

MANOEL EDUARDO DA SILVA

CONTROLE BIOLÓGICO DE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS EM BOVINOS: AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS FUNGOS PREDADORES *Duddingtonia flagrans* E *Monacrosporium thaumasium* PRODUZIDOS EM SISTEMA BIFÁSICO E FORMULADOS EM MATRIZ DE ALGINATO DE SÓDIO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S586c
2014
Silva, Manoel Eduardo da, 1969-
Controle biológico de nematóides gastrintestinais em
bovinos : avaliação da eficácia dos fungos predadores
Duddingtonia flagrans e *Monacrosporium thaumasium*
produzidos em sistema bifásico e formulados em matriz de
alginato de sódio / Manoel Eduardo da Silva. – Viçosa, MG,
2014.

xi, 120f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Jackson Victor de Araújo.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Ruminantes - Doenças. 2. Fungos nematófagos.
3. Parasito. 4. *Duddingtonia flagrans*. 5. *Monacrosporium
thaumasium*. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Veterinária. Doutorado em Medicina Veterinária. II. Título.

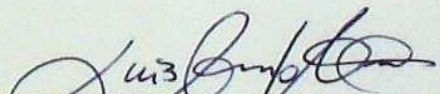
CDD 22. ed. 636.2

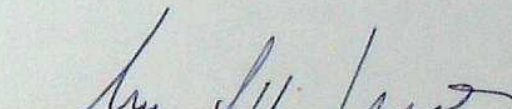
MANOEL EDUARDO DA SILVA

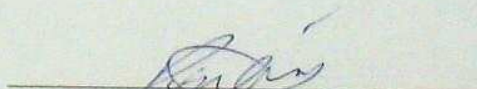
CONTROLE BIOLÓGICO DE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS EM BOVINOS: AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS FUNGOS PREDADORES *Duddingtonia flagrans* E *Monacrosporium thaumasium* PRODUZIDOS EM SISTEMA BIFÁSICO E FORMULADOS EM MATRIZ DE ALGINATO DE SÓDIO

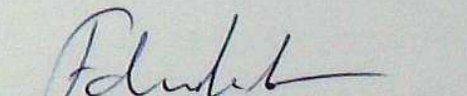
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

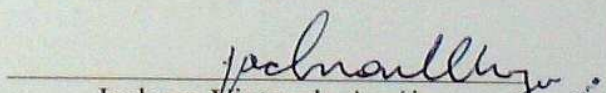
APROVADA: 24 de fevereiro de 2014.


Luis Augusto Nero


Marcos Pezzi Guimarães


Rogério Oliva Carvalho


Fábio Ribeiro Braga
(Coorientador)


Jackson Victor de Araújo
(Orientador)

DEDICATÓRIA

À Jesiane, Victor e Gabriel, as pessoas que mais amo!

Epitáfio (Titãs)

Devia ter amado mais
Ter chorado mais
Ter visto o sol nascer
Devia ter arriscado mais
E até errado mais
Ter feito o que eu queria fazer...
Queria ter aceitado
As pessoas como elas são
Cada um sabe a alegria
E a dor que traz no coração...
O acaso vai me proteger
Enquanto eu andar distraído
O acaso vai me proteger
Enquanto eu andar...
Devia ter complicado menos
Trabalhado menos
Ter visto o sol se pôr
Devia ter me importado menos
Com problemas pequenos
Ter morrido de amor...
Queria ter aceitado
A vida como ela é
A cada um cabe alegrias
E a tristeza que vier...
O acaso vai me proteger
Enquanto eu andar distraído
O acaso vai me proteger
Enquanto eu andar...
Devia ter complicado menos
Trabalhado menos
Ter visto o sol se pôr...

AGRADECIMENTOS

À DEUS pelo dom da vida.

À minha família, em especial a minha esposa Jesiane que acreditou e apoiou-me, abdicando em muitos momentos dos seus sonhos para realização dos meus.

À Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG, em especial ao Instituto Técnico de Agropecuária e Cooperativismo - ITAC e à Fazenda Experimental de Pitangui - FEPI por ter permitido que eu realizasse a pós-graduação.

À Universidade Federal de Viçosa – UFV, em especial ao Departamento de Medicina Veterinária, por ter me recebido e permitido que eu realizasse mais essa importante etapa em minha vida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG pela concessão da bolsa de estudos e pelo suporte financeiro na realização do projeto de pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão da bolsa para realização do estágio de doutorado, modalidade sanduíche.

Ao Professor Jackson Victor de Araújo, pela orientação e ensino durante esta jornada.

Ao Professor Walter dos Santos Lima, por todo apoio que me motivou a trilhar este caminho.

Ao Dr. Pedro Mendoza de Gives e a Dra. Maria Eugênia López-Arellano pela recepção, acolhida no Instituto Nacional de Investigaciones Agrofloreales y Pecuaria – INIFAP (México), atenção e ensinamentos dispensados durante a realização do estágio de doutorado.

Ao Professor Fabio Ribeiro Braga pelo apoio e orientação na realização deste trabalho.

Aos Professores da UFV que de forma única contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Paulo Oliveira, estatístico da EPAMIG, por todo apoio na realização e interpretação das análises estatísticas.

Aos amigos do Laboratório de Parasitologia do DVT/UFV: Fernanda, Sebastião, Rafaela, Anderson, Juliana, André, Wendeo, Ingrid, Alexandre, Rogério, Laiane, Vinícius, Luana, Laurendane, Alessandra, Filipe e Guedes pelo prazer da convivência e troca de experiências. Em especial ao José Geraldo de Oliveira (Tuim) e Ademir Alves pela inestimável prestação em todos os momentos de convivência.

Às secretárias do Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária Rosinéia Aparecida da Cunha Andrade (Rosi) e Beth por todo auxílio, paciência e compreensão

durante essa jornada.

Aos demais amigos da Pós Graduação e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária da UFV pelo companheirismo e amizade.

Aos amigos do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG: Eveline, Lanuzze, Ruth, Rosália, Aytube, Vinícius, Ananda e Camila.

Aos amigos do Departamento de Helmintologia do INIFAP: Miguel, Iván, Marilem, Saraí, Silvina, Angel, Diego, Júlia, Suzane, Rosalia, Jair, Gabriel, Ricardo, Mario, Wendy, Jennifer, Noemi, Lucero, Dra. Liliana, Dr. Henrique (*in memória*) e Dr. Juan Alberto.

Aos amigos da Fazenda Experimental Santa Rita, em especial ao Dr. Daniel Sobreira Rodrigues (Ceará) e Leonardo.

Aos amigos da Fazenda Experimental de Acauã, Thiago, Dalton e em especial ao Jair Mendes, pelo apoio incontestável durante a realização do experimento de campo.

Aos demais amigos da EPAMIG por toda colaboração na realização deste trabalho.

Aos amigos da Fazenda Terra Branca, em especial ao Marquinho, Diogo e aos proprietários Srs. Antônio Roque e Agostinho por toda colaboração e paciência durante a realização do experimento.

BIOGRAFIA

Manoel Eduardo da Silva, filho de Manoel Pereira da Silva e Hilda Brasilino da Silva, nascido em João Pinheiro, Minas Gerais, no dia 05 de fevereiro de 1969 concluiu a graduação em Medicina Veterinária pela Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais - EV/UFMG no ano de 1996, especializou-se em Produção de Ruminantes pela Universidade Federal de Lavras - UFLA no ano de 1998 e no ano de 2007 obteve o título de Mestre em Medicina Veterinária Preventiva pela Escola de Veterinária – EV/UFMG.

SUMÁRIO

Lista de figuras	viii
Lista de tabelas	ix
Resumo	x
Abstract	xi
1. Introdução	1
2. Revisão de Literatura	3
3. Objetivos.....	8
3.1. Objetivos gerais	8
3.2. Objetivos específicos	8
4. Referências Bibliográficas	9
5. Capítulo 1 – Mycelial mass production of fungi <i>Duddingtonia flagrans</i> and <i>Monacrosporium thaumasium</i> under different culture conditions	15
6. Capítulo 2 – Producción de conidios y clamidosporas de los hongos <i>Duddingtonia flagrans</i> y <i>Monacrosporium thaumasium</i> en diferentes médios sólidos	26
7. Capítulo 3 – Control of infective larvae of gastrointestinal nematodes of heifers by isolates of the nematophagous fungi	39
8. Capítulo 4 – Evaluation of the effectiveness of <i>Duddingtonia flagrans</i> and <i>Monacrosporium thaumasium</i> in the biological control of gastrointestinal nematodes in female bovines bred in the semiarid region	54
9. Considerações finais	69
10. Anexos	70

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 3

Fig. 1a–d - Infective larvae captured by nematophagous fungi [*Duddingtonia flagrans* (AC001 and CG722) and *Monacrosporium thaumasium* (NF34)] in Petri dishes containing 2% water–agar, and trap formation by the fungal isolates 51

Fig. 2 - Mean reduction percentage of nematode infective larvae (L₃) recovered from coprocultures by the Baermann method after 17 days of incubation with the fungal isolates *Duddingtonia flagrans* (AC001 or CG722) and *Monacrosporium thaumasium* (NF34) at the time intervals of 12, 15, 18, 21, 24, 48 and 72 hours 52

Fig. 3 - Mean number of infective larvae (L₃) recovered by the Baermann method from coprocultures after 17 days of treatment with the fungal isolates *Duddingtonia flagrans* (AC001 or CG722), *Monacrosporium thaumasium* (NF34) and the control group (without fungi) 53

Capítulo 4

Figure 1 - Temperature (maximum and minimum) and rainfall climatological data observed during the experimental evaluation of different fungal isolates and doses administered to female prepubescent cattle under grazing conditions in a semi-arid region 64

LISTA DE TABELAS

Capitulo 1

Table 1 - Mycelial mass production of the fungi <i>D. flagrans</i> and <i>M. thaumasium</i> under different culture conditions	21
---	----

Capitulo 2

Tabla 1 - Promedio de esporas producidas por diferentes aislados fúngicos en diferentes medios sólidos de cultivo después de 7 días de incubación a 26.5°C ..	37
Tabla 2 - Promedios de esporas recuperadas después de la incubación de diferentes aislados fúngicos en diferentes medios sólidos de cultivo después de siete días de incubación	38

Capitulo 4

Table 01 - Average and standard deviation of the number of eggs per gram of faeces (EPG), counted on female bovines after receiving different doses of the fungal isolates of <i>D. flagrans</i> (AC001) and <i>M. thaumasium</i> (NF34A)	65
Table 02 - Average weight and standard deviation of female bovines (kg) observed after the administration of different doses of the fungal isolates of <i>D. flagrans</i> (AC001) and <i>M. thaumasium</i> (NF34A)	66
Table 03 - Average and standard deviation of the number of larvae per gram of faeces (LPG) recovered after administration of different doses of the fungal isolates of <i>D. flagrans</i> (AC001) and <i>M. thaumasium</i> (NF34A)	67
Table 04 Average and standard deviation of the number of trichostrongylids larvae recovered per kg / MS after administration of different doses of the fungal isolates <i>D. flagrans</i> (AC001) and <i>M. thaumasium</i> (NF34A)	68

RESUMO

SILVA, Manoel Eduardo da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa; fevereiro de 2014; **Controle biológico de nematóides gastrintestinais em bovinos: avaliação da eficácia dos fungos predadores *Duddingtonia flagrans* e *Monacrosporium thaumasium* produzidos em sistema bifásico e formulados em matriz de alginato de sódio.** Orientador: Jackson Victor de Araújo. Co-orientador: Fábio Ribeiro Braga.

