minas Gerais, no período de 1993 a 1995, demonstrou que *Cooperia* é o gênero de helminto gastrintestinal bovino mais prevalente durante todo ano. Na estação chuvosa houve recuperação deste parasito (setembro a fevereiro), apesar de o fato também ocorrer na estação seca (março a agosto), indicando que seus estágios larvais seriam mais resistentes ao calor e teriam melhor habilidade migratória. *Haemonchus* teve comportamento prevalente durante todo o ano, com concentração maior durante a estação chuvosa e início da estação seca, enquanto *Oesophagostomum* obteve pequena prevalência durante todo o experimento, ocorrendo principalmente na estação chuvosa (LIMA, 1998).

As conseqüências das helmintoses gastrintestinais parasitárias estão relacionadas ao número de larvas infectantes a que o animal é exposto e a quantidade e espécie de parasitos que se estabelecem em seu trato gastrintestinal. Estes fatores podem ser modificados de acordo com a raça, idade, estado imune e nutricional do hospedeiro (COOP e KYRIAZAKIS, 1999). A patologia das infecções helmínticas está associada a anorexia, anemia, redução no ganho de peso, hemorragias abomasais e intestinais, aumento da atividade hematopoiética, alterações no volume e concentrações plasmáticas (VIEIRA-BRESSAN et al., 1992). O mecanismo envolvido na redução do consumo de alimento pelos animais pode estar relacionado a alterações, provocadas pelos parasitos, nos níveis séricos de vários hormônios gastrintestinais, principalmente gastrina e colecistocinina (FOX, 1997). Em seus sítios de predileção, os parasitos podem causar danos às estruturas de mucosa gastroentérica, provocando alterações nas funções digestivas. Uma das principais lesões se refere a abrasão das vilosidades intestinais, com freqüente hiperplasia das criptas de Lieberkühn e perda na diferenciação celular, promovendo depressão nas capacidades digestiva e absorptiva. A motilidade estomacal pode ser influenciada por substâncias de origem parasitária, induzindo atividade mioelétrica irregular, gerando alterações no peristaltismo e fluxo digestivo. O tempo de trânsito dos alimentos é encurtado, diminuindo o contato entre o conteúdo luminal e a mucosa intestinal. As modificações epiteliais, associadas a alterações na permeabilidade da mucosa digestiva, fazem com que haja perda de proteína plasmática para a luz intestinal (HOSTE, 2001).

Uma das características das infecções helmínticas é seu caráter crônico (ABBAS et al., 1994). A montagem da resposta imunitária

efetora contra os estágios parasitários pode demorar meses para ser desenvolvida. Os efeitos da resposta imune adquirida contra os nematóides se concentram nas seguintes ações: rejeição ao estabelecimento de larvas infectantes, retardamento no desenvolvimento larvar, redução na ovipostura e viabilidade de ovos e na expulsão de vermes adultos. Cada uma destas manifestações acontecem de forma seqüencial, dependendo do tempo e grau de infecção, da espécie e número de larvas do parasito ingeridas e ainda aos aspectos inerentes ao hospedeiro, como sexo, raça, idade e estado reprodutivo (EMERY, 1996).

O conhecimento sobre a epidemiologia dos parasitos e suas interações com os hospedeiros em um determinado ambiente e sistema produtivo são os requerimentos mais importantes no estabelecimento de um sistema controle efetivo. A falta destas informações pode levar a utilização inadequada de tratamentos anti-helmínticos, relacionada ao rápido desenvolvimento de resistência e traduzida em aumentos de casos clínicos e perdas produtivas. Os programas de controle parasitários eficientes estão baseados em informações sobre a disponibilidade de larvas no ambiente, detecção de fontes de infecção, conhecimento sobre as exigências climáticas para eclosão de ovos e viabilidade larvar. Medidas preventivas baseadas nestas informações podem diminuir a freqüência de tratamentos químicos e quando associadas a outras formas de controle podem reduzir a dependência dos anti-helmínticos (STROMBERG, 1997; BARGER, 1999; STROMBERG e AVERBECK, 1999).

Na antigüidade, o homem utilizou empiricamente drogas arsenicais, eméticos, sulfatos nicotínicos e outras substâncias venenosas como forma de controlar as helmintíases gastrintestinais (REINECKE, 1983). Somente com o advento das drogas que ofereciam ampla margem de segurança para os animais tratados é que se pode estabelecer um controle mais eficaz destas enfermidades. Para ser considerado ideal, um composto anti-helmíntico deve ter preço razoável, ser eficaz contra todos os estágios de uma determinada espécie de parasito, de fácil administração, não ser tóxico e ser rapidamente metabolizado e excretado pelo hospedeiro (URQUHART et al., 1996).

Problemas relacionados a resistência e ecotoxicidade enfatizam a necessidade de serem implementados programas integrados de controle parasitário, que assegurem saúde e segurança dos organismos vivos, através de tratamentos estratégicos baseados na epidemiologia, eliminação de vermifugações desnecessárias, utilização de pastoreio alternado e higienização de pastagens. Além disto, deve-se evitar o uso continuado de

uma mesma classe de anti-helmíntico, assim como a rápida rotação de compostos, a introdução de vermes resistentes e a utilização de doses inferiores às recomendadas. A identificação de marcadores relacionados a resistência genética dos hospedeiros ao estabelecimento dos parasitos, pode ser um meio de seleção para tomada de decisões sobre cruzamentos raciais. Práticas de manejo que contribuam para o aumento da imunidade, através de nutrição e ou vacinas, também podem ser úteis para incrementar os níveis produtivos. A utilização de taninos extraídos a partir de plantas, que funcionem como vermífugos e a seleção de espécies de gramíneas que dificultem o desenvolvimento larvar no meio ambiente são propostas disponíveis, porém ainda não exploradas e validadas (NIEZEN et al., 1996; REW, 1999; THAMSBORG et al., 1999; WALLER, 1999; WILLIAMS, 1999).

Dentre as alternativas promissoras para o combate não químico de parasitos, pode-se destacar a utilização do controle biológico, um método ecológico desenvolvido para diminuir uma população parasitária para níveis sub-clínicos aceitáveis e manter os índices produtivos em limiar econômico, através da utilização de um antagonista natural. Na prática, o controle biológico não atua sobre estágios internos de parasitos, contudo concentra suas ações sobre os hospedeiros intermediários, paratênicos, de transporte, vetores e estágios larvais de vida livre, diminuindo a fonte de infecção para os hospedeiros finais, além disso causam menos efeitos negativos no ambiente que os métodos químicos. Os microorganismos selecionados como antagonistas naturais devem possuir especificidade de ação, alta capacidade reprodutiva e suportar às condições ambientais no local em que o controle é realizado. A seleção de um agente que possa ser empregado comercialmente como controlador biológico de parasitos gastrintestinais de ruminantes está baseada na capacidade de produção do antagonista em escala industrial, nos custos relacionados a esta produção, na competitividade com as drogas tradicionais estabelecidas no mercado e no tempo de sobrevivência do organismo em formulações comerciais. Deve-se atentar para que as formulações ofereçam segurança para produtores, consumidores, animais tratados e ao meio ambiente e finalmente, que seja efetivo no controle do organismo alvo (GRØNVOLD et al., 1996).

2. REVISÃO DE LITERATURA

Como regra de manutenção dos sistemas biológicos, toda população é regulada por antagonistas. Este processo ocorre espontaneamente na natureza e não é dependente da interferência do homem. Na ausência de controladores naturais, a população de um determinado organismo poderia aumentar indiscriminadamente. Normalmente, o termo controle biológico é definido como um método ecológico, onde o homem utiliza antagonistas naturais disponíveis no ambiente, para diminuir a um limar sub-clínico e economicamente aceitável a população de um agente causador de perdas produtivas à atividade pecuária ou agrícola (GRØNVOLD et al., 1996).

Centenas de organismos antagonistas tem sido descritos para o controle de nematóides parasitos de plantas e de animais. Um dos primeiros agentes identificado como parasito de nematóides foi o actinomiceto *Pasteuria penetrans* (Thorne), que atua como agente controlador de nematóides parasitos de plantas, através de seus esporos bacterianos e de microfibras adesivas, que aderem à cutícula de nematóides juvenis. (SAYRE e STARR, 1985). O potencial de amebas da espécie *Theratomyxa weberi* também foi investigado. Estes organismos são capazes de permanecer na cutícula dos nematóides e consumi-los em até 24 horas. Sua utilização é limitada pois se movimentam mais lentamente que os nematóides e são mais sensíveis às condições de baixa umidade (SAYRE e WERGIN, 1979). Nematóides também são capazes de eliminar outros nematóides através de dentes e lancetas presentes na sua capsula bucal e da excreção de toxinas capazes de paralisar o oponente durante o combate (STIRLING, 1991).

Fungos nematófagos, normalmente chamados de fungos destruidores de nematóides, são um grupo ecológico diverso com mais de 150 espécies catalogadas, capazes de utilizar os nematóides como alimento (BARRON, 1977). Eles são divididos em três grupos. A maioria das espécies está classificada como fungos predadores de nematóides. Estes fungos produzem estruturas em forma de anéis constritores e não constritores, hifas, botões e redes tridimensionais adesivas ao longo do micélio. O aprisionamento à armadilha é seguido pela penetração das hifas na cutícula do nematóide. Dentro do nematóide, ocorre o crescimento das hifas e a digestão dos conteúdos internos. Um segundo grupo, denominado fungos endoparasitos, é capaz de infectar os nematóides através de esporos, que uma vez ingeridos desenvolvem hifas responsáveis pela absorção do conteúdo interno do nematóide.

Estes fungos não produzem hifas vegetativas fora do corpo do hospedeiro, mas hifas férteis ou conidióforos contendo esporos. O terceiro grupo de fungos é denominado oportunistas, parasitos de ovos. As hifas penetram a casca do ovo, através dos pequenos poros existentes na camada vitelínica, causando alteração na permeabilidade da casca e expandindo seu volume. A hifa aumenta de tamanho ao passar pela camada vitelínica e atravessa a camada adjacente quitínica e lipídica. Como consequência do processo, a camada vitelínica se divide, a camada de quitina se torna vacuolizada e a camada de lipídios se torna dispersa. Hifas endógenas emergem do ovo e produzem conidióforos, funcionando como fonte de conídios. Estes tipos de fungos colonizam o conteúdo do ovo, ou ainda a larva em desenvolvimento no seu interior (MORGAN-JONES e RODRÍGUEZ-KÁBANA, 1988).

Os fungos predadores nematófagos são os organismos antagonistas de nematóides mais pesquisados, pois tem se mostrado capazes de reduzir efetivamente populações de nematóides em condições de laboratório e a campo (LARSEN, 1999). A formação de armadilhas, ao longo de suas hifas, ocorre em resposta à presença do nematóide ou suas excretas, de compostos biológicos ou ainda, é induzida por condições de estresse fisiológico, como na escassez de nutrientes e água (BALAN e GERBER, 1972). O processo de diferenciação das armadilhas ocorre dentro de 24 horas após a interação fungo e nematóide (PRAMER, 1964). Quanto maior a motilidade dos nematóides, maior o estímulo ao fungo para a produção de armadilhas (NANSEN et al., 1986, 1988). A formação de armadilhas pode ser atribuída também aos esporos (DACKMAN e NORDBRING-HERTZ, 1992).

Embora muitos fungos predadores de nematóides tenham sido isolados e identificados durante o fim do século dezenove (ZOPF, 1888), muitas informações sobre as características ecológicas, nutricionais e fisiológicas destes organismos só recentemente foram geradas. No solo, onde prevalecem condições nutricionais estressantes para o desenvolvimento dos fungos, a habilidade em predação de nematóides propicia a estes tipos de microorganismos vantagens adicionais de sobrevivência. Algumas espécies desenvolvem estruturas de captura como resultado de estímulos externos, enquanto outras desenvolvem-nas espontaneamente, demonstrando serem as últimas mais dependentes de nematóides como fonte de nutrientes. As espécies formadoras espontâneas de armadilhas são mais abundantes em solo contendo disponibilidade de matéria orgânica e esta habilidade confere

a estas espécies vantagem competitiva sobre as espécies não espontâneas em solo com fauna e flora microbiana rica (GRAY, 1985). Alguns experimentos falharam na tentativa de indicar os requerimentos nutricionais para o desenvolvimento de culturas de fungos nematófagos (COSCARELLI e PRAMER, 1962), porém recentemente foi demonstrado que fungos nematófagos crescem bem em meio de cultivo contendo ácido oléico e o aminoácido D-alanina como fonte de carbono e energia para o processo de formação de armadilhas (ROSENWEIG, 1983; DIJKSTERHUIS et al., 1993). O crescimento rápido e a produção abundante de micélio são dois importantes fatores para a disseminação e sobrevivência dos fungos em condições ambientais, embora o crescimento micelial não esteja relacionado com a capacidade de um isolado em preda nematóides (DACKMAN et al., 1987). O papel dos nematóides na nutrição dos fungos nematófagos ainda não é claro. Fungos predadores são capazes de invadir e consumir a carcaça de nematóides em decomposição, porém o processo de invasão é mediado apenas por hifas vegetativas através de orifícios naturais, numa velocidade muito menor do que a invasão mediada por armadilhas em nematóides vivos (NORDBRING-HERTZ e STÄLHAMMAR-CARLEMALM, 1978).

Como resultado de estudos de ultra-estrutura do processo de penetração das hifas, descobriu-se um pouco sobre os mecanismos envolvidos na interação dos fungos com os nematóides. O nematóide é inicialmente mantido aderido ao fungo através de uma substância fibrilar adesiva rica em fosfatase ácida, que também é responsável pela degradação da cutícula. O processo de penetração acontece em uma hora e está associado a presença de corpos densos ricos em enzima que atuam como peroxissomos e encontrados apenas nas armadilhas e nunca em hifas vegetativas. Estes corpos são detectados na primeira hora do processo de penetração e depois desaparecem (JANSSON e NORDBRING-HERTZ, 1988). O processo final de penetração da cutícula parece ser resultado de força mecânica (VEENHUIS et al., 1985). A segunda cutícula das larvas infectantes (L₃) dos nematóides parasitos de animais domésticos, parece não proteger as larvas da predação pelos fungos, pois os mesmos são menos hábeis em preda L₃ sem cutícula externa (WHARTON e MURRAY, 1990). Em experimentos mais recentes, entretanto, se verificou que isolados de *Arthrobotrys* spp. tiveram maior capacidade predatória sobre larvas infectantes sem cutícula externa, demonstrando que há uma complexa relação entre receptores de superfície dos nematóides e ligantes presentes na parede celular dos fungos (ARAÚJO, 1998).