O Brasil possui aproximadamente 212 milhões de bovinos criados em 171 milhões de hectares de pastagens responsáveis por produzir aproximadamente 96% da carne bovina brasileira; esse sistema favorece a infecção dos animais por endoparasitos controlados pela administração de drogas antiparasitárias. As espécies *D. flagrans* e *M. thaumasium* são alternativas promissoras e sustentáveis para o controle das helmintoses gastrointestinais de ruminantes e outros herbívoros, no entanto, a sua produção em larga escala ainda é um dos principais desafios. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de massa micelial e de esporos dos fungos *D. flagrans* e *M. thaumasium* em sistema bifásico (líquido/sólido) de produção e o efeito dos isolados formulados em matriz de alginato de sódio na redução de larvas infectantes de nematoides gastrintestinais após passagem pelo trato gastrintestinal em fêmeas bovinas no teste “*in vitro*” assim como avaliar a redução ambiental de L₃ no teste a campo em região semi-árida. Os meios líquidos de cultivo soja dextrose (SD) e quirera de milho (QM) com valores de pH entre 6,0 e 7,0 se apresentaram como potenciais para produção de biomassa e os subprodutos da agroindústria com maior densidade proteica e energética foram mais eficientes para produção de esporos. No teste “*in vitro*” os isolados fúngicos apresentaram maior atividade predatória 72 horas após o trânsito gastrintestinal e no teste a campo o uso de péletes de alginato sódio como veículo de micélio fúngico se mostrou eficiente no controle de tricostrongilídeos com redução efetiva do número de larvas infectantes nas pastagens.

ABSTRACT

SILVA, Manoel Eduardo da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa; February, 2014; **Biological control of gastrointestinal nematodes in cattle: evaluation of the effectiveness of predators fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* produced in a biphasic system and formulated in sodium alginate matrix.** Adviser: Jackson Victor de Araújo. Co-adviser: Fábio Ribeiro Braga.

Brazil has approximately 212 million cattle raised on 171 million hectares of pastures responsible for producing approximately 96% of Brazilian beef. This system favors the infection of animals for endoparasites, controlled by the administration of antiparasitic drugs. The species *D. flagrans* and *M. thaumasium* are promising and sustainable alternatives for the control of gastrointestinal helminths of ruminants and other herbivores, however, its large-scale production is still a major challenge. The objective of this study was to evaluate the production of mycelial mass and spores of the *D. flagrans* and *M. thaumasium*, in biphasic system of production (liquid/solid) and the effect of the isolated formulated in sodium alginate matrix, in the reduction of the gastrointestinal nematode after passage through gastrointestinal tract of female cattle. The test was realized "*in vitro*" and in semi-arid field to evaluate the environmental reduction of the L₃. Liquid culture media soybean dextrose (SD) and corn grits (QM) with pH values between 6.0 and 7.0 are presented as potential for biomass production and agribusiness byproducts with higher protein and energy density were more efficient in the production of spores. "*In vitro*" test the fungal isolates showed higher predatory activity 72 hours after gastrointestinal transit and in the field test with use of the pellets of sodium alginate as carrier of fungal mycelium was efficient in controlling trichostrongylids thus reducing the number of larvae infective in pasture.

1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura é um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial. O Brasil possui o segundo maior efetivo bovino do mundo, com cerca de 200 milhões de cabeças e desde 2004 é o maior exportador mundial de carne bovina com um quinto do volume comercializado internacionalmente e vendas a mais de 180 países (ABIEC, 2013).

O país é um grande produtor de proteína animal e tem no mercado interno o principal destino de sua produção com um consumo *per capita* de 37,4 kg de carne bovina, 43,9 kg de carne de aves e 14,1 kg de carne suína, refletindo o bom desempenho da economia brasileira. Considerando a produção de carnes bovina, suína e de aves, estimada em 24,5 milhões de toneladas no ano de 2010, temos que 75% dessa produção foi consumido internamente. Assim como as principais carnes produzidas, as carnes ovina e caprina e a produção de leite e seus derivados, são consumidos majoritariamente no mercado interno brasileiro (IBGE, 2013).

A participação brasileira no comércio internacional apresenta índices de crescimento anuais, com destaque para a carne bovina, de frango e suína. Segundo dados do Ministério da Agricultura, até 2020, a expectativa é que o país suprirá 44,5% do mercado mundial de carne bovina, 48,1% de carne de frango e 14,2% de carne suína, indicando que o Brasil poderá manter a posição de primeiro exportador mundial de carnes bovina e de frango (MAPA, 2013).

O rebanho bovino brasileiro proporciona o desenvolvimento de dois segmentos lucrativos: as cadeias produtivas da carne e leite. O valor bruto da produção desses dois segmentos, estimado em R\$ 67 bilhões anuais, aliado a presença da atividade em todos os estados brasileiros, evidenciam a importância econômica e social da bovinocultura em nosso país. O clima tropical e a extensão territorial do Brasil favorecem a obtenção deste resultado, uma vez que permitem a criação da maioria do gado em pastagens. Somado a esses fatores, o investimento em tecnologia e capacitação profissional, o desenvolvimento de políticas públicas, a segurança alimentar dos produtos ofertados e o controle da sanidade do rebanho, contribuem para que o país atenda às exigências de rigorosos mercados e conquiste mais espaço no cenário mundial (ANUALPEC, 2013).

A saúde animal, numa visão ampliada, envolve questões relacionadas a enfermidades dos animais, saúde pública e controle dos riscos em toda a cadeia alimentar, assegurando a oferta de alimentos seguros e bem estar animal. Para assegurar a saúde animal, é necessária a existência de serviços veterinários bem estruturados,

capacitados e aptos para detecção e adoção precoce das medidas de controle e erradicação das doenças. Em sintonia com a Organização Mundial de Saúde Animal – OIE, que reconhece o serviço veterinário como um bem público mundial, o serviço veterinário brasileiro, responsável pela condução da política de saúde animal, compartilha com o setor privado as responsabilidades para aplicação das medidas que objetivam a melhoria da saúde animal (MAPA, 2013).

Segundo dados da FAO (2013) 20% das perdas em produtividade animal são devidas às doenças infectocontagiosas e dentre elas as parasitoses ocupam lugar de destaque. Os parasitos internos e externos são considerados as principais causas de perdas econômicas na América Latina e em outras regiões tropicais e subtropicais do mundo (Molento et al., 2013).

O desenvolvimento de antiparasitários (acaricidas, inseticidas e anti-helmínticos) de grande eficácia, amplo espectro de ação e poder residual, permitiu ao produtor acesso a uma ferramenta de controle prática e adaptável a diferentes sistemas de produção. Estas características aliadas a diminuição de toxicidade dos modernos quimioterápicos criaram um falso sentido de segurança no produtor, que substituiu o diagnóstico e a consultoria Médico Veterinária por quase exclusiva utilização de fármacos. Lamentavelmente o uso indiscriminado das bases químicas permite a seleção de cepas parasitárias resistente aos quimioterápicos e o progressivo avanço da resistência no âmbito mundial tem demonstrado que os antiparasitários são recursos necessários, porém não renováveis, na medida em que cepas resistentes continuam expandindo-se e persistem nas diversos sistemas de produção (FAO, 2013).

A produção animal é dependente dos fármacos para profilaxia e/ou terapia individual ou de rebanho visando assegurar a produtividade. A presença de resíduos nos produtos de origem animal (substância ativa ou seus metabólitos) decorrente do uso inadequado dos pesticidas, parasiticidas ou outros produtos veterinários determina uma adulteração dos alimentos e tem sido assunto de grande relevância no mundo moderno que tem priorizado os alimentos de qualidade como base de práticas alimentares promotoras da saúde (Padilha, 1996; Balán et al., 2008).

Os atuais compostos endectocidas são eficientes contra endo e ectoparasitas, mas seus resíduos fecais e metabólitos, determinados pela dosagem, solvente e a rota de administração aumentam grandemente os riscos associados a persistência, a potência e a ecotoxicidade (Herd, 1996; Balán et al., 2008).

Considerando que parte do ciclo de vida dos nematoides se passa no ambiente,

medidas alternativas que possam auxiliar no controle de suas formas infectantes são constante objeto de estudo de pesquisadores em todo mundo; dentre essas medidas merece destaque o controle biológico realizado com fungos nematófagos. Como regra de manutenção dos sistemas biológicos, toda população é regulada por antagonistas. Na ausência de controladores naturais, a população de um determinado organismo poderia aumentar indiscriminadamente. Esse processo ocorre naturalmente e não é dependente da interferência do homem (Gronvold et al., 1996).

O controle biológico concentra sua ação sobre estágios de vida livre, vetores, hospedeiros intermediários e paratênicos, mas não sobre estágios parasitários. A diminuição da fonte de infecção para os hospedeiros finais com o uso dos fungos nematófagos causa menos efeitos negativos no ambiente, nos animais e em seus produtos que os métodos químicos tradicionais (Gronvold et al., 1996; Araújo et al., 2006).

2. REVISÃO DE LITERATURA

Durante o desenvolvimento no meio ambiente, os ovos e estádios larvares dos nematóides gastrintestinais são submetidos ao efeito de fatores abióticos (temperatura, umidade e tensão de oxigênio) e bióticos (fauna e flora coprófila) (Lopez-Llorca et al., 2008). Para que haja continuidade do ciclo biológico, os estádios de vida livre necessitam superar as barreiras causadas por esses fatores que influenciam seu desenvolvimento (Waller e Larsen, 1993).

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

Diferentes microrganismos como protozoários, turbelários, tartígrados, oligoquetas, insetos, ácaros, nematóides, vírus e bactérias têm sido relatados como antagonistas de nematóides e os utilizam como fontes de nutrientes (Mankau, 1980; Lysek e Nigenda, 1989; Stirling, 1991; Waller e Larsen, 1993; Gronvold et al., 1996).

Embora Jansson e Poinar (1986) tenham relatado o encontro no México de uma peça de âmbar de milhões de anos, contendo um fungo predador parasitando o nematóide *Oligaphelenchoides atrebora*, a primeira descrição de um fungo predando nematóides foi feita em 1888 por Zopf (Gray, 1987; Lopez-Llorca et al., 2008).

Os fungos nematófagos são antagonistas dos nematóides presentes no ambiente, podendo ser isolados do solo (Dias et al., 1995), fezes frescas coletadas diretamente do reto de animais (Manuelli et al., 1999) ou bolos fecais em decomposição (Mahoney e Strongman, 1994; Saumell e Padilha, 2000), apresentando grande potencial para o biocontrole de parasitas de plantas e animais (Stirling e Smith, 1998; Araujo, 1999).

Diversos estudos com uso de fungos nematófagos como controladores biológicos têm demonstrado que este é um método promissor no controle de nematóides gastrintestinais de animais domésticos (Larsen, 2000; Araújo et al., 2004a). Estes microorganismos, de acordo com seu modo de ação, são classificados em oportunistas (parasitas de ovos), endoparasitas, produtores de metabólitos tóxicos aos nematóides e predadores (Lopez-Llorca et al., 2008).

Algumas espécies de fungos como os do gênero *Pleurotus* liberam nematotoxinas capazes de destruir os nematoides (Nordbring-Hertz, 1988; Barron e Thorn, 1987). Estas toxinas são produzidas por células secretoras encontradas em intervalos ao longo das hifas e são capazes de imobilizar os nematóides, outras espécies fúngicas destroem os nematoides por produção de metabólitos com efeitos ovicidas (Waller e Faedo, 1993).

Os fungos com ação ovicida produzem também hifas que se fixam aos ovos, formando uma dilatação no ponto de interação que danifica a casca do ovo, provavelmente através da ação de enzimas, facilitando a penetração. Posteriormente, o fungo forma ramos de micélio no interior do ovo, consumindo o embrião. Hifas endógenas emergem do ovo e produzem conidióforos repletos de conídios (Morgan Jones e Rodriguez Cabana, 1988).

O grupo dos endoparasitos infecta os nematóides através de seus esporos. A infecção pode ocorrer pela adesão à cutícula do nematóide ou através da ingestão do esporo que germina, cresce e se difunde pela cavidade corpórea do nematóide, absorvendo seu conteúdo. Estes fungos, com poucas exceções, são parasitos obrigatórios, de difícil cultivo “*in vitro*” e, portanto, pouco práticos para serem utilizados em programas de controle biológico de nematóides (Lohmann e Sikora, 1989; Waller e Larsen, 1993).

A maioria das espécies fúngicas nematófagas está classificada como fungos predadores. Estes são organismos saprófitas mundialmente estudados e sua atividade predatória é direcionada para o ambiente fecal onde estão presentes ovos e larvas. Produzem um extenso sistema de hifas e ao longo delas, armadilhas que capturam os

nematóides (Lopez-Llorca e Robertson, 1992; Larsen, 1999; Araújo et al., 2008).

Segundo Gray (1987) são conhecidos seis tipos de armadilhas:

- a. hifas adesivas não modificadas ou não diferenciadas;
- b. ramificações hifais anastomosadas formando redes tridimensionais;
- c. ramificações adesivas, que formam redes simples ou bidimensionais;
- d. nódulos adesivos;
- e. anéis constritores;
- f. anéis não constritores.

Este grupo tem sido amplamente estudado no controle biológico dos helmintos gastrintestinais, em condições laboratoriais e a campo (Barron, 1977; Mankau, 1980; Larsen, 1999; Braga et al., 2009; Braga et al., 2010) mas possuem grande variação na capacidade predatória sobre nematóides, são os mais frequentemente isolados e apresentam facilidades de cultivo em laboratório e maior potencial de comercialização (Araújo, 1999) se comportando como antagonistas naturais promovendo a captura e destruição do parasito. A maioria dos estudos têm se concentrado em espécies dos gêneros *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* e *Monacrosporium* (Larsen, 2000).

2.1 - Antecedentes

A principal medida de controle dos nematoides gastrointestinais é o uso regular de anti-helmínticos (Molento et al., 2005; Mendoza-de-Gives e Torres-Acosta, 2012). Entretanto esta medida é muito impactante para o ambiente pois remove apenas parte da população dos nematoides uma vez que a grande maioria está presente no ambiente em diversos ínstares parasitários (ovos e estádios larvais), dependendo da espécie de nematoide (Wagner e Polley, 1999). Existe também uma preocupação crescente com a seleção de estirpes parasitárias resistentes às drogas antihelmínticas, que tem se tornado um grande empecilho à criação animal (Larsen, 2006) e com os resíduos dos quimioterápicos presentes nos produtos de origem animal (Mendoza-de-Gives e Torres-Acosta, 2012).

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

A formação dos diferentes tipos de armadilhas podem ser em resposta a estímulos provocados pelos movimentos dos nematóides (Jansson e Nordbring-Hertz,

1980), substâncias excretadas pelos parasitos (Nordbring-Hertz, 1988), escassez de água e nutrientes (Balan e Gerber, 1972) ou espontaneamente em algumas espécies de fungos (Araújo et al., 1992).

O processo de captura dos nematóides pelos fungos, inicia-se com a atração dos nematóides pelas armadilhas, ou substâncias orgânicas e inorgânicas como o CO₂ (Barron, 1977) e ácido siálico (Jansson e Nordbring-Hertz, 1984) seguida da apreensão nas armadilhas. Após a apreensão a cutícula do nematóide é lesada e penetrada por um bulbo, ocorrendo então sua destruição e seu conteúdo absorvido pelo fungo (Drechsler, 1937).

Os mecanismos de adesão e destruição não estão bem caracterizados em interações de fungos e nematóides parasitos de animais domésticos, sendo esta caracterização de grande importância; podendo afetar substancialmente a habilidade de um fungo capturar nematóides e implicar na seleção do isolado fúngico a ser utilizado em programas de controle biológico (Mendoza-de-Gives et al., 1999).

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

O desenvolvimento de processos de produção e de formulações fúngicas economicamente viáveis e de fácil aplicação é outro grande desafio na implementação dos fungos nematófagos em programas de controle biológico e um dos passos necessários para o emprego desta forma de controle tornar-se uma realidade prática no controle integrado de nematóides parasitos, porém, dificuldades técnicas no cultivo de alguns fungos nematófagos, têm prejudicado as pesquisas sobre as potencialidades destes microorganismos (Van Gundy, 1985).

Os conídios e clamidósporos são produzidos em cultivos fúngicos realizados em substratos sólidos como grãos e farelos de cereais, bagaço de cana, casca de café e esterco bovino (Dias e Ferraz, 1993; Machado e Campos, 1997). Mas estes sistemas apresentam limitações como alterações bioquímicas sofridas pelos grãos, problemas com contaminação após longo período de incubação tornando-os muitas vezes inviáveis comercialmente e difíceis de adaptar a produção em escala industrial (Santúrio et al., 2011).

Papavizas et al. (1984), consideraram a produção de massa fúngica em meios líquidos como a melhor forma de se produzir micélio e conídios de organismos para o controle biológico. Waller (1996) sugeriu que esta forma de produção poderia facilitar a formulação e administração desses microorganismos, se adaptando melhor aos sistemas de produção em larga escala.

Uma alternativa para veiculação e administração de fungos à herbívoros tem sido o alginato de sódio (Walker e Connick, 1983; Melo e Sanhueza, 1995; Araújo, 1999; Assis et al., 2012). Segundo Lewis e Papavizas (1987), esta tecnologia seria apropriada para veiculação de agentes de biocontrole, reduzindo a população dos patógenos e estimulando a proliferação dos antagonistas.

No Brasil, bons resultados em condições laboratoriais e a campo (Alves et al., 2003; Araújo et al., 2004b; Vilela et al., 2013; Assis et al., 2013) têm sido obtidos com esta formulação, onde foi observada a sobrevivência dos fungos nos péletes à temperatura de 4°C por até 40 meses, e à temperatura ambiente por aproximadamente 4 meses (Stirling e Mani, 1995), o que torna esta formulação bastante promissora.

Outras metodologias para administração de material fúngico incorporado em suplementos minerais (Waller e Faedo, 1996), em dispositivos intra-ruminais para liberação controlada de clamidósporos (Waller et al., 2001) ou em péletes multinutricionais (Casillas-Aguilar et al., 2008) tem sido estudadas e apresentam resultados promissores em formulações contendo clamidósporos de *D. flagrans*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

1. Avaliar sistemas de produção de micélio e esporos de fungos predadores das espécies *Duddingtonia flagrans* (CG 722 e AC001) e *Monacrosporium thaumasium* (NF34A) em diferentes composições de meios líquidos e substratos sólidos em sistema bifásico (líquido/sólido);
2. Avaliar a formulação dos fungos *Duddingtonia flagrans* e *Monacrosporium thaumasium* em matriz de alginato de sódio após produção bifásica, no controle biológico de nematóides gastrintestinais de bovinos em clima semiárido.