Os fungos nematófagos podem apresentar esporos bastante diversificados no tamanho, coloração, forma e persistência no ambiente. A maioria dos fungos nematófagos apresenta esporos secos, emergindo de estruturas de frutificação, denominadas conidióforos, essenciais na dispersão aérea dos conídios. Os conidióforos crescem verticalmente, em direção perpendicular ao substrato o qual o isolado foi cultivado. Algumas espécies produzem conidióforos contendo apenas um conídio em suas extremidade, outras espécies apresentam cachos de conídios em toda a estrutura do conidióforo. Estruturas denominadas clamidósporos também podem ser produzidas. Estes são esporos de parede espessa, diferenciados a partir das hifas, aparecem em condições de estresse extremo e podem dar origem a hifas, conidióforos e conídios (BARRON, 1977).

A grande maioria dos fungos nematófagos são mitospóricos e antigamente eram classificados na divisão Deuteromycetes, classe Hyphomycetes, ordem Hyphomycetales e família Moliniaceae. Apresentam micélio septado e bem desenvolvido, reproduzindo-se agamicamente por esporos exógenos, que são formados sobre ramificações do micélio (DRECHSLER, 1937). Até 1964, a maioria dos fungos eram classificados como pertencentes aos gêneros *Arthrobotrys* Corda, *Dactylaria* Saccardo, *Dactyella* Grove e *Trichothecium* Link. Posteriormente, vários novos gêneros foram descritos, incluindo *Duddingtonia* Cooke, *Monacrosporium* Oudem, *Genicularia* Rifai & Cooke e *Dactylariopsis* Mekhtieva (GRAY, 1987). Recentemente, estágios de reprodução sexuada destes fungos foram observados para algumas espécies que estão sendo reconhecidas como pertencentes ao filo Ascomycota (GRIFFIN, 1994).

O gênero *Arthrobotrys* reúne um grande número de espécies de fungos nematófagos. O gênero foi descrito por Corda em 1839, originário de amostras de solo, porém nesta época, a capacidade de predação nematóides não foi mencionada. Todas os isolados do gênero são capazes de produzir armadilhas na presença de nematóides de vida livre, como *Panagrellus redivivus* (Linné) ou *Turbatrix aceti* (Müller). O gênero é classificado como nematófago facultativo (COOKE e GODFREY, 1964). As espécies pertencentes ao gênero formam conídios blásticos de até três septos, com formato ovóide, proliferando-se na extremidade dos conidióforos. Há abundância na formação de conidióforos e no processo de conidiogênese, iniciado de forma simpodial (ZHANG et al, 1996a). A espécie *A. robusta* (Duddington) possui conidióforo ereto, algumas vezes ramificado, com cerca de 300 µm de comprimento, com a extremidade do conidióforo aumentada de

tamanho, carregando normalmente 6 conídios de formato ovóide, hialino, septados próximo a região mediana, medindo 18-27 µm de comprimento por 8-12 µm de largura. Não são capazes de produzir clamidósporos e produzem redes adesivas para predação de nematóides (VAN OORSCHOT, 1985).

O gênero *Monacrosporium* foi descrito inicialmente por Oudermans em 1885. As espécies são caracterizadas por produzirem apenas um conídio na extremidade do conidióforo. Os conídios são hialinos, fusiformes, com dois a quatro septos transversais, sendo que a célula intermediária é maior que as da extremidade. A espécie *M. thaumasium* (Drechsler) preda nematóides através de redes adesivas, produz conídios medindo entre 27-49 µm de comprimento por 15-23 µm de largura. O conidióforo é ramificado próximo a extremidade, onde cada extremidade carrega um conídio (LIU e ZHANG, 1994; ZHANG et al, 1996b). Normalmente é evidenciada a presença de clamidósporos em culturas de placa com meio de cultura sólido limitante (SAXENA e MITTAL, 1995).

Há alguns anos, os fungos nematófagos são considerados agentes promissores no controle de fitonematóides (MANKAU, 1981). Formulações comerciais desenvolvidas na França, como Royal[®] 300, contendo *A. robusta* e Royal[®] 350, contendo *A. irregularis* (Rifai e Cooke), ao serem introduzidas em solos infestados, foram capazes de reduzir com sucesso a população de *Meloidogyne spp.*, em tomateiro (CAYROL et al., 1978; CAYROL e FRANKOWSKY, 1979). No Brasil, a formulação Nematus[®], contendo *A. conoides* (Drechsler) mostrou ser eficiente no controle de *M. incognita* (Kofrei e White) (DIAS e FERRAZ, 1994; FERRAZ e SANTOS, 1995). Uma formulação, denominada Bioact[®], contendo o fungo *Paecilomyces lilacinus* (Samson), foi desenvolvida nas Filipinas e teve como objetivo principal o combate a *Meloidogyne spp.* em tomateiro, *Globodera rotochiensis* (Wollenweber) em batata, *Radopholus similis* (Cobb), em bananeira, *Rotylenchulus reniformis* (Linford e Oliveira) em abacaxi e *Pratylenchus spp.* em milho (KERRY, 1989).

Os estudos iniciais utilizando fungos nematófagos como controladores biológicos de parasitos gastrintestinais de animais foram realizados no início do século XX, na França. Estes estudos mostraram a ação de fungos predadores sobre larvas infectantes de *Strongyloides papillosus* (Grassi) e *Bunostomum phlebotomum* (Raillet) em condições laboratoriais e a campo (DESCAZEUX, 1939a,b; DESCAZEUX e CAPELLE, 1939; ROUBAUD e DESCAZEUX, 1941a,b). Recentemente, foram

retomados ensaios com diferentes espécies de fungos no combate a diversas espécies de parasitos de animais domésticos, onde esta interação foi observada em placas de Petri preenchidas com meio de cultura. Um dos experimentos pioneiros, observou o efeito antagônico de diversos fungos predadores dos gêneros *Arthrobotrys*, *Dactylaria*, *Monacrosporium* e *Trichothecium* sobre larvas infectantes de *Ostertagia ostertagi* (Stiles) e *Trichostrongylus axei* (Cobbold) (PANDEY, 1973). A avaliação da interação *in vitro* entre *A. oligospora* (Sopurov) e larvas de *Cooperia spp.* e *O. ostertagi* resultou na diminuição da população de nematóides e gerou algumas conclusões sobre necessidades de crescimento dos fungos (GRØNVOLD et al., 1985; GRØNVOLD, 1989). A capacidade da espécie *Duddingtonia flagrans* (Duddington) de produzir armadilhas e clamidósporos, assim como a sua taxa de crescimento, em presença de L₃ de *O. ostertagi* foi observada, indicando esta espécie como promissor agente no controle biológico (GRØNVOLD et al., 1996). A adição de conídios de *A. oligospora* às fezes de bovinos, infectadas com *S. papillosus* foi capaz de reduzir o número de larvas infectantes (CHANDRAWATHANI, 1998). No Brasil, estudos pioneiros, demonstraram que *Arthrobotrys spp.* e *M. ellipsoforum* (Grove) foram eficazes no controle de larvas de *Haemonchus placei* (ARAÚJO et al., 1992, ARAÚJO et al., 1993). Vários isolados do gênero *Arthrobotrys* foram testados sobre larvas infectantes de *Haemonchus contortus* (Rudolphi) de ovinos, onde obteve-se redução significativa de larvas nas placas tratadas em comparação com as placas do grupo controle sem adição de fungo (MENDONZA DE GIVES et al., 1992, 1994). Em um experimento de interação entre larvas infectantes de *H. contortus*, de caprinos e os fungos *M. thaumasium* e *A. conoides*, observou-se que os dois isolados são capazes de reduzir a população de larvas infectantes, porém a espécie *M. thaumasium* mostrou ser mais eficiente (MOTA et al., 2000). A administração de conídios de *A. oligospora* às fezes de equino mostrou ser capaz de reduzir a população de larvas infectantes de ciatostomíneos (CHARLES et al., 1995). As conclusões destes estudos em condições de laboratório, foram favoráveis à utilização de fungos como controladores biológicos de larvas de parasitos de animais domésticos. Porém o método de aplicação prática destes agentes se constituía uma incógnita (LARSEN, 1999).

Embora hajam possibilidades da utilização de fungos nematófagos para o controle das verminoses dos animais domésticos, o melhor local de atividade tem se mostrado ser as fezes frescas, onde todos os

nematóides parasitos de rebanho tem que passar desde estágio de ovo até os estágios larvais, antes de migrar para a pastagem como larva infectante. Há necessidade de determinar que espécies fúngicas são capazes de sobreviver a passagem pelo trato gastrointestinal dos animais, germinar nas fezes e capturar larvas infectantes. Deve-se também intensificar pesquisas que busquem métodos de administração dos fungos aos animais. Algumas alternativas propostas são inserção dos isolados em suplementos alimentares, a administração direta em períodos estratégicos e ainda os mecanismos de liberação lenta intraruminal (WALLER e FAEDO, 1996).

A passagem de fungos pelo trato gastrointestinal de animais domésticos e a avaliação da eficácia dos isolados após a passagem tem sido o foco de diversos estudos. A administração de *A. superba* em grãos de cevada a bovinos infectados com nematóides parasitos gastrintestinais, reduziu o número de larvas infectantes recuperadas em coproculturas (LARSEN et al., 1992). A redução de L₃ de *O. ostertagi* no bolo fecal de bezerros, foi obtida alimentando-se os animais com grãos de cevada com adição de *D. flagrans*, porém obteve-se insucesso com a administração de grãos contendo *A. oligospora* (GRØNVOLD et al., 1993b). Em condições experimentais de campo, foi administrado 100 g de *D. flagrans*, em grãos de cevada, duas vezes ao dia durante dois meses, a bovinos naturalmente infectados. Em relação ao grupo controle, não tratado, foi observada redução significativa na contagem de ovos por grama de fezes (OPG) e no número de L₃ presentes no bolo fecal (WOLSTRUP et al., 1994). Em um ensaio experimental bastante parecido, uma menor quantidade de animais por área e administração de material fúngico por três meses, demonstrou ser mais eficiente no controle a campo (LARSEN et al., 1995). Foi avaliado o efeito da administração de clamidósporos de *D. flagrans* no controle de *Dictyocaulus viviparus* (Bloch) e de alguns parasitos gastrintestinais e constatou-se menor preferéncia pelos fungos em preda larvas de nematóides parasitos pulmonares (FERNÁNDEZ, et al., 1999). No Brasil, estudos com bovinos, em condições experimentais de campo, demonstraram que a administração oral de conídios de *A. robusta*, duas vezes por semana, durante quatro meses foi capaz de reduzir o OPG e a quantidade de vermes de animais traçadores infectados naturalmente com nematóides parasitos gastrintestinais (ARAUJO et al., 1998).

Apesar do consenso que se criou em torno da produção de clamidósporos como forma ideal de administração dos isolados utilizados em programas de controle biológico, há falhas na tentativa em se desenvolver metodologia eficiente para a produção massal destas

estruturas, assim como determinar se realmente apenas os clamidósporos são responsáveis pela capacidade dos fungos em se disseminar nas fezes e ambiente após passagem pelo trato gastrointestinal. A passagem e recuperação de conídios de *A. robusta*, *A. conoides* e *M. thaumasium* na fezes de bovinos, demonstrou que conídios e micélio também foram capazes de atravessar o trato gastrointestinal dos animais e manter atividade predatória sobre larvas infectantes de *H. placei* (Place), reduzindo a população deste nematóide, em comparação ao grupo controle (ARAÚJO, et al., 1996; ARAÚJO, et al., 1999).

Um experimento, utilizando ovinos como animais experimentais, determinou, entre várias espécies de fungos testadas, que *A. oligospora*, *A. oviformis* (Sopruncov) e *Geniculifera eudermata* (Drechsler) foram capazes de resistir ao estresse de passagem pelo trato gastrointestinal dos animais sem perda de capacidade predatória sobre larvas infectantes de *H. contortus* (WALLER et al., 1994). A administração diária, por quatro meses de clamidósporos de *D. flagrans* administrados em grãos de cevada aos ovinos criados em sistema extensivo foi responsável pela conseqüente redução da carga parasitária de *Nematodirus spathiger* (Raillet), *N. battus* (Crofton e Thomas), no intestino delgado, além de *Ostertagia spp.* e *Trichostrongylus spp.* no abomaso (GITHIGIA et al., 1997). Uma série de experimentos de passagem com vários isolados australianos, identificou quatro isolados de *D. flagrans*, como mais eficientes na passagem pelo trato gastrointestinal de ovinos (FAEDO et al., 1997). Demonstrou-se também ser possível a passagem de clamidósporos de *D. flagrans* e de conídios de *A. superba* (LLERANDI-JUÁREZ e MENDONZA DE GIVES, 1998).

A redução de larvas infectantes de ciatostomíneos em fezes de eqüinos também foi obtida com a administração de conídios de *A. oligospora* e *D. flagrans* em diferentes condições climáticas (BIRD e HERD, 1995; BAUDENA et al, 2000; SANTOS et al., 1995). O efeito de *D. flagrans* adicionado a suplemento alimentar na redução de *Oesophagostomum dentatum* (Rudolphi) e *Hyostrogylus rubidus* (Hassal e Stiles), parasitos de suínos foi observada, ao obter-se diminuição do parasitismo nos animais criados em sistema extensivo (NANSEN et al., 1996).

Apesar de todos os avanços realizados na pesquisa de utilização de fungos nematófagos como controladores biológicos de parasitos gastrintestinais de animais domésticos, alguns obstáculos impedem a sua completa implementação. As empresas produtoras de fármacos

anti-helmínticos são relutantes em investir fundos em pesquisas emergentes, a menos que possuam a certeza de retorno de investimento e propriedade intelectual sobre os conhecimentos gerados. Deve-se desenvolver técnicas biológicas capazes de produzir grande quantidade de material fúngico em curto espaço de tempo e particularmente, na identificação taxonômica precisa dos agentes controladores (WALLER e FAEDO, 1996). Como o critério de classificação dos fungos nematófagos está baseado em características morfológicas, várias revisões são publicadas tentando organizar de maneira mais lógica as espécies existentes. Para facilitar a produção em grande escala e dinamizar a rotina laboratorial, atendendo a necessidade de se trabalhar com pureza de espécies e evitar constantes contaminações das culturas, devem ser desenvolvidas metodologias capazes de preservar por período prolongado as características selecionadas dos fungos nematófagos para utilização em programas de controle biológico.

A preservação de culturas de microorganismos utilizados em programas de controle biológico é um pré-requisito para um grande número de procedimentos industriais e de pesquisa. Os critérios de escolha para um método específico de preservação recaem na manutenção de características morfológicas, bioquímicas e na estabilidade genética, pois caso os fungos sejam mantidos de modo a se adaptarem às condições de armazenamento, propriedades fundamentais dos isolados podem ser perdidas, ou ainda, técnicas que possibilitem apenas uma pequena taxa de sobrevivência de amostras podem resultar também na seleção de organismos variantes (BROWN e GILBERT, 1995). Além do mais, deve-se atentar para que o processo seja seguro e barato e ainda possibilite ao inóculo ser transportado, estocado e reconstituído com facilidade.