3.2. Objetivos específicos

1. Padronizar metodologia de cultivo de massa micelial em sistemas líquidos;
2. Padronizar metodologia de cultivo de esporos (conídios e clamidósporos) em sistemas sólidos;
3. Determinação do melhor sistema de produção bifásica;
4. Avaliar o desenvolvimento ponderal dos animais submetidos aos diferentes controladores biológicos;
5. Quantificar o número de ovos por grama de fezes (OPG) eliminado pelos animais;
6. Recuperar e identificar as larvas infectantes nas pastagens;
7. Qualificar os gêneros de larvas e helmintos existentes nos animais;
8. Determinar a eficácia dos isolados fúngico no controle das helmintoses gastrintestinais em animais criados em clima semiárido;
9. Validar o método de cultivo fúngico para o controle das helmintoses gastrintestinais de bovinos.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, P.H.; Araújo, J.V.; Guimarães, M.P.; Assis, R.C.L.; Sarti, P.; Campos, A.K. (2003) Aplicação de formulação do fungo predador de nematóides *Monacrosporium thaumasium* (Drechsler, 1937) no controle de nematóides de bovinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 55:568-573.
- Anuário Estatístico da Produção Animal – ANUALPEC (2013) São Paulo: FNP-Consultoria & Comércio.
- Araújo, J.V.; Santos, M.A.; Ferraz, S.; Maia, A.S.; Magalhães, A.C.M. (1992) Controle de larvas infectantes de *Haemonchus placei* por fungos predadores da espécie *Monacrosporium ellypsosporum* em condições de laboratório. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 44:521-526.
- Araújo, J.V. (1999) Controle de nematóides parasitas de bovinos por fungos nematófagos. Uma nova alternativa? *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia* 30:75-88.
- Araújo, J.V.; Mota, M.A.; Campos, A.K. (2004a) Controle biológico de helmintos parasitos de animais por fungos nematófagos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 13:165-171.
- Araújo, J.V.; Guimarães, M.P., Campos, A.K.; Sá, N.C.; Sarti, P.; Assis, R.C.L. (2004b) Control of bovine gastrointestinal nematodes parasites using pellets of the nematode-trapping fungus *Monacrosporium thaumasium*. *Ciência Rural* 34:457-463.
- Araújo, J.V.; Freitas, B.W.; Vieira, T.C.; Campos, A.K. (2006) Avaliação do fungo predador de nematoides *Duddingtonia flagrans* sobre larvas infectantes de *Haemonchus contortus* e *Strongyloides papillosus* de caprinos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 15:76-79.
- Araújo, J.V.; Braga, F.R.; Araujo, J.M.; Silva, A.R.; Tavela, A.O. (2008) *In vitro* evaluation of the effect of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on *Ascaris suum* eggs. *Parasitology Research* 102:787-790.
- Assis, R.C.L.; Luns, F.D.; Araújo, J.V.; Braga, F.R.; Assis, R.L.; Marcelino, J.L.; Freitas, P.C.; Andrade, M.A.S. (2013) Comparison between the action of nematode predatory fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* in the biological control of bovine gastrointestinal nematodiasis in tropical southeastern Brazil. *Veterinary Parasitology* 193:134-140.

Assis, R.C.L.; Luns, F.D.; Araújo, J.V.; Braga, F.R. (2012) Biological control of trichostrongyles in beef cattle by the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in tropical southeastern Brazil. *Experimental Parasitology* 132:373–377.

ASSOCIAÇÃO Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes – ABIEC. Disponível em: www.abiec.com.br acesso em: 11 de julho de 2013.

Balán, F.L.A.; de Gives, P.M.; Arellano, M.E.L.; Hernández, E.L.; Prats, V.V.; Miranda, E.M.; Nolasco, A.M.O.M. (2008) Evaluación de un método combinado de control de la hemoncosis ovina en condiciones controladas. *Técnica Pecuaria en México* 46:217-223.

Balan, J.; Gerber, N. (1972) Attraction and killing of the nematode *Panagrellus redivivus* by the predacious fungus *Arthrobotrys dactyloides*. *Nematology* 18:163-173.

Barron, G.L. (1977) The nematode-destroying fungi. Topics in Microbiology. Guelph, Canada: Canadian Biological Publications.

Barron, G.L.; Thorn, R.G. (1987) Destruction of nematodes by species of *Pleurotus*. *Canadian Journal of Botany* 65:774-778.

Braga, F.R.; Araújo, J.V.; Silva, A.R.; Araujo, J.M.; Carvalho, R.O.; Tavela, A.O.; Campos, A.K.; Carvalho, G.R. (2009) Biological control of horse cyathostomin (Nematoda: Cyathostominae) using the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in tropical southeastern Brazil. *Veterinary Parasitology* 163:335-340.

Braga, F.R.; Araújo, J.V.; Silva, A.R.; Carvalho, R.O.; Araujo, J.M.; Ferreira, S.R.; Carvalho, G.R. (2010) Viability of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* after passage through the gastrointestinal tract of horses. *Veterinary Parasitology* 168:264-268.

Casillas-Aguilar, J.A.; de Gives, P.M.; López-Arellano, M.E.; Liébano-Hernández, H. (2008) Evaluation of multinutritional pellets containing *Duddingtonia flagrans* chlamydospore for the control of ovine haemonchosis. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1149: 161–163.

Dias, W.P.; Ferraz, S. (1993) Crescimento e esporulação de *Arthrobotrys* spp. em diferentes substratos, meios de cultura, pH e níveis de temperatura. *Nematologia Brasileira* 17:168-181.

Dias, W.P.; Ferraz, S.; Muchovej, J.J. (1995) Detecção, isolamento e identificação de fungos predadores de nematóides em amostras de solo de diferentes regiões do Brasil. *Revista Ceres* 42:615-620.

Drechsler, C. (1937) Some Hyphomycetes that prey on free-living terricolous nematodes. *Mycologia* 29:447-552.

Food and Agriculture Organization - FAO. Disponível em www.fao.org acesso em 11 de julho de 2013.

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

Gray, N.F. (1987) Nematophagous fungi with particular reference to their ecology. *Biological Reviews* 62:245-304.

Gronvold, J.; Henriksen, S. A; Larsen, M.; Nansen, P.; Wolstrup, J. (1996) Aspects of biological control - With special reference to arthropods, protozoans and helminths of domesticated animals. *Veterinary Parasitology* 64:47-64.

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

INSTITUTO Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Disponível em www.ibge.gov.br acesso em 19 de julho de 2013.

Jansson, H.B.; Nordbring-Hertz, B. (1980) Interactions between nematophagous fungi and plant parasitic nematodes: Attraction, induction of trap formation and capture. *Nematology* 26:383-389.

Jansson, H.B.; Nordbring-Hertz, B. (1984) Involvement of sialic acid in nematode chemotaxis and infection by an endoparasitic nematophagous fungi. *Journal of General Microbiology* 130:39-43.

Jansson, H.B.; Poinar, O.G. (1986) Some possible fossil nematophagous fungi. *Transactions of the British Mycological Society* 87:471-474.

Larsen, M. (1999) Biological control of helminths. *International Journal for Parasitology* 29:139-146.

Larsen, M. (2000) Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious microfungi. *Parasitology* 120:121-131.

Larsen, M. (2006) Biological control of nematode parasites in sheep. *Journal of Animal Science* 84:133-139.

- Lewis, J.A.; Papavizas, G.C. (1987) Application of *Trichoderma* and *Gliocladium* in alginates pellets for control of *Rhizoctonia* damping-off. *Plant Pathology* 36:438-446.
- Lohmann, U.E.; Sikora, R.A. (1989) Mass production of the endoparasitic fungi *Drechmeria coniospora*, *Verticillium balanoides* e *Harposporium anguillulae* in liquid culture. *Nematology* 85:97-104.
- Lopez-Llorca, L.V., Maciá-Vicente, J.G.; Jansson, H.B. (2008) Mode of action and interactions of nematophagous fungi. *In: Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes*. A. Ciancio and K. G. Mukerji (eds.) p.51–76.
- Lopez-Llorca, L.V.; Robertson, W.M. (1992) Immuno-cytochemical localization of a 32-kDa protease from the nematophagous fungus *Verticillium suchlasporium* in infected nematode eggs. *Experimental Mycology* 16:261–267.
- Lysek, H.; Nigenda, G. (1989) Capacidad de deshelminización del suelo. *Salud Publica Mexicana* 31:763-771.
- Machado, V.O.F.; Campos, V.P. (1997) Cultivo de fungos antagonistas em diferentes substratos e avaliação no controle de *Meloidogyne javanica*. *Fitopatologia Brasileira* 22:387-391.
- Mahoney, C.J.; Strongman, D.B. (1994) Nematophagous fungi from cattle manure in four states of decomposition at three sites in Nova Scotia, Canada. *Mycologia* 86:371-375.
- Mankau, R. (1980) Biological control of nematode pests by natural enemies. *Annual Review of Phytopathology* 18:415-440.
- Manuelli, P.R.; Waller, P.J.; Faedo, M.; Mahommed, F. (1999) Biological control of nematode parasites of livestock in Fiji: screening of fresh dung of small ruminants for the presence of nematophagous fungi. *Veterinary Parasitology* 81:39-45.
- Melo, I.S.; Sanhueza, R.M.V. (1995) **Métodos de seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos**. Jaguariúna: EMBRAPA - CNPMA,. 72 p. (EMBRAPA - CNPMA. Documentos, 1).
- Mendoza-de-Gives, P.; Davies, K.G.; Clark, S.J.; Behnke, J.M. (1999) Predatory behavior of trapping fungi against srf mutants of *Caenorhabditis elegans* and different plant and animal parasitic nematodes. *Parasitology* 119:95-104.
- Mendoza-de-Gives, P.; Torres-Acosta, F. (2012) Biotechnological use of fungi in the control of ruminant parasitic nematodes. *In: "Fungi: types, environmental impact and role in disease"*. Arias, M.S. and Paz-Silva (eds.). Nova Editorial, New York, USA. p. 389-408.

MINISTÉRIO da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA. Disponível em: www.agricultura.com.br acesso em: 19 de julho de 2013.

Molento, M.B.; Almeida, M.; Guterres, E.; Roman, J.; Freitas, F.; Rocha, M. (2005) Bezerras de corte infectadas naturalmente com parasitas gastrintestinais – epidemiologia e tratamento seletivo. *Archives of Veterinary Science* 10:45-50.

Molento, M.B.; Veríssimo, C.J.; Amarante, A.T.; Van Wyk, J.A.; Chagas, A.C.S.; Araújo, J.V.; Borges, F.A. (2013) Alternativas para o controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes. *Arquivos do Instituto Biológico* 80:253-263.

Morgan Jones, G.; Rodriguez-Cabana, R. (1988) Infections events in the fungus-nematode system. In: **Diseases of Nematodes**. Poinar, O.G.; Borne, J.H. (eds.) CRC press, Boca Raton, USA, p.59-62.

Nordbring-Hertz, B. (1988) Nematophagous fungi: Strategies for nematode exploitation and for survival. *Microbiology Science* 5:108-116.

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

Pandey, V.S. (1973) Predatory activity of nematode trapping fungi against the larvae of *Trichostrongylus axei* and *Ostertagia ostertagi*: a possible method of biological control. *Journal of Helminthology* 57:35-48.

Papavizas, G.C.; Dunn, M.T.; Lewis, J.A.; Bedele-Ristaino, J. (1984) Liquid fermentation technology for experimental production biocontrol fungi. *Journal of Phytopathology* 74:1171-1175.

Saumell, C.A.; Padilha, T. (2000) Influence of weather and time of deposition on sheep faeces colonization by nematophagous fungi in the Mata region of Minas Gerais state, Brazil. *Applied Soil Ecology* 14:63-70.

Santurio, J. M., Zanette, R. A., Da Silva, A. S., Fanfa, V. R., Farret, M. H., Ragagnin, L., Hecktheuer, P. A. & Monteiro, S. G. (2011) A suitable model for the utilization of *Duddingtonia flagrans* fungus in small-flock-size sheep farms. *Experimental Parasitology* **127**, 727-731.

Stirling, G.R. (1991) **Biological Control of Plant Parasitic nematodes**. CAB International. Wallingford, United Kingdom. 282p.

Stirling, G.R.; Mani, A. (1995) The activity of nematode-trapping fungi following their encapsulation in alginate. *Nematology* 41:240-250.

- Stirling, G.R.; Smith, L.J. (1998) Field tests of formulated products containing either *Verticillium chlamydosporium* or *Arthobotrys dactiloydes* for biological control of root-knot nematodes. *Biological Control* 11:231-239.
- Van Gundy, S.D. (1985) **Biological control of nematodes: status and prospects in agricultural systems.** In: Hoy, M.A.; Herzog, D.C. (eds.) *Biological Control in Agricultural IPM Systems*. p. 467-478.
- Vilela, V.L.R.; Feitosa, T.F.; Braga, F.R.; Araújo, J.V.; Lucena, S.C.; Dantas, E.S.; Athayde, A.C.R.; Silva, W.W. (2013) Efficacy of *Monacrosporium thaumasium* in the control of goat gastrointestinal helminthiasis in a semi-arid region of Brazil. *Parasitology Research* 112:871–877.
- Wagner B, Polley L (1999) *Ascaris suum*: seasonal egg development rates in a Saskatchewan pig barn. *Veterinary Parasitology* 85:71–78.
- Walker, H.L.; Connick, W.J. (1983) Sodium alginate for production and formulation of mycoherbicides. *Weed Science Society of America* 31:333-338.
- Waller, P.J. (1992) Prospects for biological control of nematodes of parasites of ruminants. *New Zealand Veterinary Journal* 40:1-3.
- Waller, P.J. (1996) Workshop summary: Sustainable production systems. *Veterinary Parasitology* 54:305-307.
- Waller, P.J.; Faedo, M. (1993) The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematodes parasites of sheep: screening studies. *Veterinary Parasitology* 49:285-297.
- Waller, P.J.; Faedo, M. (1996) The prospect for biological control of the free-living stages of nematode parasite of livestock. *International Journal for Parasitology* 26:915-925.
- Waller, P.J.; Faedo, M.; Ellis, K. (2001) The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematodes parasites of sheep: towards the development of a fungal controlled release device. *Veterinary Parasitology* 102:321-330.
- Waller, P.J.; Larsen, M. (1993) The role of nematophagous fungi in the biological control of nematode parasites of livestock. *International Journal for Parasitology* 23:539-546.

CAPÍTULO 1

**“Mycelial mass production of fungi *Duddingtonia flagrans* and
Monacrosporium thaumasium under different culture conditions”**

Artigo publicado na Revista BMC Research Notes

(JCR 2012: 1.39)

Volume 6, páginas 340-343, 2013

DOI: 10.1186/1756-0500-6-340

**Mycelial mass production of fungi *Duddingtonia flagrans* and
Monacrosporium thaumasium under different culture conditions**

Manoel Eduardo da Silva^{1,2}

Email: manoelsilva@epamig.br

Jackson Victor de Araújo^{1*}

* Corresponding author

Email: jvictor@ufv.br

Fabio Ribeiro Braga^{1,4}

Email: fabioribeirobraga@hotmail.com

Luana Alcântara Borges¹

Email: luanaalcantara.zoo@hotmail.com

Filippe Elias F Soares³

Email: filippeufv@yahoo.com.br

Walter dos Santos Lima⁵

Email: wlima@icb.ufmg.br

Marcos Pezzi Guimarães⁵

Email: pezzi@icb.ufmg.br

¹ Departamento de Veterinária – UFV, Viçosa, MG, Brasil

² URECO/EPAMIG, Pitangui, MG, Brasil

³ Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFV, Viçosa, MG, Brasil

⁴ Universidade Vila Velha - UVV, Vila Velha, ES, Brasil

⁵ Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil

ABSTRACT

Background

Duddingtonia flagrans and *Monacrosporium thaumasium* are promising fungus species in veterinary biological control of gastrointestinal nematodes because of their production capacity of fungal structures (conidia and/or chlamydo spores), growth efficiency in laboratory solid media and especially their predatory capacity. However, their large-scale production remains a challenge. This work aimed at evaluating the mycelial mass production of *D. flagrans* (AC001 and CG722) and *M. thaumasium* (NF34A) nematophagous fungi under different culture conditions.

Results

The results did not present significant differences ($p > 0.05$) in mycelia mass production between the isolates cultured under pH 4.0. Furthermore, after 168 hrs., the isolate CG722 presented a lower production of mycelial mass in medium CM (corn meal) ($p < 0.05$).

Conclusion

We therefore concluded the use of culture media SD (soy dextrose) and CG (corn grits) at pH values between 6.0 and 7.0 is suitable for high mycelial mass production of *D. flagrans* and *M. thaumasium*.

Keywords

Nematophagous fungi, *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium*, Biological control, Fungal mycelium

1. BACKGROUND

Duddingtonia flagrans and *Monacrosporium thaumasium* are promising fungus species in veterinary biological control of gastrointestinal nematodes because of their production capacity of fungal structures (conidia and/or chlamydospores), growth efficiency in laboratory solid media and especially their predatory capacity [1]. However, the application of these organisms as biological control agents [2,3] is still facing major challenges in large-scale production and storage. After isolation, these organisms need to be preserved for long periods of time and evaluated in order to be selected as potentially useful in control programs. Their maintenance in the laboratory is a basic requisite for successful biological control programs, though technical difficulties have impaired this. The fungi maintenance process requires periodic replication, exposure of the culture to contaminations and favouring mutations that can alter their predatory capacity [2,4,5].

Biological control with predatory nematophagous fungi is a viable option [1]. One of the principal advantages is its ability to survive for long periods under laboratory conditions; however, some isolates may lose their predatory activity [2].

According to Nozaki *et al.* [6], the conditions for fungus growth are not always the same for sporulation. It is also known that some culture media are favoured more than others for the sporulation of fungi. Economically viable methods for the development of fungal material production in the laboratory are necessary and an important step in enabling the commercial production of nematophagous fungi [1]. This work aimed at evaluating the mycelia mass production of *D. flagrans* (AC001 and CG722) and *M. thaumasium* (NF34A) nematophagous fungi under different culture media and pHs and after different incubation times.

2. METHODS

2.1. Fungi

Two isolates of the fungus *Duddingtonia flagrans* (AC001 and CG722) and one of *Monacrosporium thaumasium* (NF34A) which originated from Brazilian soil, were maintained by continuous transfer to solid media culture in the Laboratory of Parasitology of the Department of Veterinary of the Federal University of Viçosa. Specimens were kept at 4 °C in 2% corn meal agar (2% CMA) and protected from light.

2.2. Mycelia mass production

Five fragments with approximately 4 mm of each isolate (AC001, CG722 and NF34A) previously cultured in 2% CMA were transferred to Erlenmeyer flasks containing 50 ml of the liquid media:

- (1) Soy dextrose (SD): 200 g of cooked grain for 30 min in 1 l of water, 40 g of dextrose added.
- (2) Potato dextrose (PD): 200 g of cooked and peeled potatoes for 30 min in 1 l of water, 40 g of dextrose added.
- (3) Corn grits (CG): 200 g of cooked corn grits for 30 min in 1 l of water, 40 g of dextrose added.
- (4) Corn meal agar (CM): 17 g of corn extract (DIFCO) diluted in 1 l of boiling water (100°C). The agar was removed from the medium through filtration using a Tamis filter 106.

The soy grain [*Glycine max* (L.) Merr.] contained 39.01% of brute protein, 22.80% of oleic fatty acids and 1.91% of alanine amino acids. The corn grain (*Zea mays*) contained 9.11% of brute protein, 28.45% of oleic acid fatty acids and 0.66% alanine amino acids. The potato (*Solanum tuberosum* L.) contained 2.39% brute protein [7]. These nutrients, according to Rosenweig [8] and Dijksterhuis et al. [9], are considered essential for fungal growth and sporulation.

2.3. pH of culture media

The described media above (SD, PD, CG and CM) had their pH measured by a pH meter and were adjusted to 4.0, 5.0, 6.0 and 7.0 through the addition of NaOH (1 N) or HCl (1 N) diluted in distilled water.

2.4. Incubation times

Each fungal isolate for all culture media and pHs were incubated at 26.5°C under constant agitation (65 rpm). After growth, three samples of each isolate from the different culture conditions were collected after 24, 48, 72, 96 and 168 h of incubation. Samples were filtrated with ME 24 0.2 µm filter in Kitazato flasks and using a vacuum pump. Filtrated samples were maintained in BOD and incubated at 50°C and weighed daily.

2.5. Statistical analysis

Data obtained from the mycelial mass growth of the tested fungi (AC001, NF34A and CG722) from the different culture media, times and pHs were subjected to analysis of variance (ANOVA). Subsequently, the efficiency of the mycelial growth in

the different culture media, times, and pH was evaluated by Tukey's test at 1% probability.

3. RESULTS

The results for mycelial mass production of the three tested fungal isolates (AC001, CG722 and NF34A) at different pH values and times of cultivation are shown in Table 1.

In the present study, no differences were observed in mycelial mass ($p > 0.05$) between the tested fungal isolates (AC001, CG722 and NF34A) in any of the culture media at pH 4.0. For this pH value, there was also no influence observed for the different for the mycelial mass production.

On the other hand, we observed that the isolates AC001 and NF34A present different mycelial mass production in the SD culture medium at pH 5.0 after 48 hours of incubation compared to other incubation times and isolates ($p < 0.05$). For the CG culture medium with this same pH value, the three tested isolates (AC001, and CG722 NF34A) showed no difference after 24 and 48 hours for the mycelial mass production. However, a difference was observed ($p < 0.01$) for the mycelial mass production of the three tested fungal isolates after 72, 96 and 168 hours.