Há uma grande quantidade de métodos disponíveis para estoque e preservação de isolados fúngicos, organizados em três categorias: crescimento contínuo, secagem e suspensão do metabolismo. As técnicas de crescimento contínuo envolvem constantes transferências de um meio saturado para um meio nutritivo, propiciando ótimas condições de crescimento podendo ser estocadas em temperatura ambiente, refrigerador ou sob camada de água ou óleo mineral. As técnicas de secagem, utilizam normalmente as formas de resistência dos fungos, como esporos, baseiam-se na redução da atividade de água e são caracterizadas por reduzir o metabolismo das células durante o período de armazenamento. Podem ser realizadas com sílica-gel, grãos de cereais e amostras de solo estéreis. Finalmente, há possibilidade de

suspensão do metabolismo a níveis basais, através de técnicas de liofilização, manutenção em nitrogênio líquido, que propiciam redução de atividade de água por desidratação ou congelamento (SMITH e ONIONS, 1994).

A técnica de crescimento contínuo em superfície de ágar permite condições favoráveis de crescimento e desta forma muitos isolados podem ser mantidos por períodos prolongados. O sucesso na manutenção destas culturas baseia-se na transferência periódica de partes de cultura bem desenvolvidas, evitando-se os contaminantes e variantes, para meio fresco não saturado. O método é considerado bastante prático, pois tem custo financeiro baixo e os isolados são rapidamente recuperados das culturas. Porém oferecem o trabalho incômodo de constantes repicagens, o perigo de contaminação por agentes oportunistas e ainda o aparecimento de mutações deletérias, gerando perda das características selecionadas.

O armazenamento de fungos em sílica-gel permite o armazenamento de esporos de isolados, por períodos prolongados. A contaminação por agentes contaminantes é bastante reduzida, pois as condições de umidade reduzida previnem a sua presença. Outra grande vantagem deste método é o custo financeiro baixo e não haver necessidade de aparelhagem específica. Muitas culturas, de um mesmo isolado, podem ser recuperadas de uma mesma amostra de armazenamento.

O processo de estoque em nitrogênio líquido tem sido reconhecido nos últimos anos como sendo o método mais efetivo de preservação de fungos por períodos prolongados, pois reduz ao nível limiar baixo o metabolismo das células, sendo por isto utilizado nas micotecas e centros depositários de patentes biológicas (STALPERS, et al., 1987). Porém, há a necessidade de investigar as variações no método, que o tornam mais eficaz e adequado a cada espécie estudada, a fim de se determinar que fatores afetam a sobrevivência e a recuperação das espécies, pois processos de injúria celular podem ocorrer tanto na etapa de congelamento e descongelamento (GOOS et al., 1967).

Na velocidade lenta de congelamento, a medida que gelo é formado no meio extracelular, há um aumento na concentração osmótica e a formação de um gradiente osmótico sob a membrana celular dos fungos. A saída de água excessiva das células gera comprometimentos na estrutura de membrana plasmática, podendo causar morte celular (PEG e DIAPER, 1989). Em condições ótimas de

congelamento, há formação uniforme de gelo intra e extracelular, impedindo a saída de líquido do interior das células e minimizando os efeitos deletérios (MERYMAN et al., 1977). No processo de congelamento rápido não há perda de água para o meio extracelular, porém há formação de pequenos cristais, que tendem a se reorganizar em grandes cristais de gelo no momento do descongelamento e promover injúria física às células (GROUT et al., 1990). Velocidade rápida de descongelamento, combinada ao congelamento ótimo de amostras, gera boas condições de recuperação de amostras, pois evita-se o processo de recristalização excessiva do gelo, impedindo desta forma injúria celular.

A adição de crioprotetores previne os danos provocados no processo de congelamento. Os agentes crioprotetores possuem alta solubilidade em água e desta forma mantém uniforme a concentração do meio durante o processo de congelamento. Os crioprotetores agem criando condições similares a aquelas geradas pela velocidade ideal de congelamento, atuando diretamente em alguns componentes celulares, promovendo estabilização de membrana plasmática, substituindo as moléculas de água nos resíduos polares livres (ANCHORDOGUY et al., 1987). Na rotina laboratorial, o glicerol é o veículo universal utilizado na crioproteção, porém algumas espécies de fungos são melhores preservadas com a adição de Dimetil-sulfóxido (DMSO).

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Testar a capacidade predatória dos fungos predadores de nematóides *Arthrobotrys robusta* (I 31) e *Monacrosporium thaumasium* (NF34a), após diferentes processos de conservação.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o comportamento de fungos das espécies *A. robusta* e *M. thaumasium*, submetidos a processo de armazenamento a temperatura de 4°C.
- Avaliar o comportamento de fungos das espécies *A. robusta* e *M. thaumasium*, submetidos a processo de criopreservação em nitrogênio líquido (-196°C).
- Avaliar o comportamento de fungos das espécies *A. robusta* e *M. thaumasium*, submetidos a processo de conservação em sílica-gel.
- Determinar metodologia adequada de estoque por período prolongado das espécies *A. robusta* e *M. thaumasium*.
- Testar e comparar *in vitro* e *in vivo* a atividade predatória de fungos das espécies *A. robusta* e *M. thaumasium* sobre nematóides parasitos de ruminantes, após processos de estoque por longo período.

4. CAPÍTULO 1

Esporulação, Crescimento Radial e Produção de Biomassa dos Fungos *A. robusta* e *M. thaumasium* Submetidos a Diferentes Processos de Preservação.

4.1. Introdução

Os fungos predadores de nematóides têm reconhecido potencial para o controle biológico de nematóides parasitos gastrintestinais de animais domésticos (LARSEN, 1999). Estes fungos produzem estruturas em forma de anéis constritores e não constritores, botões e redes tridimensionais adesivas ao longo do micélio, responsáveis pelo aprisionamento e penetração das hifas na cutícula do nematóide (BARRON, 1977).

Dentre as espécies conhecidas, *Arthrobotrys robusta* e *Monacrosporium thaumasium* têm sido objeto de pesquisas, devido a seus comportamentos predatórios contra larvas de helmintos parasitos gastrintestinais de bovinos (ARAÚJO et al., 1996; 1999).

Conhecimentos sobre aspectos como crescimento radial, capacidade de esporulação e produção de biomassa são requerimentos necessários para se determinar a potencialidade destes fungos como agentes a serem empregados em programas de controle biológico eficientes. A manutenção das culturas por períodos prolongados pode ser obtida através de diferentes metodologias. A escolha de um protocolo específico para conservação de uma determinada espécie de fungo se baseia nas características dos isolados, na facilidade de realização do método e nos custos econômicos (RYAN et al., 2000).

O objetivo deste trabalho foi avaliar se os métodos de preservação por períodos prolongados interferem na capacidade de esporulação, crescimento radial e produção micelial dos fungos predadores de nematóides *A. robusta* e *M. thaumasium*.

4.2. Material e Métodos

Manutenção de Culturas Fúngicas em Ágar Extrato de Milho a 4°C

Amostras dos isolados I31 de *A. robusta* e NF34a de *M. thaumasium* foram mantidas em cinco tubos de cultura contendo Ágar Extrato de Milho (AEM) 2%, em temperatura de 4°C, livre de luminosidade e repicados a cada seis meses, por 3 vezes.

Manutenção de Culturas Fúngicas em Sílica-gel

Amostras dos isolados I31 de *A. robusta* e NF34a de *M. thaumasium* originadas de tubos de cultura preenchidos com AEM 2%, em temperatura de 25°C, foram inoculadas em meio de esporulação AELA (extrato de levedura, 4 g; K₂HPO₄, 1g; MgSO₄·7H₂O, 0,5 g; amido solúvel, 20 g; ágar, 20 g; água destilada, 1 l). Após sete dias, foram adicionados à superfície das placas solução esterilizada de leite desnatado a 5% e pedaços de papel filtro com 1 cm². Em seguida os pedaços de papel embebidos com a suspensão de material fúngico foram transferidos para cinco frascos contendo grãos de sílica-gel esterilizados. As amostras foram estocadas em temperatura de 4°C em ausência de luminosidade e umidade. Após dezoito meses a recuperação das culturas foi realizada transferindo-se um pedaço de papel do frasco com sílica para a superfície de uma placa de Petri contendo AEM 2% e mantendo-se a placa na temperatura de 25°C.

Manutenção de Culturas Fúngicas em Nitrogênio Líquido (-196°C)

Amostras dos isolados I31 de *A. robusta* e NF34a de *M. thaumasium* originadas de tubos de cultura preenchidos com AEM 2%, em temperatura de 25°C, foram transferidas para meio AELA e após sete dias, discos da periferia da colônia foram distribuídos em três tratamentos diferentes: dez criotubos preenchidos com 1,5 ml de solução de glicerol 10%, dez criotubos contendo 1,5 ml de solução de Dimetil Sulfóxido (DMSO) 10% e dez criotubos contendo 1,5 ml de água destilada. O processo foi realizado em duas etapas: taxa de congelação lenta (-1°C/hora), até que as amostras atingissem a temperatura de -20°C e em seguida foram imersas diretamente em nitrogênio líquido e armazenadas a temperatura de -196°C. Após dezoito meses as amostras foram descongeladas em banho maria a temperatura de 37°C e semeadas em placas de Petri contendo AEM 2%, e mantidas em temperatura de 25°C.

Avaliação do crescimento radial dos isolados I31 e NF34a

O experimento foi realizado em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo Ágar Água (AA) 2%. A temperatura durante o crescimento era de 25°C. Foram organizados dez grupos com dez repetições. Cada grupo recebeu no centro da placa de Petri um disco de cultura do isolado I31 ou NF34a submetidos aos processos de armazenamento em temperatura de 4°C, preservado em sílica-gel, criopreservado com adição de DMSO, glicerol e sem crioproteção. O diâmetro das colônias foi medido no sexto dia de crescimento com um paquímetro ou no momento em que uma das culturas atingisse crescimento até o bordo das placas.

Produção de biomassa

A produção de massa micelial foi realizada em frascos do tipo Erlenmeyer de 120 ml contendo 50 ml meio Batata Dextrose (BD), em temperatura de 25°C e em ausência de luminosidade. Foram criados dez grupos com cinco repetições. Cada grupo foi semeado com um disco de cultura do isolado I31 ou NF34a submetidos aos processos de armazenamento em temperatura de 4°C, preservado em sílica-gel, criopreservado com adição de DMSO, glicerol e sem crioproteção. Os frascos foram mantidos em mesa agitadora a velocidade de 160 rpm. Após sete dias de cultivo, o micélio foi separado do meio com auxílio de um funil de Bucker acoplado a uma bomba de vácuo. O micélio separado neste processo foi seco a temperatura de 105°C em cadinhos com peso pré-determinado, por período de 48 horas. Em seguida foi avaliada a massa seca do micélio produzida em cada tratamento.

Esporulação dos isolados I31 e NF34a

O experimento foi realizado em placas de Petri de 9 cm de diâmetro preenchidas com AELA, em temperatura de 25°C e em ausência de luminosidade. Foram organizados dez grupos com dez repetições. Cada grupo recebeu na superfície do ágar um disco de cultura do isolado I31 ou NF34a submetidos aos processos de armazenamento em temperatura de 4°C, preservado em sílica-gel, criopreservado com adição de DMSO, glicerol e sem crioproteção. Após sete dias, foi adicionada às placas de Petri 10 ml de solução de Tween 20 a 0,01%. Da solução recuperada das placas foram feitas dez leituras em câmara de Neubauer, foi feita a média das leituras e se extrapolou o número de esporos para o volume total inicial.

Análise estatística

Os dados obtidos nos experimentos de crescimento radial, produção de micélio e esporulação foram submetidos a ANOVA e comparados pelo teste de Tukey através do pacote estatístico SAEG, desenvolvido pela Universidade Federal de Viçosa.

4.3. RESULTADOS

Os isolados B1 e NF34a foram capazes de crescer em superfície de ágar água 2%, após estoque em todos os métodos de armazenamento testados. Não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre as amostras do isolado NF34a submetidos a armazenamento a 4°C, congeladas com DMSO, glicerol e sem crioproteção e estes foram os tratamentos que apresentaram maior velocidade de crescimento. As amostras deste isolado conservadas em sílica-gel diferiram da média dos outros tratamentos e obtiveram o menor crescimento dentro do experimento ($P<0,05$) (Figura 1).

O crescimento radial das amostras de I31 armazenadas em temperatura de 4°C, congelado com DMSO e em sílica-gel não diferiram estatisticamente ($P>0,05$). As amostras de I31 congeladas com glicerol e sem crioproteção diferiram estatisticamente da média dos outros tratamentos, apresentando menor crescimento em relação aos outros métodos de preservação a que o isolado foi submetido ($P<0,05$) (figura 4.1.).

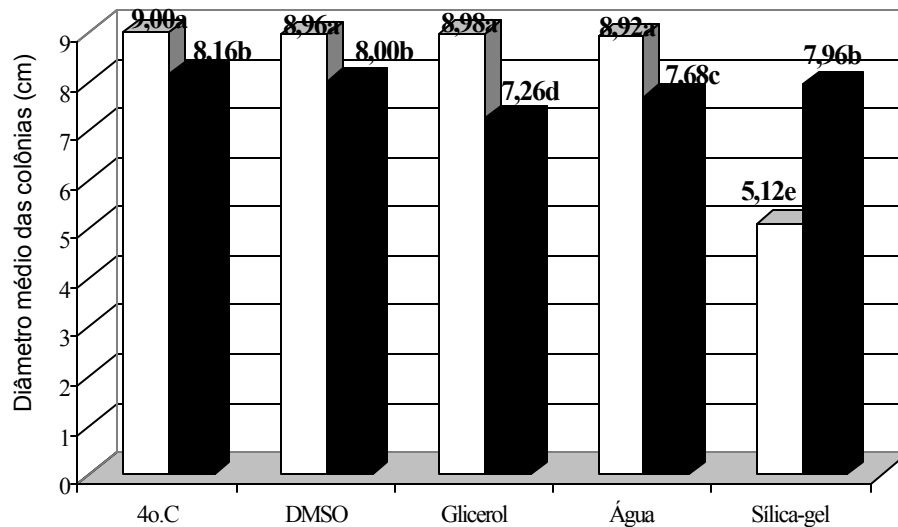


Figura 4.1. Diâmetro médio das colônias (cm) dos isolados I31 e NF34a submetidos a diferentes processos de armazenamento, ao sexto dia de cultivo em superfície de ágar água 2%. Média de dez repetições. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P<0,05$).  Isolado NF34a,  Isolado I31.

Após sete dias de cultivo, todas as amostras apresentaram produção micelial em meio BD. Não houve diferença significativa ($P>0,01$) quanto a produção massal dos isolados I31 e NF34a, quando armazenados a temperatura de 4°C, congelados com adição de DMSO e glicerol. As amostras de isolado I31 apresentaram maior produção massal quando armazenadas em sílica-gel ou congeladas sem crioprotetor, em comparação com as amostras de NF34a, submetidas aos mesmos tratamentos ($P<0,01$)(Figura 4.2.).