Regarding pH 6.0, a difference was observed ($p < 0.05$) among the tested isolates in mycelial mass production for SD and CG culture media at the different times tested. Furthermore, in the SD culture medium, the isolate NF34A showed a higher mycelial mass after 48 hours of cultivation ($p < 0.01$). However, the isolate CG722 showed higher mycelial mass after 168 hours of culture ($p < 0.01$). For the CG culture medium, the three tested isolates (AC001, CG722 and NF34A) showed no difference after 24 and 48 hours. However, after 72, 96 and 168 hours, a difference was observed ($p < 0.01$) with a tendency for higher mycelial mass for the higher periods of culture.

The isolates AC001, CG722 and NF34A present different growth rates at pH 7.0 after 24 and 48 hours of incubation ($p < 0.01$). The growth at this pH also tends to be higher after longer incubation times.

Table 1 - Mycelial mass production of the fungi *D. flagrans* and *M. thaumasium* under different culture conditions

Times Isolates (hs)	pH 5		pH 6		pH 7
	SD	CG	SD	CG	CG
AC001	0.40 ± 0.12A	1.40 ± 0.25A	0.16 ± 0.08A	1.20 ± 0.88A	1.86 ± 0.42A
24 NF34A	0.37 ± 0.01A	0.36 ± 0.03A	0.34 ± 0.04A	0.32 ± 0.08A	0.35 ± 0.05AB
CG722	0.22 ± 0.05A	0.40 ± 0.23A	0.15 ± 0.02A	0.61 ± 0.25A	0.14 ± 0.20A
AC001	0.59 ± 0.08B	1.44 ± 0.16A	0.50 ± 0.12A	1.63 ± 0.51A	1.11 ± 0.58AB
48 NF34A	0.38 ± 0.04B	0.61 ± 0.06A	0.43 ± 0.10B	0.34 ± 0.02A	1.12 ± 0.60AB
CG722	0.25 ± 0.07A	0.51 ± 0.30B	0.15 ± 0.01A	0.28 ± 0.25AB	0.40 ± 0.07B
AC001	0.64 ± 0.22A	1.68 ± 0.23B	0.73 ± 0.23A	1.30 ± 0.38AB	1.90 ± 0.40B
72 NF34A	0.42 ± 0.01A	0.38 ± 0.42B	0.46 ± 0.05A	0.37 ± 0.04AB	0.37 ± 0.03B
CG722	0.25 ± 0.18A	0.36 ± 0.58B	0.20 ± 0.04A	0.48 ± 0.24AB	0.45 ± 0.10B
AC001	1.10 ± 0.47A	1.14 ± 0.43B	0.59 ± 0.04A	1.06 ± 0.26AB	0.93 ± 0.16B
96 NF34A	0.35 ± 0.02A	0.37 ± 0.02B	0.57 ± 0.09A	0.34 ± 0.03AB	0.37 ± 0.08B
CG722	0.30 ± 0.02A	0.60 ± 0.12B	0.39 ± 0.05A	0.38 ± 0.19AB	0.34 ± 0.09B
AC001	1.17 ± 0.28A	1.02 ± 1.04B	1.15 ± 0.10A	1.50 ± 0.27AB	0.30 ± 0.86B
168 NF34A	0.64 ± 0.16A	0.80 ± 0.16B	0.59 ± 0.11A	0.36 ± 0.04AB	0.38 ± 0.06B
CG722	0.97 ± 0.28A	0.23 ± 0.05B	1.07 ± 0.50B	0.17 ± 0.03AB	0.14 ± 0.31B

Means and standard deviation expressed in grams.

Different capital letters in columns show statistical difference ($p < 0.05$ or $p < 0.01$) by Tukey test.

4. DISCUSSION

Our results demonstrated that the nematophagous fungi *D. flagrans* and *M. thaumasium* can grow in culture using the media described, which are agro-industrial by-products, and present good mycelial mass production. Moreover, the optimisation of the culture time and culture medium pH can be important in the future application of these organisms as biological control agents and in their large-scale industrial production. According to Araújo and Ribeiro [10], the commercialisation of nematophagous fungi depends on their: [1] predatory efficiency, [2] stocking demands, [3] satisfactory growth rates in the laboratory and [4] acceptability of association to other isolates. Although predatory activity is not associated with mycelial growth, fungal growing (either chlamydo spores or mycelia) is an important factor in terms of propagation and survival of these organisms in environmental conditions [11].

Although all the culture media used in our experiments have relatively low production costs, the culture time necessary for the mycelial mass production were different between the tested isolates of predatory fungi (AC001, NF34A and CG722). This result indicates possible saturation of the culture media, which depends on the inoculum, culture medium pH and medium type tested, thus corroborating other studies [1,12-15].

The highest mycelia production of the three fungal isolates maintained under the different culture media, culturing time and pH values (from 4 to 7), were achieved as follows: *D. flagrans* (AC001 isolate) growing in CG at pH 7, after 72 h incubation, resulted in 1.9 g mycelia production; *D. flagrans* (CG722 isolate) growing in SD at pH 6, after 168 h incubation time produced 1.07 g of mycelia and *M. thaumasium* (NF34A isolate) growing in CG at pH7, after 48 h incubation produced 1.12 g mycelia mass. These results shown that neutral pH values resulted in a higher mycelial mass production. This result is in agreement with the works by Soprunov [16] and Mitsui [17] that observed a better growth of the nematophagous fungus *Arthrobotrys conoides* at a neutral pH. Dias and Ferraz [18] demonstrated that this fungus presented higher mycelial mass production in solid medium at six different pH values, ranging from 4.0 to 9.0. However, Gorlenko et al. [19] established pH values 6.0-7.0 as ideal for the mycelial mass development of *A. musiformis* and *A. conoides*. Therefore, nutritionally rich media at neutral pH values can be suggested as ideal for the development and production of fungi mycelial mass. This is particularly noticeable when associated with optimal temperature and culture times.

Of the culture media tested, soy dextrose (SD) and corn grits (CG) presented higher potential in mycelial mass production, possibly because of their bromatologic composition and nutritional enrichment essential for fungal growth, particularly the amino acid described by Rosenweig [8] and Dijksterhuis et al. [9] and their brute protein. These authors demonstrated higher nematophagous fungi growth in media containing oleic acid and D-alanine, carbon and energy sources of trap formation. Moreover, the media composition determines the quantity and quality of fungal mycelial growth and sporulation. In addition to the medium composition, others factors such as temperature and light are critical to the sporulation [20]. However, when a fungus grows better in a specific media, it is accepted that specific metabolites are involved [21]. Therefore, the methods of our work were similar to those described by Dias & Ferraz [18] who observed radial growth and fungal structures of *Arthrobotrys*

spp in PDA (potato dextrose agar), BDA-P (potato dextrose agar; peptone, 10 g), YPSSA (yeast extract, 4 g; K₂HPO₄, 1 g; MgSO₄.7H₂O, 0.5 g; soluble starch, 20 g; agar, 20 g; distilled water, 1 l), CMA(corn meal agar) and corn meal-A (corn meal, 20 g; agar, 20 g; distilled water, 1 l) media. These authors also stated that the use of liquid media and mycelial mass weighing would be suitable techniques for the evaluation of mycelial growth. Field studies are necessary to evaluate the predatory ability of the tested fungal isolates (AC001, CG722 and NF34A) cultured at different pH values and culture times in order to prove their efficiency in biological control programs.

5. CONCLUSION

The use of culture media SD (soy dextrose) and CG (corn grits) at pH values between 6.0 and 7.0 is suitable for high mycelial mass production of *D. flagrans* and *M. thaumasium*. More studies must be conducted to determine their nutritional demands. The results of the present study will have an important implication in fungal production for further works focused to evaluate the oral administration of nematophagous fungal mycelia as a strategy of control of gastrointestinal parasitic nematodes of importance for livestock industry.

6. COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

7. AUTHORS' CONTRIBUTIONS

Silva, M. E.; Araújo, J. V.; Borges, L. A.; and Braga, F. R. contributed in the designing and coordinating the experiment and also in the preparation and revision of the manuscript. Silva, M. E.; Soares, F. E. F.; Lima, W. S. and Guimarães, M. P. participated in the design of the study and performed the statistical analysis. All authors read and approved the final manuscript.

8. AUTHORS' INFORMATION

Jackson Victor de Araújo CNPq scholarship.

9. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank CNPq, Capes and Fapemig.

10. REFERENCES

1. Araújo JV, Mota MA, Campos AK: **Controle biológico de helmintos parasitos de animais por fungos nematófagos.** *Rev Bras Parasitol Vet* 2004, **13**(1):165–169.
2. Braga FR, Araújo JV, Araújo JM, Tavela AO, Ferreira SR, Soares FEF, Benjamin LA, Frassy LN: **Influence of the preservation period in silica-gel on the predatory activity of the isolates of *Duddingtonia flagrans* on infective larvae of cyathostomins (Nematoda: Cyathostominae).** *Exp Parasitol* 2011, **128**:460–463.
3. Carvalho RO, Braga FR, Araújo JV: **Viability and nematophagous activity of the freeze-dried fungus *Arthrobotrys robusta* against *Ancylostoma* spp. infective larvae in dogs.** *Vet Parasitol* 2011, **176**:236–239.
4. Mota MA, Campos AK, Araújo JV: **Influence of different storage methods on the predatory capacity of the fungi *Arthrobotrys robusta* and *Monacrosporium thaumasium* after passage through the bovine gastrointestinal tract.** *World J Microbiol Biotechnol* 2003, **19**:913–916.
5. Campos AK, Araújo JV, Mota MA, Cecon PR: **Atividade predatória, crescimento radial e esporulação de fungos predadores de nematóides *Monacrosporium* spp, submetidos à criopreservação.** *Ciência Rural* 2004, **34**(2):465–469.
6. Nozaki MH, Camargo M, Barreto M: **Caracterização de *Diaporthe citri* em diferentes meios de culturas, condições de temperatura e luminosidade.** *Fitopato Bras* 2004, **29**(4):429–432.
7. Magalhães KA, Valadares Filho SC, Pereira OG: **Tabelas de composição de alimentos.** In *Exigências nutricionais de zebuínos e tabelas de composição de alimentos BR-corte*. 1st edition. Viçosa: UFV; 2006:95–142.
8. Rosenweig WD: **Role of aminoacids, peptides and medium composition in trap formation by nematode-trapping fungi.** *Can J Microbiol* 1983, **30**:265–267.
9. 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* 1993, **94**:1–9.
10. Araújo JV, Ribeiro R: **Atividade predatória sobre larvas de tricostrongilídeos (nematoda: trichostrongyloidea) de isolados fúngicos do gênero *Monacrosporium* após a passagem pelo trato gastrintestinal de bovinos.** *Rev Bras Parasitol Vet* 2003, **12**:76–81.