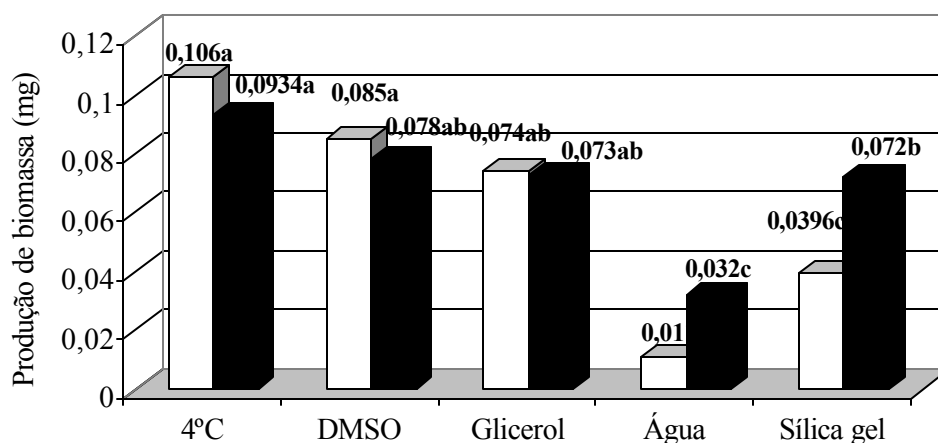


Figura 4.2. Produção massal (mg) dos isolados I31 e NF34a submetidos a diferentes métodos de armazenamento, ao sétimo dia de cultivo em meio Batata Dextrose. Média de cinco repetições. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ($P<0,01$). □ Isolado NF34a, ■ Isolado I31.

Após dez dias de cultivo em temperatura de 25°C, todas amostras produziram esporos em superfície de AELA. As amostras do isolado I31 apresentaram maior produção de esporos em todos os protocolos de armazenamento testados. A comparação das médias de produção de conídios entre cada isolado, demonstrou que o método de preservação em temperatura de 4°C e o congelamento com DMSO não diferiram estatisticamente e foram os tratamentos onde se recuperou o maior número de conídios ($P>0,01$). O armazenamento das amostras em sílica-gel e o congelamento sem crioproteção foram os métodos de armazenamento onde se conseguiu menor produção de conídios ($P<0,01$) (Tabela 4.1.).

Tabela 4.1. Estimativa total do número de conídios $\times 10^4$ por placa de Petri, produzida pelos isolados I31 de *A. robusta* e NF34a de *M. thaumasium*, em superfície de AELA, após dez dias de cultivo.

	Métodos de Preservação				Sílica-gel
	4°C	Congelado DMSO	Congelado glicerol	Congelado água	
I31	167,2 ^A	66,6 ^{AB}	57,1 ^B	28 ^C	42,7 ^C
NF34a	1,28 ^D	0,92 ^D	0,76 ^D	0,38 ^E	0,45 ^E

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,01$). Média de dez repetições. AELA. Ágar extrato de levedura e amido

4.4. DISCUSSÃO

As amostras do isolado NF34a apresentaram maior crescimento radial em superfície de placa, quando comparadas com o isolado I31, a exceção quando NF34a foi armazenado em sílica-gel. Este resultado pode ter ocorrido em virtude da menor produção de esporos de NF34a, que se reflete numa menor quantidade material preservados em sílica-gel, gerando resultados inferiores obtidos pelas amostras neste tratamento.

As amostras dos isolados I31 e NF34a não diferiram estatisticamente em termo de produção massal de micélio seco, quando armazenadas a temperatura de 4°C, congeladas com adição de DMSO e glicerol como crioprotetores, porém o armazenamento em sílica-gel e o congelamento sem crioproteção pareceram interferir negativamente na capacidade dos fungos em germinar e produzir massa micelial.

O fato de *A. robusta* produzir mais esporos que a espécie *M. thaumasium* já era esperado, porém a diferença também foi evidenciada segundo tratamento a qual as amostras foram submetidas. Não houve diferença na produção de esporos entre o armazenamento em temperatura de 4°C e o congelamento com adição de DMSO e como nos testes anteriores, o armazenamento em sílica-gel e o congelamento sem crioprotetor interferiram negativamente na taxa de esporulação dos isolados.

A manutenção das amostras em temperatura de 4°C foi o tratamento em que se obteve melhor desempenho nos parâmetros testados. Este método representaria o que há de mais próximo em relação à manutenção de culturas a temperatura ambiente e menor estresse. A recuperação dos isolados é fácil e há rápido retorno às características iniciais das amostras. Porém, são comuns o aparecimento de contaminação e a possibilidade de perdas de algumas características fisiológicas e patogênicas devido ao crescimento contínuo, após a manutenção por períodos prolongados (SMITH e ONIONS, 1994).

Os resultados apresentados demonstram que a criopreservação foi um método eficiente para a manutenção de fungos por períodos prolongados. De acordo com experimentos anteriores, a baixa velocidade de congelamento utilizada neste experimento, aliada a alta velocidade de descongelamento e a utilização de crioprotetores foram fatores importantes para a recuperação das amostras (MORRIS et al., 1988). A ausência de crioprotetores pode ter sido responsável por

formação de cristais de gelo no interior da célula, que durante o processo de descongelamento provocariam danos às estruturas celulares (SMITH e THOMAS, 1998), responsáveis pelo resultados inferiores das amostras submetidas a este tipo de processamento.

Avaliação anterior do potencial de preservação de fungos em sílica-gel evidenciou que a maioria dos fungos filamentosos testados foram capazes de suportar o estresse do processo, mesmo após cinco anos de estoque (GENTLES e SCOTT, 1979), porém não foi realizado qualquer teste sobre a manutenção das características das amostras. Um estudo mais abrangente, demonstrou a possibilidade de recuperação de amostras de fungos Ascomycota preservadas em sílica-gel, após 25 anos (SHARMA e SMITH, 2000), demonstrando que este método não deve ser descartado, pois além de possuir fácil implementação, algumas amostras permanecem prontas para utilização por períodos prolongados, porém pode-se obter alteração das características iniciais selecionadas. O aumento do tempo de esporulação do isolado NF34a em meio AELA antes do armazenamento em sílica-gel, aumentaria a quantidade de material fúngico conservado e desta forma poderia incrementar a quantidade de material recuperado deste isolado.

5. CAPÍTULO 2

**Avaliação da Capacidade Predatória a Nematóides Parasitos
Gastrintestinais de Bovinos dos Fungos Nematófagos *Arthrobotrys*
robusta e *Monacrosporium thaumasium* Submetidos a Diferentes
Processos de Preservação.**

5.1. INTRODUÇÃO

O parasitismo por nematóides gastrintestinais é considerado um dos obstáculos ao desenvolvimento da atividade pecuária (MACRAE, 1993). Os altos custos com tratamentos químicos e o aparecimento de casos de resistência anti-helmíntica incentivam a busca por formas alternativas de controle às verminoses (WALLER e FAEDO, 1996).

Os fungos predadores são organismos de potencial saprófita, amplamente encontrados na natureza, que possuem a capacidade de produzir armadilhas ao longo de suas hifas, responsáveis pela captura de nematóides (DIJKSTERHUIS et al., 1994). O desenvolvimento destas estruturas ocorre em consequência de condições nutricionais limitantes ou ainda pela presença de excretas produzidos pelos nematóides no substrato (BALAN e GERBER, 1972). Os fungos aderem firmemente à cutícula através de uma substância rica em fosfatase ácida e em seguida iniciam o processo de penetração e consumo das estruturas internas dos nematóides (VEEHNIUS et al., 1985).

As espécies *Arthrobotrys robusta* e *Monacrosporium thaumasium* apresentam comportamentos predatórios contra larvas de helmintos parasitos gastrintestinais em testes in vitro (ARAÚJO, et al., 1992; CHARLES et al., 1995; MENDONZA DE GIVES, et al, 1992). Embora a escolha de uma espécie de fungo ideal para utilização em controle biológico de nematóides parasitos de animais domésticos não pode se justificar somente através dos resultados obtidos em experimentos in vitro, a realização destes testes pode predizer que isolados possuem potencial in vivo de diminuir a população parasitária presente no ambiente fecal após a passagem do fungo pelo trato gastrintestinal dos animais (LARSEN, 1999).

Para garantir a estabilidade dos isolados, devem ser estudadas as metodologias capazes de preservar por período prolongado as características selecionadas nestes organismos utilizados em programas de controle biológico (SIMTH e ONIONS, 1994).

O objetivo deste trabalho foi o de avaliar o efeito de cinco métodos de preservação sobre a capacidade dos isolados I31 de *A. robusta* e NF34a de *M. thaumasium*, de predação de larvas de nematóides parasitos de bovinos.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo de larvas infectantes de nematóides gastrintestinais

Larvas infectantes de nematóides do Gênero *Cooperia* e *Haemonchus* foram obtidas através de coproculturas feitas com fezes de bovinos naturalmente infectados (GUIMARÃES, 1971). As larvas foram recuperadas das coproculturas e quantificadas (ROBERTS e O'SULLIVAN, 1950).

Manutenção de Culturas Fúngicas em Ágar Extrato de Milho a 4°C

Amostras dos isolados I31 de *A. robusta* e NF34a de *M. thaumasium* foram mantidas em cinco tubos de cultura contendo Ágar Extrato de Milho (AEM) 2%, em temperatura de 4°C, livre de luminosidade e repicados a cada seis meses, por 3 vezes.

Manutenção de Culturas Fúngicas em Sílica-gel

Amostras dos isolados I31 de *A. robusta* e NF34a de *M. thaumasium* originadas de tubos de cultura preenchidos com AEM 2%, em temperatura de 25°C, foram inoculadas em meio de esporulação AELA (extrato de levedura, 4 g; K₂HPO₄, 1g; MgSO₄.7H₂O, 0,5 g; amido solúvel, 20 g; ágar, 20 g; água destilada, 1 l). Após sete dias, foram adicionados à superfície das placas solução esterilizada de leite desnatado a 5% e pedaços de papel seletivo com 1 cm². Em seguida os pedaços de papel ambebidos com a suspensão de material fúngico foram transferidos para cinco frascos contendo grãos de sílica-gel esterilizados. As amostras foram estocadas em temperatura de 4°C em ausência de luminosidade e umidade. Após dezoito meses a recuperação das culturas foi realizada transferindo-se um pedaço de papel do frasco com sílica para a superfície de uma placa de Petri contendo AEM 2% e mantendo-se a placa na temperatura de 25°C.

Manutenção de Culturas Fúngicas em Nitrogênio Líquido (-196°C)

Amostras dos isolados I31 de *A. robusta* e NF34a de *M. thaumasium* originadas de tubos de cultura preenchidos com AEM 2%, em temperatura de 25°C, foram transferidas para meio AELA e após sete dias, discos da periferia da colônia foram distribuídos em três tratamentos diferentes: dez criotubos preenchidos com 1,5 ml

de solução de glicerol 10%, dez criotubos contendo 1,5 ml de solução de Dimetil Sulfóxido (DMSO) 10% e dez criotubos contendo 1,5 ml de água destilada. O processo foi realizado em duas etapas: taxa de congelação lenta (-1°C/hora), até que as amostras atingissem a temperatura de -20°C e em seguida foram imersas diretamente em nitrogênio líquido e armazenadas a temperatura de -196°C. Após dezoito meses as amostras foram descongeladas em banho maria a temperatura de 37°C e semeadas em placas de Petri contendo AEM 2%, e mantidas em temperatura de 25°C.

Atividade predatória do isolados I31 e NF34a contra larvas infectantes de nematóides parasitos de bovinos.

O teste de predação foi realizado em superfície de placas de Petri 5 cm de diâmetro preenchidas com AA 2%. Foram formados onze grupos com cinco repetições. Cada grupo recebeu na superfície do ágar um disco de cultura do isolado I31 ou NF34a submetidos aos processos de armazenamento em temperatura de 4°C, preservado em sílica-gel, criopreservado com adição de DMSO, glicerol e sem crioprotetor. Foi ainda criado um controle, onde não foi semeado material fúngico. A todas as placas foram adicionados 500 larvas infectantes de nematóides do gênero *Cooperia* e *Haemonchus*. Após sete dias, as larvas infectantes livres de predação foram recuperadas através de funil de Baermann e quantificadas em microscópio óptico (10X), fazendo-se alíquotas de 20µl da amostra inicial e se extrapolando para o volume total. A taxa de predação foi estimada comparando o número de larvas recuperada nos grupos tratado e controle utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Redução} = \frac{X_t - X_c}{X_c}$$

Onde: X_c = média de larvas recuperadas no controle; X_t = média do número de larvas recuperadas no grupo tratado.

Análise estatística

As médias dos números de larvas infectantes recuperadas ao final do experimento pelo método de Baermann e as reduções percentuais da população de larvas de cada fungo nos diferentes tratamentos foram submetidos a ANOVA e comparadas pelo teste de Tukey, realizado através do pacote estatístico SAEG, desenvolvido pela Universidade Federal de Viçosa.

5.3. RESULTADOS

As taxas de predação dos isolados I31 de *A. robusta* e NF34a de *M. thaumasium* sobre larvas infectantes de nematóides parasitos gastrintestinais são apresentados na figura 5.1. Amostras do isolado NF34a armazenadas em temperatura de 4°C e congeladas com adição de DMSO foram mais eficientes em predar as larvas de parasitos em relação aos outros tratamentos ($P<0,05$), apresentando percentual de redução de 94,67%. A preservação do isolado NF34a em glicerol e do isolado I31 em temperatura de 4°C, congelado com DMSO e glicerol não diferiram estatisticamente entre si ($P>0,05$), apresentando percentual de redução de 85,34%; 92%; 90,67% e 89,34% respectivamente.

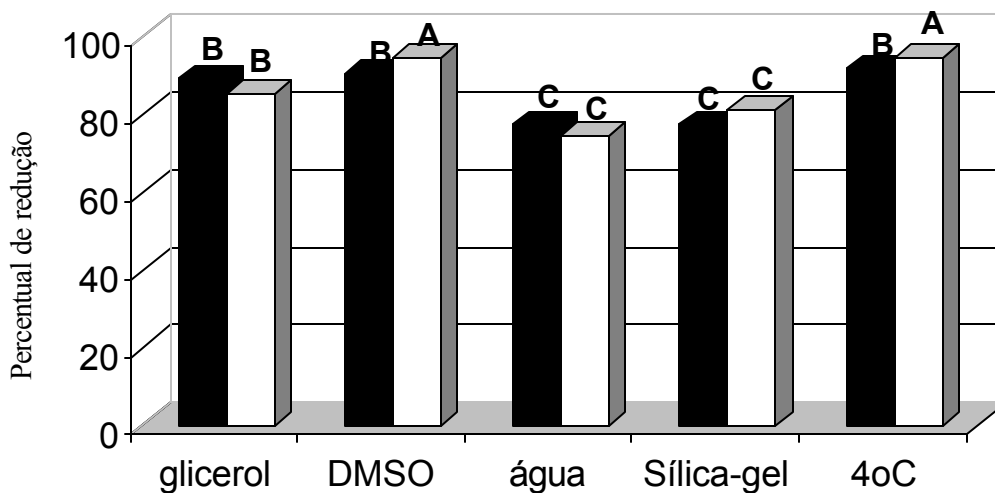


Figura 5.1. Percentual médio de redução de larvas de nematóides parasitos gastrintestinais recuperadas após interação durante sete dias, em superfície de ágar água 2%, com *A. robusta* (I31) e *M. thaumasium* (NF34a) submetidos a diferentes métodos de armazenamento. Percentuais médios seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ($P<0,05$). ■ Isolado I31, □ Isolado NF34a.

A preservação das amostras de I31 e NF34a em sílica-gel e congeladas sem crioproteção não diferiram estatisticamente ($P>0,05$) e foram os tratamentos em que se recuperou o maior número de larvas infectantes (Tabela 5.1), embora quantidade de nematóides vivos recuperados nestes grupos tenha sido muito menor que a obtida no controle ($P<0,05$).

Tabela 5.1. Médias dos números de larvas infectantes de *Cooperia* e *Haemonchus* recuperadas pelo método de Baermann após sete dias de predação em superfície de ágar água 2%, por *A. robusta* (I31) e *M. thaumasium* (NF34a) submetidos a diferentes processos de preservação.

	Métodos de Preservação				
	4°C	Congelado DMSO	Congelado o Glicerol	Congelado Água	Sílica-gel
I31	39,26 ^B	46,62 ^B	53,28 ^C	126,64 ^D	113,32 ^D
NF34	26,64 ^A	26,64 ^A	73,28 ^C	113,32 ^D	93,32 ^D
Controle	356,66 ^E				

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ($P<0,05$).

5.4. DISCUSSÃO

A interação *in vitro* entre isolados de *M. thaumasium* e várias espécies de nematóides, demonstrou anteriormente a capacidade do fungo em predar larvas dos gêneros *Cooperia* e *Haemonchus* (GOMES et al., 1999). Testes entre as espécies do gênero *Arthrobotrys* e o nematóide do gênero *Cooperia*, provaram que *A. robusta* foi eficaz em diminuir a população de larvas do parasito (GOMES et al., 2001). Neste experimento, os isolados I31 e NF34a mantiveram sua capacidade predatória sobre larvas infectantes de nematóides parasitos gastrintestinais, mesmo após armazenamento em diferentes métodos de preservação.

Nas amostras do isolado I31, não houve diferença entre a manutenção em temperatura de 4°C e o congelamento com adição de qualquer um dos crioprotetores utilizados no experimento. O armazenamento de NF34a em temperatura de 4°C e o congelamento com adição de DMSO foram os tratamentos que menos afetaram a capacidade predatória, porém o congelamento de NF34a com adição de glicerol afetou negativamente a capacidade predatória do isolado. Apesar de DMSO e glicerol pertencerem a mesma classe de crioprotetores, possuem forma distinta de ação, explicando a taxa de predação diferente apresentada pelas amostras do isolado NF34a quando congeladas com estes agentes (BROWN e GILBERT, 1995). A criopreservação com adição de glicerol já foi relacionada ao crescimento lento e queda na taxa de esporulação de fungos, porém estes fenômenos foram evidenciados após adição de concentrações superiores às testadas no experimento (SANDSKÄR e MAGALHÃES, 1994).

O congelamento lento, aliado ao descongelamento rápido não foram capazes de prevenir injúria celular às amostras congeladas somente com água, demonstrando que a adição de crioprotetores é indispensável para o completo sucesso do método. Durante o congelamento das amostras, a ausência de DMSO, glicerol ou qualquer outro crioprotetor pode resultar na quebra da osmolaridade da membrana celular dos fungos. Os crioprotetores agem reduzindo a formação de cristais de gelo no interior das células e impedindo desidratação celular excessiva (SMITH et al., 1986). A combinação destes eventos pode ter influenciado na recuperação das amostras dos isolados I31 e NF34a, quando congeladas sem crioproteção.

Embora a manutenção de fungos filamentosos em sílica-gel seja um método de fácil realização, de baixo custo e de comprovada possibilidade de preservação de isolados por períodos prolongados (GENTLES e SCOTT, 1979; SHARMA e SMITH, 2000), nos isolados testados houve significativa perda da capacidade predatória em relação aos outros tratamentos testados. Neste método de preservação, apenas estruturas de resistência são preservadas. Micélio e esporos de parede delgada não resistem ao estresse de remoção da água dos seus constituintes celulares (SMITH e ONIONS, 1994). Apesar das alterações apresentadas sobre as características iniciais, a manutenção de fungos em sílica-gel continua a ser indicada, principalmente quando não há fonte disponível de nitrogênio líquido para criopreservação (DHINGRA e SINCLAIR, 1995).

A manutenção das amostras em sílica-gel e o congelamento sem crioproteção interferiram negativamente na capacidade predatória dos isolados, porém estes ainda foram capazes de reduzir acentuadamente a população de larvas infectantes em relação ao grupo controle. O armazenamento das amostras em temperatura de 4°C foi o método de armazenamento com que se obtiveram os melhores percentuais de redução da população parasitária. A manutenção contínua dos isolados neste sistema entretanto, pode gerar em algumas gerações perda da patogenicidade dos isolados (SMITH e ONIONS, 1994).

6. CAPÍTULO 3

**Influência de Diferentes Processos de Preservação sobre a Capacidade
Predatória dos Fungos *Arthrobotrys robusta* e *Monacrosporium
thaumasium* após Passagem pelo Trato Gastrointestinal de Bovinos.**

6.1. INTRODUÇÃO

As helmintoses gastrintestinais de animais domésticos têm sido reconhecida como um dos fatores que afetam o desempenho da atividade pecuária. O registro de casos de resistência anti-helmíntica, antes restrito a ovinos e caprinos, têm sido observado em importantes nematóides parasitos de bovinos (WALLER, 1999).

O controle biológico através dos fungos nematófagos constitui um método alternativo e não químico, indicado para o controle de nematóides parasitos de animais domésticos (LARSEN, 1999). Testes in vivo de passagem de fungos nematófagos pelo trato gastrintestinal dos animais têm demonstrado a possibilidade de redução de larvas infectantes na pastagem e consequentemente do número de nematóides adultos que se estabelecem nos animais (GRØNVOLD et al., 1993a; WOLSTRUP et al., 1994). Embora hajam muitas possibilidades da utilização de fungos nematófagos para o controle das verminoses dos animais domésticos, o melhor local de ação tem mostrado ser as fezes frescas, onde todos os nematóides parasitos de rebanho tem que passar desde estágio de ovo até os estágios larvais, antes de migrar para a pastagem como larvas infectantes (WALLER e FAEDO, 1996). A capacidade de passagem dos isolados fúngicos pelo trato gastrintestinal dos animais e sua disseminação no bolo fecal são fatores essenciais para que um fungo seja considerado controlador biológico.

Isolados dos fungos *Arthrobotrys robusta* e *Monacrosporium thaumasium* têm atividade predatória contra larvas de helmintos parasitos gastrintestinais de bovinos, resistindo ao estresse de passagem pelo trato gastrintestinal dos animais (ARAÚJO, et al., 1999; ARAÚJO et al., 2001).

Existe um grande número de métodos capazes de preservar por períodos prolongados as culturas fúngicas e desta forma manter as características originais selecionadas dos isolados. Deve-se verificar que métodos são mais indicados para cada espécie fúngica, assim como que metodologia é mais indicada para o tipo de laboratório em que as amostras são mantidas (RYAN et al, 2000).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade predatória após passagem pelo trato gastrintestinal de bovinos dos fungos *A. robusta* e *M. thaumasium* submetidos a três processos de preservação.

6.2. MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo de larvas infectantes de nematóides gastrintestinais

Larvas infectantes de nematóides do Gênero *Cooperia* e *Haemonchus* foram obtidas através de coproculturas feitas com fezes de bovinos naturalmente infectados (GUIMARÃES, 1971). As larvas foram recuperadas das coproculturas e quantificadas (ROBERTS e O'SULLIVAN, 1950).

Manutenção de Culturas Fúngicas em Ágar Extrato de Milho a 4°C

Amostras dos isolados I31 de *A. robusta* e NF34a de *M. thaumasium* foram mantidas em cinco tubos de cultura contendo Ágar Extrato de Milho (AEM) 2%, em temperatura de 4°C, livre de luminosidade e repicados a cada seis meses, por 3 vezes.

Manutenção de Culturas Fúngicas em Sílica-gel

Amostras dos isolados I31 de *A. robusta* e NF34a de *M. thaumasium* originadas de tubos de cultura preenchidos com AEM 2%, em temperatura de 25°C, foram inoculadas em meio de esporulação AELA (extrato de levedura, 4 g; K₂HPO₄, 1g; MgSO₄.7H₂O, 0,5 g; amido solúvel, 20 g; ágar, 20 g; água destilada, 1 l). Após sete dias, foram adicionados à superfície das placas solução esterilizada de leite desnatado a 5% e pedaços de papel seletivo com 1 cm². Em seguida os pedaços de papel embebidos com a suspensão de material fúngico foram transferidos para cinco frascos contendo grãos de sílica-gel esterilizados. As amostras foram estocadas em temperatura de 4°C em ausência de luminosidade e umidade. Após dezoito meses a recuperação das culturas foi realizada transferindo-se um pedaço de papel do frasco com sílica para a superfície de uma placa de Petri contendo AEM 2% e mantendo-se a placa na temperatura de 25°C.

Manutenção de Culturas Fúngicas em Nitrogênio Líquido (-196°C)

Amostras dos isolados I31 de *A. robusta* e NF34a de *M. thaumasium* originadas de tubos de cultura preenchidos com AEM 2%, em temperatura de 25°C, foram transferidas para meio AELA e após sete dias, discos da periferia da colônia foram distribuídos em três tratamentos diferentes: dez criotubos preenchidos com 1,5 ml de solução de glicerol 10%. O processo foi realizado em duas etapas: taxa de

congelamento lento (-1°C/hora), até que as amostras atingissem a temperatura de -20°C e em seguida foram imersas diretamente em nitrogênio líquido e armazenadas a temperatura de -196°C. Após dezoito meses as amostras foram descongeladas em banho maria a temperatura de 37°C e semeadas em placas de Petri contendo AEM 2%, e mantidas em temperatura de 25°C.

Atividade predatória dos isolados I31 e NF34a após passagem pelo trato gastrointestinal de bovinos

Seis bezerros machos com seis meses de idade, mestiços de Holandês e Zebu, foram aleatoriamente separados em grupos de dois animais. No grupo 1 cada animal recebeu 20 g de micélio do isolado I31 ou NF34a submetidos aos processos de armazenamento em temperatura de 4°C, no grupo 2, cada animal recebeu 20 g de micélio do isolado I31 ou NF34a preservados em sílica-gel e no grupo 3, cada animal recebeu 20 g de micélio do isolado I31 ou NF34a submetidos aos processos de criopreservação com adição de glicerol. Foi mantido ainda um sétimo animal controle, ao qual não foi administrado material fúngico. O micélio foi produzido em meio líquido GPL (glucose, 15 g; peptona, 2 g; extrato de levedura, 5 g; água destilada 1 l). Cinco dias antes e cinco dias após a administração de micélio, cada animal foi alimentado diariamente com ração autoclavada. Amostras fecais de cada animal foram coletadas às 12, 18, 24, 48, e 72 horas, após administração do fungo. Dois gramas de fezes foram removidos destas amostras e colocadas ao centro de placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo ágar água 2% e a temperatura de 25°C. A estas placas foram adicionadas 2.000 larvas infectantes de nematóides gastrintestinais do gênero *Cooperia* e *Haemonchus*. Após 15 dias de interação os nematóides vivos foram recuperados com auxílio de um aparelho de Baermann e quantificados. Foram feitas cinco repetições para cada grupo testado. A taxa de predação, para cada isolado dentro dos tratamentos, foi estimada comparando o número de larvas recuperada nos grupos tratado e controle utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Redução} = \frac{X_t - X_c}{X_c}$$

Onde: X_c = média de larvas recuperadas no grupo controle; X_t = média do número de larvas recuperadas no grupo tratado.

Análise estatística

Foi realizada análise de variância para as médias das reduções percentuais da população de nematóides nos diferentes tratamentos. Os dados foram submetidos a regressão e comparados pelo teste de Tukey, através do pacote estatístico SAEG, desenvolvido pela Universidade Federal de Viçosa.

6.3. RESULTADOS

Os isolados I31 de *A. robusta* e NF34a de *M. thaumasium* foram capazes de atravessar o trato gastrintestinal e manter a atividade predatória sobre larvas de nematóides parasitos gastrintestinais de bovinos (Figura 6.1). A administração de 20 g de micélio por animal, em uma única dose, foi suficiente para garantir a recuperação dos fungos após a passagem dos isolados pelo trato gastrintestinal dos bezerros. Foi observada a presença de conídios dos isolados I31 e NF34a nas fezes dos animais semeadas em superfície de ágar água 2%, para todos os intervalos de tempo testados. O isolado NF34a foi responsável pelos maiores índices de redução das populações de larvas de helmintos em todos os tratamentos testados ($P < 0,05$). O armazenamento das amostras em temperatura de 4°C foi o tratamento em que se observou maior taxa de redução nas populações de larvas de helmintos ($P < 0,05$), dentro de cada isolado testado. O pico de atividade predatória dos isolados I31 e NF34a ocorreu após 24 horas de administração do material fúngico aos animais (Tabela 6.1.). Houve perda da capacidade predatória dos isolados I31 e NF34a quando mantidos em nitrogênio líquido e em sílica-gel, em comparação com as amostras mantidas a 4°C , porém os mesmos ainda mantiveram considerável capacidade predatória sobre larvas de nematóides parasitos gastrintestinais.

Tabela 6.1. Percentuais médios de redução de nematóides parasitos gastrintestinais de bovinos, por *Arthrobotrys robusta* e *Monacrosporium thaumasium* submetidos a diferentes métodos de preservação.