11. Dackman C, Olsson S, Jansson HB, Lundgren B: Nordbring-Hertz B: **Quantification of predatory and endoparasitic nematophagous fungi and their activities in soil.** *Microb Ecol* 1987, **13**:89–93.
12. Santos MA, Ferraz S, Muchovej J: **Detection and ecology of nematophagous fungi from Brazil soils.** *Nemato Bras* 1991, **15**(2):121–134.
13. Gomes APS, Araújo JV, Ribeiro RCF: **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* 1999, **32**(1):79–83.
14. Araújo JV, Gomes APS, Guimarães MP: **Biological control of bovine gastrointestinal nematode parasites in southern Brazil by the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys robusta*.** *Rev Bras Parasitol Vet* 1998, **7**:117–122.
15. Larsen M: **Biological control of helminths.** *International J Parasitol* 1999, **29**:139–146.
16. Soprunov FF: *Predacious hyphomycetous fungi and their application to the control of pathogenic nematodes.* Ashkhabad: Academy of Science Turkkmen; 1958.
17. Mitsui Y: **Distribution and ecology of nematode-trapping fungi in Japan.** *JARQ* 1985, **18**:182–193.
18. Dias WP, Ferraz S: **Crescimento e esporulação de *Arthrobotrys* spp em diferentes substratos, meios de cultura, pH e níveis de temperatura.** *Nemato Bras* 1993, **17**(2):168–181.
19. Gorlenko MV, Kondakova EI, Pletneva OI: **On the biology of predacious fungi.** *Bull Moscow Assoc Exper Biol* 1959, **64**:89–97.
20. Dhingra OD, Sinclair JB: *Basic plant pathology methods.* 2nd edition. CRC Press, 434 p., 1995.
21. Menezes M, Silva-Hanlin DMW: *Guia prático para fungos fitopatogênicos.* Recife: UFRPE; 1997.

CAPÍTULO 2

**“PRODUCCIÓN DE CONÍDIOS Y CLAMIDOSPORAS DE LOS HONGOS
Duddingtonia flagrans y *Monacrosporium thaumasium* EN DIFERENTES
MÉDIOS SÓLIDOS”**

Artigo submetido para a Revista Arquivos do Instituto Biológico
(Estrato Qualis B2)

PRODUCCIÓN DE CONÍDIOS Y CLAMIDOSPORAS DE LOS HONGOS
***Duddingtonia flagrans* y *Monacrosporium thaumasium* EN DIFERENTES**
MÉDIOS SÓLIDOS

Production of *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* conidia
and chlamydospores in different solids media

Manoel Eduardo da Silva^{1a}, Fabio Ribeiro Braga^{1b}, Luana Alcântara Borges¹, Paulo Oliveira^a, Walter dos Santos Lima², Jackson Victor de Araújo^{1c}

¹Departamento de Veterinária, UFV, Viçosa, MG, Brasil

^aURECO/EPAMIG, Pitangui, MG, Brasil

^bUniversidade Vila Velha, Vila Velha, Espírito Santo, Brasil

²Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil

^cCorresponding author: jvictor@ufv.br – 0055(31)38991457

Resumen

Las especies *Duddingtonia flagrans* y *Monacrosporium thaumasium* son microhongos considerados como promisorios agentes de control biológico de nematodos de rumiantes. Estos hongos producen esporas o clamidosporas que son capaces de sobrevivir después de pasar a través del tracto gastrointestinal de los animales. Normalmente, estas estructuras son desarrolladas bajo condiciones adversas *ie.*, la falta de nutrientes. La formación de estas estructuras es una característica desable; ya que promueve la sobrevivencia y diseminación de los hongos para propósitos de bio-control. El objetivo de este estudio fue evaluar la producción de esporas / clamidosporas de dos especies de hongos nematófagos *D. flagrans* (aislados AC001 y CG722) y *M. thaumasium* (aislado NF34A) cultivados en subproductos agro-industriales con el objeto de identificar el mejor medio para su uso en programas de bio-control de nematodos. Diferentes volúmenes (10, 15 y 20 mL) de masa micelial fueron utilizados como inóculo inicial y adicionados a 100 gramos de medios de crecimiento sólidos (sémola de arroz - QA, sémola de Maíz - QM, bagazo de caña - BC, paja de arroz - PA y cascara de café - CC) para evaluar la producción de conidios y clamidosporas de los hongos. Los aislados AC001 y CG722 mostraron las mejores producciones en medio QA ($p < 0.05$). El volumen de 20mL de masa micelial utilizado como inóculo inicial proporcionó una mayor recuperación de esporas para estos mismos aislados. El aislado NF34A presentó una baja o nula producción de estructuras reproductivas en los diferentes volúmenes de masa micelial utilizados. La mejor producción de esporas / clamidosporas se obtuvo utilizando subproductos de agroindustria con una mayor densidad protéica y energética; contrario a lo que se esperaba.

Palabras clave: hongos nematófagos; control biológico; subproductos agroindustriales; esporas.

Abstract

Duddingtonia flagrans and *Monacrosporium thaumasium* are micro-fungi considered as promising nematode bio-control agents of ruminants. Such fungi produce either spores or chlamydospores that are able to survive after passing the gastrointestinal tract of animals. Normally, these fungal structures are developed under adverse conditions *ie.*, the lack of nutrients. Spore/Chlamydospores formation is a desirable feature; since promote the survival and spreading fungi for bio-control purposes. This study was aimed to assess the spore/chlamydospore production by two species of nematophagous fungi *D. flagrans* (isolates AC001 and CG722) and *M. thaumasium* (isolate NF34A) cultured in agro-industrial sub-products in order to identify the best medium for use in nematode bio-control programs. In order to assess the spore/chlamydospore production, different volumes of mycelia mass (10, 15 and 20 mL) were used as initial inoculum and 100 g of solid growing media (rize semolina – QA; maize semolina – QM; cane chaff – BC; rize chaff – PA; coffee grain skin) were added to each media. The AC001 and CG722 isolates shown the highest production in QA ($p < 0.05$). The 20mL volume of mycelia mass used as initial inoculum promoted the highest spore/chlamydospore recovery in these isolates. The NF34A isolate showed a low or nule spore/chlamydospore production in the different mycelia mass used. The best spore/chlamydospore production was achieved using the agro-industrial sub-products with the higher protein/energy source. This finding was different than the results we thought.

Key words: nematophagous fungi; biological control; sub-products agro-industries; spores.

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos nematófagos producen esporas o conidios y también producen esporas de resistencia conocidas como clamidosporas. Estas últimas, una vez que son administradas oralmente en los animales, poseen la capacidad para resistir la degradación gastro-intestinal de los rumiantes y otros herbívoros [19] y son eliminadas junto con las heces, manteniendo su capacidad germinativa y de colonización de las heces, en donde ejercen una actividad depredadora y destruyen a los estadios parasitarios de nematodos [18]. Este sistema permite interrumpir el ciclo biológico de los parásitos [2]. Según Scholler y Rubner [17] la formación de clamidosporas es una respuesta a condiciones de crecimiento desfavorables como la deficiencia de nutrientes, y aunque los hongos no requieren de grandes cantidades de nutrientes para sobrevivir, conocer que medios son favorables para una mayor capacidad de esporulación son necesarios para su uso en sistemas de control de nematodos parásitos del ganado [2, 9]. La esporulación fúngica abundante es factor importante para diseminación, sobrevivencia y es deseable en programas de control biológico [1, 20]. Para su crecimiento, los hongos requieren un conjunto de condiciones ambientales; sin embargo, la concentración de nutrientes en los medios de cultivo es lo que determinan la calidad y cantidad del crecimiento del hongo y si predominara la esporulación, favorecida por el agotamiento nutricional, o crecimiento micelial [6]. Según Larsen [10] la temperatura óptima para el crecimiento de *Duddingtonia flagrans* es 30° con una gran producción de esporas, pero en temperaturas inferiores a 25° existe crecimiento fúngico.

La especie *D. flagrans* tiene un elevado potencial para la producción de clamidosporas intercaladas a sus hifas y numerosos conidios formados en las extremidades de los conidióforos que son estructuras reproducibles [16]. Los conidios son caracterizados a través de su morfología que puede variar de elípticos a ovoides, y las clamidosporas son estructuras altamente resistentes y formadas en condiciones adversas de crecimiento y las hifas forman redes adhesivas relativamente cortas que atacan y destruyen rápidamente las larvas de los nematodos [5, 4].

La especie *Monacrosporium thaumasium* produce solamente un conidio en la extremidad apical de cada conidióforo, que son generalmente erectos, transparentes y fusiformes, con dos o más septos transversales, con una célula intermediaria que es más grande en las extremidades [12, 21, 2]. Las especies del género *Monacrosporium* poseen hifas vegetativas septadas y ramificadas que las utilizan para depredar

nematodos por medio de redes adhesivas, nódulos y redes tridimensionales adhesivas o anillos constrictores [15].

Este trabajo tiene como objetivo evaluar la producción de esporas/clamidosporas de hongos depredadores de las especies *D. flagrans* (aislados CG722 y AC001) y *M. thaumasium* (aislado NF34A) en diferentes sustratos sólidos (sémola de arroz – QA; sémola de maíz – QM; bagazo de caña con melaza de caña – BC; paja de arroz con melaza de caña – PA y cáscara de café con melaza de caña – CC) considerados como subproductos de la agroindustria, para la determinación del mejor medio de producción de esporas para su aplicación en programas de control biológico de helmintosis de bovinos en pruebas de pastoreo en campo.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Organismos fúngicos

Se utilizaron dos aislados fúngicos de suelos brasileños de especie *D. flagrans* (AC001 y CG722) y uno de especie *M. thaumasium* (NF34A) originarios de la micoteca del Laboratorio de Parasitología del Departamento de Veterinaria de La Universidad Federal de Viçosa y mantenidos a 4°C en la obscuridad en tubos de ensayo conteniendo medio Harina de Maíz Agar al 2% (HMA 2%).