Tratamento	Tempo de administração (h)				
	T12	T18	T24	T48	T72
NF34a 4° C	67,3 ^{Aa}	80,8 ^{Ab}	81,3 ^{Ab}	80,3 ^{Ab}	75,8 ^{Aa}
NF34a sílica-gel	54,2 ^{Ba}	56,6 ^{Ba}	69,7 ^{Bb}	58,5 ^{Ba}	62,1 ^{Ba}
NF34a congelado	51,5 ^{Ba}	63,4 ^{Bb}	73,2 ^{Bb}	68,9 ^{Bb}	61,1 ^{Bc}
I31 4° C	51,2 ^{Ca}	47,8 ^{Ca}	65,1 ^{Cb}	44,9 ^{Da}	57,4 ^{Cc}
I31 sílica-gel	37,6 ^{Da}	34,1 ^{Da}	57,7 ^{Db}	50,4 ^{Db}	37,6 ^{Da}
I31 congelado	52,6 ^{Ca}	51,2 ^{Ca}	62,9 ^{Cb}	59,4 ^{Ca}	55,6 ^{Ca}

Valores em percentuais. Média de cinco repetições. Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem numa mesma coluna e médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem numa mesma linha estatisticamente pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

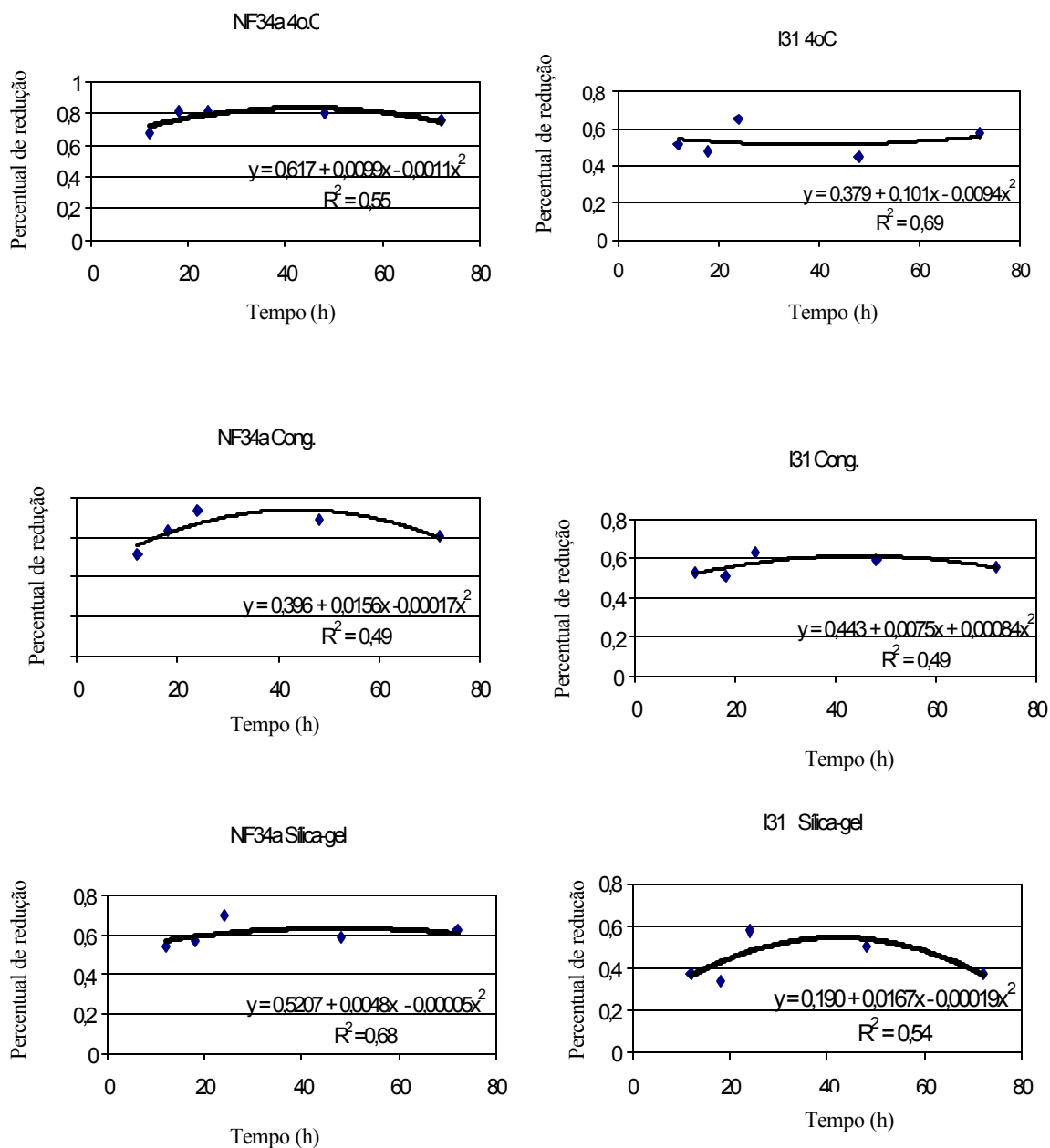


Figura 6.1. Percentuais de redução de nematóides parasitos gastrintestinais predados por *Arthrobotrys robusta* (I31) e *Monacrosporium thaumasium* (NF34a), submetidos a diferentes métodos de preservação, após a passagem pelo trato gastrintestinal de bovinos.

6.4. DISCUSSÃO

As amostras do isolado NF34a produziram maiores índices de redução da população de larvas de nematóides parasitos de bovinos em todos os tratamentos testados e a manutenção das amostras em temperatura de 4°C foi o método que afetou menos a capacidade predatória dos isolados. A combinação do estresse de injúria celular, que ocorre nos métodos de criopreservação e a manutenção em sílica-gel (DHINGRA e SINCLAIR, 1995; SMITH e THOMAS, 1998), aliado à passagem dos fungos pelo trato gastrointestinal dos animais pode ter sido responsável pela diminuição da capacidade predatória dos isolados. Experimentos anteriores já evidenciaram que apesar de *A. robusta* ser considerado um eficiente controlador biológico, algumas amostras do apresentaram capacidade predatória diminuída após a passagem pelo trato gastrointestinal de bovinos, em comparação com os testes in vitro (ARAÚJO, et al., 1998; ARAÚJO et al., 2001).

Anteriormente já foi demonstrado que conídios e micélio dos isolados I31 e NF34a eram capazes de resistir ao estresse de atravessar o trato gastrointestinal de bovinos (ARAÚJO, et al., 1999), porém apesar do consenso que se criou em torno da administração oral de clamidósporos como forma ideal de uso de fungos nematófagos em programas de controle biológico de parasitos gastrointestinais de helmintos (LARSEN, 1999), tem sido difícil a produção massal destas estruturas. A suposição de que os clamidósporos sejam os únicos responsáveis pela capacidade dos fungos em se disseminarem nas fezes e no ambiente após a passagem pelo trato gastrointestinal, não foi comprovada cientificamente. Neste experimento, a administração de 20 g de micélio de *A. robusta* e *M. thumasi*, submetidos a diferentes métodos de preservação, foi suficiente para recuperação de material fúngico nas fezes e pela manutenção da capacidade predatória apresentada pelos isolados no teste em todos os tratamentos.

O pico de redução no número de larvas infectantes ocorreu após 24 horas da administração das amostras. Este período coincidiu com o de maior eliminação de material fúngico nas fezes (LARSEN, et al., 1998).

A manutenção dos isolados em condições laboratoriais faz com que haja perda da capacidade predatória dos fungos em comparação a amostras selvagens (FAEDO et al., 1997), por isto métodos alternativos que melhor promovam a manutenção das características dos isolados deve ser desenvolvidos. Apesar da manutenção das amostras em temperatura de 4°C ter apresentado os melhores índices de redução da população parasitária, deve-se evitar a manutenção contínua neste método, pois os isolados podem perder a patogenicidade após constantes repicagens (SMITH e ONIONS, 1994).

A diminuição da capacidade predatória do isolado NF34a após criopreservação pode ocorrer devido às alterações celulares que ocorrem com o micélio e os esporos durante o processo de congelamento, mesmo com a presença de crioprotetores. A escolha do glicerol foi feita devido a seu menor potencial tóxico às células (HOLDEN e SMITH, 1992), apesar disto foi evidenciada diminuição na capacidade predatória de NF34a quando congelado com adição de glicerol em comparação as amostras mantidas em 4°C, este fenômeno não foi evidenciado no isolado I31, onde as amostras criopreservadas e mantidas em 4°C apresentaram o mesmo comportamento predatório. Embora a criopreservação seja utilizada como método

ideal para manutenção de isolados fúngicos por períodos prolongados, deve-se determinar qual a melhor forma das amostras superarem o estresse do congelamento e descongelamento e de como os isolados podem voltar a apresentar a sua capacidade predatória anterior.

Embora a preservação em sílica-gel seja considerada um método eficiente para preservação de fungos (SHARMA e SMITH, 2000), a manutenção de I31 e NF34a em sílica-gel se refletiu em perda da capacidade predatória dos isolados. Os esporos de I31 e NF34a apresentam parede delgada e o acúmulo do estresse de dissecação imposto pela preservação em sílica-gel, aliada à passagem das amostras pelo trato gastrointestinal dos animais, podem ter causado a diminuição da capacidade predatória.

7. CONCLUSÕES

♦ A manutenção das amostras em temperatura de 4°C pode ser o método utilizado na rotina de manutenção dos isolado I31 e NF34a, sem apresentar prejuízo para características de crescimento micelial e esporulação, porém deve-se sempre investigar se após períodos prolongados haverá manutenção da patogenicidade dos isolados.

♦ A criopreservação com adição de crioprotetores parece ser um método eficiente para manutenção por períodos prolongados dos isolados testados, neste trabalho, foi evidenciada a perda da capacidade predatória de NF34a após a passagem pelo trato gastrointestinal dos animais, em comparação com amostras do isolado mantidas em temperatura de 4°C . Este método deve ser indicado para manutenção das amostras por períodos prolongados.

♦ A manutenção dos isolado I31 e NF34a em sílica-gel deve ser utilizada para a manutenção das amostras por períodos prolongados, quando não houver disponibilidade de nitrogênio líquido. Trata-se de um método simples e de baixo custo e de fácil recuperação das amostras, porém foi evidenciada perda da capacidade predatória dos isolados após o armazenamento.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

- ♦ Avaliar de que forma há retorno da atividade predatória dos isolados criopreservados e mantidos em sílica-gel por períodos prolongados.
- ♦ Desenvolver métodos alternativos de manutenção que sejam de fácil implementação e que possibilitem a recuperação de amostras sem que haja perda da capacidade predatória.
- ♦ Avaliar outros parâmetros fisiológicos a fim de entender o papel dos nematóides como fonte de nutrientes para os fungos nematófagos.
- ♦ Compreender o processo de interação entre cutícula de nematóides e parede celular dos fungos para observar que fatores são alterados após a manutenção de alguns isolados nos diferentes métodos de preservação.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Cellular and Molecular Immunology**. Saunders. Philadelphia, USA, 457 pp.,1994.
- ANCHORDOGUY, T.J.; RUDOLPH, A.S.; CARPENTER, J.F. ; CROWE, J.H. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiol.*, **24**: 324-331, 1987.
- ANÔNIMO. **Anuário da Pecuária Brasileira**. FNP Consultoria e Comércio. São Paulo, Brasil. 392pp., 2000.
- ARAÚJO, J.V. Capture of *Cooperia punctata* infective larvae by nematode-trapping fungi *Arthrobotrys*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, **7**: 101-105, 1998.
- ARAÚJO, J.V.; SANTOS, M.A.; FERRAZ, S.; MAIA, A.S. Antagonistic effect of predacious *Arthrobotrys* fungi on infective *Haemonchus placei* larvae. *J. Helmitol.*, **67**: 136-138, 1993.
- ARAÚJO, J.V.; GOMES, A.P.S.; GUIMARÃES, M.P. Biological control of bovine gastrointestinal nematode parasites in southern Brazil by the namatode-trapping fungus *Arthrobotrys robusta*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, **7**: 117-122, 1998.
- ARAÚJO, J.V.; CAMPOS, A.K.; PAIVA, F.; VIEIRA-BRESSAN, M.C.R. Antagonistic effect of nematode-trapping fungi *Arthrobotrys* on infective larvae of *Oesophagostomum radiatum*, *Cooperia punctata* and *Haemonchus placei*. *Rev. Bras. Ciênc. Vet.*, **8**: 81-84, 2001.
- ARAÚJO, J.V.; NETO, A.P.; AZEVEDO, M.H.F. Screening parasitic nematode-trapping fungi *Arthrobotrys* for passage through the gastrointestinal tract of calves. *Arq. Bras. Vet. Zoot.*, **48**: 543-552, 1996.

- ARAÚJO, J.V.; SANTOS, M.A.; FERRAZ, S.; MAIA, A.S.; MAGALHÃES, A.C.M. Controle de larvas infectantes de *Haemonchus placei* por fungos predadores da espécie *Monacrosporium ellypsosporum* em condições de laboratório. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* **44**: 521-526, 1992.
- ARAÚJO, J.V.; STEPHANO, M.A.; SAMPAIO, W.M. Passage of nematode-trapping fungi through the gastrointestinal tract of calves. *Vet. Arhiv*, **2**: 69-78, 1999.
- BALAN, J.; GERBER, N. Attraction and killing of the nematode *Panagrellus redivivus* by the predacious fungus *Arthrobotrys dactiloides*. *Nematol.* **18**: 163-173, 1972.
- BARGER, I.A. The role of epidemiological knowledge and grazing management for helminth control in small ruminants. *Int. J. Parasitol.*, **29**: 41-47, 1999.
- BARRON, G.L. **The nematode-destroying fungi.** Topics in Microbiology. Nº1 Canadian Biological Publications Ltd, Guelph, Canada, 140pp., 1977.
- BAUDENA, M.A.; CHAPMAN, M.R.; LARSEN, M.; KLEI, T.R. Efficacy of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in reducing equine cyathostome larvae on pasture in south Louisiana. *Vet. Parasitol.*, **89**: 219-230, 2000.
- BIRD, J.; HERD, R.P. In vitro assessment of two species of nematophagous fungi (*Arthrobotrys oligospora* and *Arthrobotrys flagrans*) to control the development of infective cyathostome larvae from naturally infected horses. *Vet. Parasitol.*, **56**: 181-187, 1995.
- BROWN, M.R.H; GILBERT, P. **Microbiological quality assurance.** A guide towards relevance and reproducibility of inocula. CRC Press, Boca Raton, USA. 337pp., 1995.

- CAYROL, J.C.; FRANKOWSKY, J.P. Une méthode de lutte biologique contre les nématodes à galles des racines appartenant au genre *Meloidogyne*. *Rev. Horticole*, **193**: 23-30, 1979.
- CAYROL, J.C. ; FRANKOWSKY, J.P.; LANIECE, A. Contre les nématodes en champignonnière. Mise au point d'une méthode de lutte biologique à l'aide d'un hyphomycète prédateur: *Arthrobotrys robusta* souche antipolis (Royal 300). *Rev. Horticole*, **184**: 23-30, 1978.
- CHANDRAWATHANI, P.; OMAR, J.; WALLER, P. The control of free living stages of *Strongyloides papillosus* by the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Vet. Parasitol.*, **76**: 321-325, 1998.
- CHARLES, T.P.; RODRIGUES, M.L.A.; SANTOS, C.P. Redução do número de larvas de *Cyathostominae* em fezes de equinos tratadas com conídios de *Arthrobotrys oligospora*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* **47**: 87-89, 1995.
- COOKE, R.C.; GODFREY, B.E.S. A key of nematode-destroying fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* , **47**: 61-74, 1964.
- COOP, R.L.; KYRIAZAKIS, I. Nutrition-parasite interaction. *Vet. Parasitol.*, **84**: 187-204, 1999.
- COSCARELLI, W.; PRAMER, D. Nutrition and growth of *Arthrobotrys oligospora*. *J. Bacteriol.*, **84**: 60-64, 1962.
- DACKMAN, C.; NORDBRING-HERTZ, B. Conidial traps - a new survival structure of nematode trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Mycol. Res.*, **96**: 194-198, 1992.
- DACKMAN, C.; OLSSON, S.; JANSSON, H.B.; LUNDGREN, B.; NORDBRING-HERTZ, B. Quantification of predatory and endoparasitic nematophagous fungi and their activities in soil. *Micro. Ecol.*, **13**: 89-93, 1987.
- DESCAZEUX, J. Action de champignons Hypomycètes prédateurs sur les larves de certains nématodes parasites des ruminants. *B. Soc. Pathol. Exotique*, **32**: 457-459, 1939a.

- DESCAZEUX, J. Stérilisation biologique du crottin parasité par des larves de nematodes. *B. Acad. Vet. Fr.*, **12**: 136-139, 1939b.
- DESCAZEUX, J.; CAPELLE, R. Contribution à l'étude des champignons prédateurs des larves de nématodes parasites des animaux domestiques. *B. Acad. Vet. Fr.*, **12**: 284-288, 1939.
- DIAS, W.P.; FERRAZ, S. Avaliação das espécies de *Arthrobotrys* para o controle de *Meloidogyne incognita*. *Fitopatol. Bras.*, **19**: 189-192, 1994.
- DIJKSTERHUIS, J. HARDER, W.; VEENHUIS, M. Proliferation and function of the microbodies in the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora* during growth on oleic acid or D-alanine as the sole carbon source. *FEMS Microbiol. Letters*, **94**: 1-9, 1993.
- DIJKSTERHUIS, J.; VEENHUIS, M.; HARDER, W.; NORBRING-HERTZ, B. Nematophagous fungi: Physiological aspects and structure - functions relationship. *Adv. Microbial. Physiol.*, **36**: 112-143, 1994.
- DINGRHA, O.D.; SILCLAIR, J.B. **Basic Plant Pathology Methods**. CRC Press. Boca Raton, USA, 434 pp., 1995.
- DRECHSLER, C. Some Hyphomycetes that prey on free living terricolous nematode. *Mycologia*, **23**: 447-552, 1937.
- EMERY, D.L. Vaccination against worm parasites of animals. *Vet. Parasitol.*, **64**: 31-45, 1996.
- FAEDO, M.; LARSEN, M.; WALLER, J.P. The potential of nematophagous fungi to control free-living stages of nematodes parasites of sheep: comparison between Australian isolates of *Arthrobotrys* spp. and *Dudingtonia flagrans*. *Vet. Parasitol.*, **72**: 149-155, 1997.

- FERNÁNDEZ, A.S.; LARSEN, M.; NANSEN, P.; GRØNVOLD, J.; HENRIKSEN, S.A.; BJØRN, H.; WOLSTRUP, J. The efficacy of two isolates of the nematode-destroying fungus *Duddingtonia flagrans* against *Dictyocaulus viviparus* larvae in faeces. *Vet. Parasitol.*, **85**: 289-304, 1999.
- FERRAZ, S.; SANTOS, M.A.S. Controle biológico de fitonematóides pelo uso de fungos. *Rev. Anual Fitopatol.*, **3**: 283-314, 1995.
- FOX, M.T. Patophysiology of infection with gastrointestinal nematodes in domestic ruminants: recent developments. *Vet. Parasitol.*, **72**: 285-308, 1997.
- GENTLES, J.C.; SCOTT, E. The preservation of medically important fungi. *Sabouradia*, **17**: 415-418, 1979.
- GITHIGIA, S.M.; THAMSBORG, S.M.; LARSEN, M.; KYVSGAARD, N.C.; NANSEN, P. The preventive effect of the fungus *Duddingtonia flagrans* on Trichostrongyle infections of lambs on pasture. *Int. J. Parasitol.*, **27**: 931-939, 1997.
- GOMES, A. S.; ARAÚJO, J.V.; RIBEIRO, R.C.F. Differential in vitro pathogenicity of predatory fungi of the genus *Monacrosporium* for phytonematodes, free-living nematodes and parasitic nematodes of cattle. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **32**: 79-83, 1999.
- GOMES, A.P.S.; VASCONCELOS, R.S.; RAMOS, M.L.; GUIMARÃES, M.P.; YATSUDA, A.P.; VIEIRA-BRESSAN, M.C.R. In vitro interaction of Brazilian strains of the nematode-trapping fungi *Arthrobotrys* spp. on *Panagrellus* spp. and *Cooperia punctata*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **6**: 891-864, 2001.
- GOOS, R.D.; DAVIS, E.E.; BUTTERFIELD, W. Effect of warming rates on the viability of frozen fungus spores. *Mycologia*, 59: 59-66, 1967.**

- GRAY, N.F. Ecology of nematode trapping fungi: effect on soil moisture, organic matter, distribution. *Soil Biol. Bioch.*, **17**: 499-507, 1985.
- GRAY, N.F. Nematophagous fungi with particular reference to their ecology. *Biol. Rev.*, **62**: 245-304, 1987.
- GRIFFIN, D.H. **Fungal Physiology**. Wiley-Liss. New York, USA, 458pp. , 1994.
- GRØNVOLD, J. Induction of nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* (Hyphomycetales), by infective larvae of *Ostertagia ostertagi* (Trichostrongilidae). *Acta Vet. Scand.*, **30**: 77-87, 1989.
- GRØNVOLD, J.; HENRIKSEN, S.A.; LARSEN, M. ; NANSEN, P.; WOLSTRUP, J. Aspects of biological control with special reference to arthropods, protozoans and helminths of domesticated animals. *Vet. Parasitol.*, **64**: 47-64, 1996.
- GRØNVOLD, J.; KORSHOLM, L. WOLSTRUP, J.; NANSEN, P.; HENRIKSEN, S.A. Laboratory experiments to evaluate the ability of *Arthrobotrys oligospora* to destroy larvae of *Cooperia* species, and to investigate the effect of physical factors on the growth of the fungus. *J. Helmintol.*, **59**: 119-125, 1985.
- GRØNVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; NANSEN, P.; HENRIKSEN, S.A. Nematode-trapping fungi against parasitic cattle nematodes. *Parasitol. Today*, **9**: 137-140, 1993a.
- GRØNVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; NANSEN, P.; HENRIKSEN, S.A.; LARSEN, M. ; BRESCIANI, J. Biological control of nematode parasites in cattle with nematode trapping fungi: a survey of danish studies. *Vet. Parasitol.*, **48**: 311-325, 1993b.
- GROUT, B.; MORRIS, J.; MCLELLAN, M. Cryopreservation and the maintenance of cell lines. *Tibetech.*, **8**: 293-297, 1990.

- GUIMARÃES, M.P. Variação sazonal de larvas infectantes de nematóides parasitos de bovinos em pastagens do cerrado de Sete Lagoas, Minas Gerais. Belo Horizonte, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 145pp, 1971 (Tese de Mestrado).
- HOLDEN, A.N.G.; SMITH, D. Effects of cryopreservation methods in liquid nitrogen on viability of *Puccinia abrupta* var. *partheniicola* urediniospores. *Mycol. Res.*, **96**: 473-476, 1992.
- HONER, M.R.; VIEIRA-BRESSAN, M.C.R. Nematódeos de bovinos no Brasil - o estado da pesquisa. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* **1**: 67-79, 1992.
- HOSTE, H. Adaptative physiological processes in the host during gastrointestinal parasitism. *Int. J. Parasitol.*, **31**: 231-244, 2001.
- JANSSON, H.B. Predacity by nematophagous fungi and its relation to the attractions of nematodes. *Microbial Ecology*, **8**: 233-240, 1982.
- JANSSON, H.B.; NORDBRING-HERTZ, B. Infections events in the fungus-nematode system. In: **Diseases of nematodes**. POINAR, O.G.; BORNE, J.H. Eds. , CRC press, Boca Raton, USA, pp.59-62, 1988.
- KERRY, B.R. Fungi as biological control agents for plant parasitic nematodes. In: WHIPPS, J.M.; LUMDSEN, R.D. Eds., **Biotechnology of fungi for improving plant growth**. CAB International, Cambridge, United Kingdom, pp. 153-170, 1989.
- LARSEN, M. Biological control of helminths. *Int. J. Parasitol.* **29**: 139-146, 1999.
- LARSEN, M.; FAEDO, M.; WALLER, P.J.; HENNESSY, D.R. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: Studies with *Duddingtonia flagrans*. *Vet. Parasitol.*, **76**: 121-128, 1998.

- LARSEN, M. NANSEN, P.; WOLSTRUP, J.; GRØNVOLD, J.; HENRIKSEN, S.A.; ZORN, A. Biological control of trichostrongylosis in grazing calves by means of the fungus *Duddingtonia flagrans*. *Vet. Parasitol.*, **60**: 321-330, 1995.
- LARSEN, M.; WOLSTRUP, J.; HENRIKSEN, S.A. In vivo passage through calves of nematophagous fungi selected for biocontrol of parasitic nematodes. *J. Helmentol.*, **66**: 137-141, 1992.
- LIMA, W.S. Seasonal infection pattern of gastrointestinal nematodes of beef cattle in Minas Gerais State - Brazil. *Vet. Parasitol.*, **74**: 203-214, 1998.
- LIU, X.; ZHANG, K. Nematode-trapping species of *Monacrosporium* with special reference to two new species. *Mycol. Res.* **8**: 862-868, 1994.
- LLERANDI-JUÁREZ, D.; MENDONZA DE GIVES, P. Resistance of nematophagous fungi chlamydospores to the digestive processes of sheep in Mexico. *J. Helmentol.*, **72**: 155-158, 1998.
- MACRAE, J.C. Metabolic consequences of intestinal parasitism. *Proc. Nutr. Soc.* **52**: 121-130, 1993.
- MANKAU, R. Microbial control of nematodes. In: ZUCKERMAN, B.M.; ROHDE, R.A. Eds., **Plant parasitic nematodes**. Academic Press, New York, USA, pp. 475-494, 1981.
- MENDONZA DE GIVES, P.; FLORES-CRESPO, J.; HERRERA-RODRIGUES, D.; VASQUEZ PRATS, V.; LIEBANO-HERNANDEZ, E.; ONTIVEROS-FERNANDEZ, G.E. Biological control of *Haemonchus contortus* infective larvae in ovine faeces by administration of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to sheep. *J. Helmentol.*, **72**: 343-347, 1998.

- MENDONZA DE GIVES, P.; ZAVALETA-MIEJA HERRERA-RODRIGUES, D.; PERDOMO-ROLDAN, F. Interaction between the nematode-destroying fungus *Arthrobotrys robusta* (Hyphomycetales) and *Haemonchus contortus* infective larvae *in vitro*. *Vet. Parasitol.*, **41**: 101-107, 1992.
- MENDONZA DE GIVES, P.; ZAVALETA-MIEJA, E.; HERRERA-RODRIGUES, D.; QUIROZ-ROMERO, H. *In vitro* trapping capability of *Arthrobotrys* spp. on infective larvae of *Haemonchus contortus* and *Nacobbus aberrans*. *J. Helmentol.*, **68**: 223-229, 1994.
- MERYMAN, H.T.; WILLIAMS, R.J.; DOUGLAS, M. Freezing injury from solutions effects and its prevention by natural or artificial cryoprotection. *Cryobiol.*, **14**: 287-302, 1977.
- MORGAN-JONES, G.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R. In: Infections events in the fungus-nematode system. In: **Diseases of nematodes**. POINAR, O.G.; BORNE, J.H. Eds., CRC press, Boca Raton, USA, pp.59-62, 1988.
- MORRIS, G.J.; SMITH, D.; COULSON, G.E. A comparative study of the morphology of hyphae during freezing with the viability upon thawing of 20 species of fungi. *J. Gen. Microbiol.*, **134**: 2897-2906, 1988.
- MOTA, M.A.; BEVILAQUA, C.M.L.; ARAUJO, J.V. Atividade predatória de fungos *Arthrobotrys conoides* e *Monacrosporium thaumasium* sobre larvas infectantes de *Haemonchus contortus* de caprinos. *Ciênc. Animal*, **10**: 37-41, 2000.
- NANSEN, P.; GRØNVOLD, J.; HERIKSEN, S.A.; WOLSTRUP, J. Predaceous activity of the nematode-destroying fungus *Arthrobotrys oligospora* on preparasitic larvae of *Cooperia oncophora* and on soil nematodes. *Proceed. Nematol.*, **53**: 237-243, 1986.

- NANSEN, P.; FOLDAGER, J.; HANSEN, J.W.; HENRIKSEN, S.A.; JØRGENSEN, R.J.
Grazing and acquisition of *Ostertagia ostertagi* in calves. *Int. J. Parasitol.*, **27**: 325-335, 1988.
- NANSEN, P.; LARSEN, M.; ROEPSTORFF, A.; GRØNVOLD, J.; WOLSTRUP, J.;
HERIKSEN, S.A. Control of *Oesophagostomum dentatum* and *Hyostrogylus rubidus* in outdoor-reared pigs by daily feeding with microfungus *Duddingtonia flagrans*. *Parasitol. Res.*, **82**: 580-584, 1996.
- NIEZEN, J.H.; CHARLESTON, W.A.G.; HODGSON, J.; MACKAY, A.D.;
LEATHIWICK, D.M. Controlling internal parasites in grazing ruminants without recourse to anthelmintics: approaches, experiences and prospects. *Int. J. Parasitol.*, **26**: 983-992, 1996.
- NORDBRING-HERTZ, B; STÅLHAMMAR-CARLEMALM, M. Capture of nematode by *Arthrobotrys oligospora* an electron microscope study. *Can. J. Botan.*, **56**: 1297-1307, 1978.
- PANDEY, V.S. Predatory activity of nematode trapping fungi against the larvae of *Trichostrongylus axei* and *Ostertagia ostertagi*: a possible method of biological control. *J. Helminthol.*, **47**: 35-48, 1973.
- PEG, D.E.; DIAPER, M.P. The “unfrozen fraction” hypothesis of freezing injury: a critical examination of the evidence. *Cryobiol.*, **26**: 30-43, 1989.
- PERRY, B.D.; RANDOLPH, T.F. Improving the assessment of the economic impact of parasitic diseases and their control in production animals. *Vet. Parasitol.*, **84**: 145-168, 1999.
- PRAMER, D. Nematode trapping fungi. Science, 144: 382-388, 1964.**

- REINECKE, R.K. **Veterinary Helminthology**. Butterworth-Heinemann. Pretória, South-Africa. 392pp, 1983.
- REW, R.S. Production-based control of parasitic nematode of cattle. *Int. J. Parasitol.*, **29**: 177-182, 1999.
- ROBERTS, F.H.S.; O'SULLIVAN, J.P. Method for egg counts and larval cultures for stongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. *Aust. Agric. Rec.*, **1**: 99-102, 1950.
- ROSENWEIG, W.D. Role of aminoacids, peptides and medium composition in trap formation by nematode-trapping fungi. *Can. J. Microbiol.*, **30**: 265-267, 1983.
- ROUBAUD, E.; DESCAZEAUX, J. Action des *Hyphomycetes* prédateurs sur les larves de Synthétocauls et de Bunostomes. *Bullet. Soc. Pathol. Exotique*, **34**: 127-130, 1941a.
- ROUBAUD, E.; DESCAZEAUX, J. Essais relatifs à la prophylaxie de l'aguillulose du mouton par l'usage des Hyphomycètes prédateurs du sol. *Com. Rendus Seances de la Soc. Biol.*, **135**: 687-690, 1941b.
- RYAN, M.J.; SMITH, D.; JEFFRIES, P. A decision-based key to determine the most appropriate protocol for the preservation of fungi. *W. J. Microbiol. Biotechnol.*, **16**: 183-186, 2000.
- SANDSKÄR, B.; MAGALHÃES, B. Cryopreservation of *Zoophtora radicans* (Zygomycetes, Entomophthorales) in liquid nitrogen. *Cryobiol.*, **31**: 206-213, 1994.
- SANTOS, C.P.; CHARLES, T.P.; RODRIGUES, M.L.A. Atividade predatória de *Arthrobotrys oligospora* e *Duddingtonia flagrans* em estádios pré parasitários de ciatostomíneos em diferentes temperaturas. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, **4**: 113-117, 1995.
- SAXENA, G.; MITTAL, N. Trap formation by conidia of nematode-trapping *Monacrosporium* spp. *Mycol. Res.* **7**: 839-840, 1995.

- SAYRE, M.R.; STARR, P.M. *Pasteuria penetrans* (ex Thorne, 1940) nom. rev., a mycelial endospore forming bacterium parasitic in plant-parasitic nematodes. *Proceed. Helminthol. S. Washington*, **52**: 149-156, 1985.
- SAYRE, R.M.; WERGIN, W.P. *Theratomyxa weberi* that attacks free living and plant parasitic nematodes. *Nematologica*, **129**: 1091-1097, 1979.
- SHARMA, B.; SMITH, D. Recovery of fungi after storage for over a quarter of a century. *W. J. Microbiol. Biotechnol.*, **15**: 517-519, 1999.
- SMITH, D.; COULSON, G.E.; MORRIS, G.J. A comparative study of the morphology and viability of hyphae of *Penicillium expansum* and *Phytophthora nicotinae* during freezing and thawing. *J. Gen. Microbiol.*, **132**: 2013-2021, 1986.
- SMITH, D. ; ONIONS, A.H.S. **The preservation and maintenance of living fungi**. CAB International, Wallingford, United Kingdom, 122 pp., 1994.
- SMITH, D.; THOMAS, V.E. Cryogenic light microscopy and the development of cooling protocols for the cryopreservation of filamentous fungi. *W. J. Microbiol. Biotechnol.*, **14**: 49-57, 1998.
- STALPERS, J.A.; HOOG, de A.; VLUG, I.J. Improvement of the straw technique for the preservation of fungi in liquid nitrogen. *Mycologia*, 79: 82-89, 1987.**
- STIRLING, G.R. **Biological Control of Plant Parasitic Nematodes**. CAB International. Wallingford, United Kingdom. 282pp., 1991.
- STROMBERG, B.E. Enviromental factors influencing transmission. *Vet. Parasitol.*, **72**: 247-264, 1997.
- STROMBERG, B.E.; AVERBECK, G.A. The role of parasite epidemiology in the management of grazing cattle. *Int. J. Parasitol.*, **29**: 33-39, 1999.

- THAMSBORG, S.M.; POEPSTORFF, A.; LARSEN, M. Integrated and biological control of parasites in organic and conventional production systems. *Vet. Parasitol.*, **84**: 169-186, 1999.
- URQUHART, G.M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L. **Veterinary Parasitology**. Blackwell Science. London, United Kingdom, 307 pp., 1996.
- VAN OORSCHOT, C.A.N. Taxonomy of the *Dactylaria* complex. A review of *Arthrobotrys* and allied genera. *St. Mycol.* **26**: 61-95, 1985.
- VEEHNIUS, M.; NORDBRING-HERTZ, B.; HARDER, W. An electron microscopical analysis of capture and initial stages of penetration of nematodes by *Arthrobotrys oligospora*. *Antonie van Leeuwenhoek*, **51**: 385-398, 1985.
- VERCRUYSSSE, J. & DORNY, P. Integrated control of nematode infections in cattle: A reality? A need? A future? *Int. J. Parasitol.*, **29**: 165-175, 1999.**
- VIEIRA-BRESSAN, M.C.R.; GENARI, S.M.; ABDALLA, A.L. Body composition of calves infected with *Haemonchus placei* estimated by tritiated water technique. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, **1**: 17-21, 1992.
- WALLER, P.J.; FAEDO, M. The prospect for biological control of the free-living stages of nematode parasite of livestock. *Int. J. Parasitol.* **26**: 915-925, 1996.
- WALLER, P.J. International approaches to the concept of integrated control of nematode parasites of livestock. *Int. J. Parasitol.*, **29**: 155-164, 1999.
- WALLER, P.J.; LARSEN, M.; FAEDO, M.; HENNESSY, D.R. The potential of nematophagous fungi to control free-living stages of nematodes parasites of sheep: in vitro and in vivo studies. *Vet. Parasitol.* **51**: 289-299, 1994.

- WHARTON, D.A.; MURRAY, D.S. Carbohydrate/lectin interactions between the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora* and the infective juveniles of *Trichostrongylus colubrioformis* (Nematoda). *Parasitol.*, **101**: 101-106, 1990.
- WILLIAMS, J.C. Integrated control (international experiences). *Int. J. Parasitol.*, **29**: 183-184, 1999.
- WOLSTRUP, J.; GRØNVOLD, J.; HENRIKSEN, S.A.; NANSEN, P.; LARSEN, M. ; BØGH, O.; ILØE, B. An attempt to implement the nematode-destroying fungus *Duddingtonia flagrans* in biological control of trichostrongyle infections of first grazing calves. *J. Helmentol.*, **68**: 175-180, 1994.
- ZHANG, K.; LIU, X.; CAO, L. Nematophagous species of *Monacrosporium* from China. *Mycol. Res.*, **100**: 274-276, 1996b.
- ZHANG, K.; LIU, X.; CAO, L.; REN-HEN, G. A new species of *Arthrobotrys* from China. *Mycol. Res.*, **100**: 527-530, 1996a.
- ZOPF, W. Zur Kenntnis der Infections-Krankheiten niederer Thiere und Pflanzen. *Nova Acta Kaiserlichen Leopoldinischen-carolinischen Akademie der Naturforscher*, **52**: 314-376, 1888.

10. APÊNDICES

Tabela 10.1. Análise de variância do crescimento radial dos isolados *A. robusta* (I31) e *M. thaumasium* (NF34a) submetidos a diferentes processos de armazenamento, ao sexto dia de cultivo em superfície de ágar água 2%.

Fonte de Variação	Grau de Liberdade	QUADRADO MEDIO
Tratamento	9	3,5277***
Resíduo	90	0,00722***

*** Diferença significativa ($P < 0,001$), pelo teste F.
Coeficiente de Variação = 2,124

Tabela 10.2. Tabela do diâmetro médio das colônias (cm) dos isolados *A. robusta* (I31) e *M. thaumasium* (NF34a) submetidos a diferentes processos de armazenamento, ao sexto dia de cultivo em superfície de ágar água 2%. Média de dez repetições.

Fonte de Variação	Média Crescimento radial (cm)
NF34a 4°C	9,00 ^A
NF34a Glicerol	8,98 ^A
NF34a DMSO	8,96 ^A
NF34a Água	8,92 ^A
I31 4°C	8,16 ^B
I31 DMSO	8,00 ^B
I31 Sílica-gel	7,96 ^B
I31 Água	7,68 ^C
I31 Glicerol	7,26 ^D
NF34a Sílica-gel	5,12 ^E

Médias seguidas por pelo menos uma mesma letra, não diferem significativamente ($P < 0,05$), pelo teste de Tukey.

Tabela 10.3. Análise de variância das médias de produção massal (mg) dos isolados *A. robusta* (I31) e *M. thaumasium* (NF34a) submetidos a diferentes métodos de armazenamento, ao sétimo dia de cultivo em meio Batata Dextrose.

Fonte de Variação	Grau de Liberdade	QUADRADO MEDIO
Tratamento	9	0,0044 ^{***}
Resíduo	40	0,00031 ^{***}

*** Diferença significativa ($P < 0,001$), pelo teste F.

Coefficiente de Variação = 26,89

Tabela 10.4. Médias da produção massal (mg) dos *A. robusta* (I31) e *M. thaumasium* (NF34a) submetidos a diferentes métodos de armazenamento, ao sétimo dia de cultivo em meio Batata Dextrose. Média de cinco repetições.

Fonte de Variação	Média Massa (mg)
NF34a 4°C	0,106 ^A
I31 4°C	0,093 ^A
NF34a DMSO	0,085 ^A
I31 DMSO	0,078 ^{AB}
NF34a Glicerol	0,074 ^{AB}
I31 Glicerol	0,073 ^{AB}
I31 Sílica-gel	0,072 ^B
NF34a Sílica-gel	0,039 ^C
I31 Água	0,032 ^C
NF34a Água	0,011 ^D

Médias seguidas por pelo menos uma mesma letra, não diferem significativamente ($P < 0,01$), pelo teste de Tukey.

Tabela 10.5. Análise de variância das médias de produção esporos dos isolados *A. robusta* (I31) e *M. thaumasium* (NF34a) submetidos a diferentes métodos de armazenamento, após dez dias de cultivo em superfície de AELA.

Fonte de Variação	Grau de Liberdade	QUADRADO MEDIO
Tratamento	9	1,7014***
Resíduo	40	0,038093***

*** Diferença significativa ($P < 0,001$), pelo teste F.

Coefficiente de Variação = 2,68

Tabela 10.6. Médias da produção de esporos dos isolados *A. robusta* (I31) e *M. thaumasium* (NF34a) submetidos a diferentes métodos de preservação, cultivo em superfície de AELA. Média de cinco repetições.

Fonte de Variação	Média Esporos
I31 4°C	167,20 ^A
I31 DMSO	66,60 ^{AB}
I31 Glicerol	57,10 ^B
I31 Sílica-gel	42,70 ^C
I31 Água	28,00 ^C
NF34a 4°C	1,28 ^D
NF34a DMSO	0,92 ^D
NF34a Glicerol	0,76 ^D
NF34a Sílica-gel	0,45 ^E
NF34a Água	0,38 ^E

Médias seguidas por pelo menos uma mesma letra, não diferem significativamente ($P < 0,05$), pelo teste de Tukey.

Tabela 10.7. Análise de variância das médias dos números de larvas mistas de nematóides parasitos gastrintestinais recuperadas pelo método de Baermann após sete dias de predação em superfície de ágar água 2%, por *A. robusta* (I31) e *M. thaumasium* (NF34a) submetidos a diferentes processos de preservação.

Fonte de Variação	Grau de Liberdade	QUADRADO MEDIO
Tratamento	10	43508,19***
Resíduo	44	868,249***

*** Diferença significativa ($P < 0,001$), pelo teste F.
Coeficiente de Variação = 30,30

Tabela 10.8. Médias dos números de larvas mistas de nematóides parasitos gastrintestinais recuperadas pelo método de Baermann após sete dias de predação em superfície de ágar água 2%, por *A. robusta* (I31) e *M. thaumasium* (NF34a) submetidos a diferentes processos de preservação. Média de cinco repetições.

Fonte de Variação	Média Larvas
NF34a 4°C	26,64 ^A
I31 4°C	39,26 ^B
NF34a DMSO	26,64 ^A
I31 DMSO	46,62 ^B
NF34a Glicerol	53,28 ^C
I31 Glicerol	73,28 ^C
I31 Sílica-gel	113,32 ^D
NF34a Sílica-gel	99,32 ^D
I31 Água	126,64 ^D
NF34a Água	113,32 ^D
Controle	356,66 ^E

Médias seguidas por pelo menos uma mesma letra, não diferem significativamente ($P < 0,05$), pelo teste de Tukey.

Tabela 10.9. Análise de variância dos Percentuais de redução de nematóides parasitos gastrintestinais predados por *A. robusta* (I31) e *M. thaumasium* (NF34a), submetidos a diferentes métodos de preservação, após a passagem pelo trato gastrintestinal de bovinos.

Fonte de Variação	Grau de Liberdade	QUADRADO MEDIO
Total	149	0,0520***
Total de Redução	45	0,9508
Fungo	1	0,2262***
Tratamento	2	0,0066***
Resíduo A	16	0,1079***
Tempo	4	0,0076***
Tempo x Tratamento	8	0,0160***
Tempo x Fungo	4	0,0865***
Tratamento x Fungo	2	0,0127***
Tratamento x Tempo x Fungo	8	0,0080
Resíduo B	104	

*** Diferença significativa ($P < 0,001$), pelo teste F.

Coefficiente de Variação = 15,232

Tabela 10.10. Percentuais médios de redução de nematóides parasitos gastrintestinais de bovinos, por *A. robusta* (I31) e *M. thaumasium* (NF34a) submetidos a diferentes métodos de preservação. Média de cinco repetições.

Fungo	TRATAMENTOS				
	T12	T18	T24	T48	T72
NF34a 4° C	0,673 ^{Aa}	0,808 ^{Ab}	0,813 ^{Ab}	0,803 ^{Ab}	0,758 ^{Aa}
NF34a sílica-gel	0,542 ^{Ba}	0,566 ^{Ba}	0,697 ^{Bb}	0,585 ^{Ba}	0,621 ^{Ba}
NF34a congelado	0,515 ^{Ba}	0,634 ^{Bb}	0,732 ^{Bb}	0,689 ^{Bb}	0,610 ^{Bc}
I31 4° C	0,512 ^{Ca}	0,478 ^{Ca}	0,651 ^{Cb}	0,449 ^{Da}	0,574 ^{Cc}
I31 sílica-gel	0,376 ^{Da}	0,341 ^{Da}	0,577 ^{Db}	0,504 ^{Db}	0,376 ^{Da}
I31 congelado	0,526 ^{Ca}	0,512 ^{Ca}	0,629 ^{Cb}	0,594 ^{Ca}	0,556 ^{Ca}

Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem numa mesma coluna e médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem numa mesma linha estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05).