2.2 Producción de estructuras fúngicas

Para evaluar la producción de conidios y clamidosporas, se utilizaron diferentes volúmenes de masa micelial (10, 15 y 20 mL). El criterio para establecer los inóculos iniciales para el crecimiento de los aislados fúngicos AC001, CG722 y NF34A, se basó en una prueba previa (en preparación) con diferentes medios líquidos, pH y tiempos de cultivo. Los volúmenes mencionados fueron utilizados como inóculo inicial, a los que se adicionaron 100 gramos de medios sólidos de crecimiento (sémola de arroz – QA; sémola de maíz - QM; bagazo de caña con melaza de caña - BC; paja de arroz con malaza de caña - PA y cáscara de café con melaza de caña - CC), que fueron esterilizados a 120°C y 1.5 atm por 15 minutos y acondicionados en matraces Erlenmeyer con capacidad para 250 mL. El experimento fue realizado por triplicado y después de los siete (7) días de incubación en una estufa BOD (Biological Oxygen Demand) a temperatura de 25°C, en cada matraz Erlenmeyer fueron adicionados 100mL de solución Tween 20 a una concentración de 0.05%. Los matraces fueron agitados vigorosamente y fueron tomadas nueve (9) alícuotas de 10 µL de cada matraz Erlenmeyer para la cuantificación de esporas bajo microscopia de luz con aumentos de

10 y 40x con la ayuda de una cámara de Fuchs Rosenthal. El promedio de esporas contenidas en las nueve alícuotas fue considerado para estimar la concentración promedio de esporas producidas.

3. RESULTADOS

Los aislados fúngicos AC001 y CG722 presentaron las mejores producciones de estructuras reproductivas en el medio QA ($p < 0,05$) (Tabla 1). El volumen de 20 mL de masa micelial utilizado como inóculo inicial resultó en una mayor recuperación de esporas para estos mismos aislados (Tabla 1).

El aislado NF34A presentó una baja o ausencia de producción de estructuras reproductivas en los diferentes volúmenes de masa micelial utilizados (Tabla 1).

El aislado CG722 presentó una mayor producción de conidios y clamidosporas cuando 20mL de masa micelial fueron agregados en 100 gramos de sémola de arroz ($p < 0,05$); mientras que el aislado AC001 obtuvo una producción intermedia, que no mostró diferencia estadística con el aislado NF34A ($p > 0,05$) (Tabla 2).

Dentro de los medios sólidos de cultivo evaluados (QA, QM, BC, PA, CC), el medio QA presentó la mayor producción de estructuras fúngicas y el medio BC la menor producción de conidios y clamidosporas (Tabla 1).

Cuando comparamos los diferentes volúmenes de micelio fúngico utilizados como inóculo (10, 15 o 20 mL), la mayor producción de conidios y clamidosporas fue observada cuando fueron inoculados con 20 mL de masa micelial sobre los medios sólidos de cultivo (Tabla 1 y 2).

4. DISCUSIÓN

Araújo et al. [2] mencionó que los hongos depredadores no son exigentes en su nutrición en cultivo y no necesita de medios complejos. Sin embargo la producción de conidios y/o clamidosporas por estos organismos son un factor importante, una vez que son necesarias una gran cantidad de esporas para producir formulaciones empleadas en programas de control biológico, y para la propagación y supervivencia de los hongos en condiciones ambientales [1]. En el presente estudio se observó que la producción de estructuras fúngicas se logró por medio de la utilización de medios alternativos, de preparación simple y a un bajo costo de producción, que son considerados como subproductos de la agroindustria.

Dhingra y Sinclair [6] dijeron que un buen medio de cultivo permite gran

esporulación y pequeño crecimiento micelial, siendo que, generalmente la esporulación es favorecida por el agotamiento nutricional, que es una condición adversa de crecimiento vegetativo; sin embargo, los medios pobres en nutrientes con poca fuente de Carbono (C) y nitrógeno (N) favorecen la formación de clamidosporas con supresión del crecimiento vegetativo debido al estrés nutricional. Según Bogus et al. [3] los mecanismos involucrados en la regulación de la formación de clamidosporas, así como la función exacta de estas esporas es desconocido y se demostraron que los medios de cultivo deficientes en nutrientes (MM y CMA) no producen clamidosporas o producen clamidosporas inmaduras, por otro lado en todos los medios ricos se estimula la producción de clamidosporas (p.ex. LB) en cuanto a las esporas producidas en los medio SAB y SAB-HP no se alcanzó la madurez que se obtuvo en las esporas en los medios SAB-GM. En el presente trabajo, los resultados observados se mostraron contradictorios con otros trabajos, pues como ha sido reportado los medios de cultivo sólidos con mayores niveles de Carbono y Nitrógeno (QA y QM) que según Magalhães et al. [13] tienen el 13.95 y 9.11% de proteína bruta respectivamente y 0.61 y 0.66% de aminoácidos de alanina, mostraron en el presente estudio una gran capacidad de producción de estructuras reproductivas, los que puede significar que otros nutrientes pueden ser limitantes para la producción de conidios y clamidosporas. Asimismo, se observó una elevada producción de estructuras reproductivas en el medio de cultivo QA, probablemente debido a una mayor riqueza de nutrientes presentes en este medio que según Dijksterhuis et al. [7] son considerados esenciales para el crecimiento y esporulación fúngica.

Maciel et al. [11] evaluaron la producción de *D. flagrans* (CG768), *A. robusta* (I31) y *M. thaumasium* (NF34A) en los medios de cultivo comerciales (Agar Agua - AA2%; Corn Meal Agar - CMA2%; extracto de levadura, 0,4%, K_2HPO_4 , 0,1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,05%, almidón soluble 2%, Agar 2% -YPSSA2% y Potato Dextrosa Agar - BDA2%) y observaron que los aislados CG768 y NF34A presentaron el mayor y menor número de esporas en los medios BDA2% y AA2%, respectivamente. En este mismo trabajo los autores registraron que el aislado I31 presentó producción de esporas intermediarias, no presentando diferencia estadística en relación a los demás ($p > 0,05$). Gardner et al. [8] observaron que la producción de clamidosporas de *D. flagrans* se incrementó en medio Agar Sabouraud dextrosa ($8,6 \times 10^5$ clamidosporas ml^{-1}) con un pH entre 5,5-7,5 y en un sistema bifásico (medio líquido Mueller-Hinton, 1%; extracto de levadura, 1%; K_2HPO_4 , 0,3%; $C_3H_3O_3Na$, 0,1%; glucosa, 0,05% - MYPG/ medio

sólido sales de Vogel). Las concentraciones de esporas observadas fueron de 6,2 y 5,6 $\times 10^5$ ml⁻¹, respectivamente, con la adición de almidón o glicerol. En relación al presente trabajo, se observó una similitud en los resultados obtenidos, donde los medios de cultivo pobres (subproductos fibrosos de la agroindustria) propiciaron una baja producción y los medios ricos en nutrientes esenciales (subproductos energéticos/protéicos) fueron más eficientes en la producción de estructuras reproductivas.

Según Mota et al. [14] después de la preservación con diferentes métodos de conservación *Arthrobotrys robusta* (aislado I31) presentó mayor producción de estructuras que *Monacrosporium thaumasium* (aislado NF34A) en medio de cultivo YPSSA, aunque una gran producción ha sido observada en ambos aislados. Sin embargo, estos resultados no concuerdan con los registrados en el presente trabajo, una vez que el aislado NF34A presentó una pequeña o nula producción de esporas en medios pobres en aminoácidos y ácidos grasos que para Dijksterhuis et al. [7] es considerado esencial para el crecimiento y esporulación. Y según Magalhães et al. [13] el bagazo de caña, la paja de arroz y la cáscara de café presentan, 1.82, 5.00 y 10.07% de proteína bruta y 3.99, 12.15 y 17.93% de ácido graso oléico, respectivamente y son considerados como forraje. Aunque Scholler e Rubner [17] definieron que la formación de clamidosporas es un síntoma de condición de crecimiento desfavorable, este efecto no fue observado en el presente trabajo.

5. CONCLUSIÓN

La producción de esporas mediante la utilización de subproductos de la agroindustria se mostró eficiente con cierta viabilidad técnica y económica. Los subproductos con mayor densidad proteica y energética p. ejemplo., la sémola de arroz, promovió una mayor eficiencia para la producción de estructuras reproductivas, así como el mayor inóculo inicial.

6. AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a FAPEMIG, CAPES y CNPq por el apoyo financiero para la ejecución de este trabajo.

7. CONFLICTO DE INTERÉS

Declaramos públicamente que no hay ningún conflicto de interés al respecto de este trabajo.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Araújo JV, Campos AK, Paiva F, Vieira-Bressan MCR. Efeito antagonista de fungos predadores do gênero *Arthrobotrys* sobre larvas infectantes de *Oesophagostomum radiatum*, *Cooperia punctata* e *Haemonchus placei*. Rev. Bras. Ciencia Vet. 2001; 8: 81-84.
2. Araújo JV, Mota MA, Campos AK. Controle biológico de helmintos parasitos de animais por fungos nematófagos. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 2004; 13: 165-169.
3. Bogus MI, Czygier M, Kedra E, Samborski J. In vitro assessment of the influence of nutrition and temperature on growing rates of five *Duddingtonia flagrans* isolates, their insecticidal properties and ability to impair *Heligmosomoides polygyrus* motility. Exp. Parasitol. 2005, 109: 115-123.
4. Braga FR. Ação in vitro de fungos das espécies *Duddingtonia falgrans*, *Monacrosporium sinense* e *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Fasciola hepatica* e *Schistosoma mansoni*. Viçosa: Brasil, 2008. 67p. Dissertação de mestrado em Medicina veterinária – Universidade Federal de Viçosa.
5. Cruz DG, Araújo FB, Molento MB, DaMatta RA, de Paula Santos C. Kinetics of capture and infection of infective larvae of trichostrongylides and free-living nematodes *Panagrellus* sp. by *Duddingtonia flagrans*. Parasitol. Res. 2011; 109: 1085-1091.
6. Dhingra OD, Sinclair JB. Basic plant pathology methods. 2nd edition. CRC Press, 1995.
7. 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. Lett. 1993; 94: 1-9.
8. Gardner K, Wiebe MG, Gillespie AT, Trinci APJ. Production of chlamydo-spores of the nematode-trapping *Duddingtonia flagrans* in shake flask culture. Mycol. Res. 2000; 104: 205-209.
9. Larsen M. Biological control in a global perspective – a review with emphasis on *Duddingtonia flagrans*. In: Biological Control of nematode parasites of small ruminants in Asia, FAO, Roma. 2002: 19-37.
10. Larsen M. Studies on the capacity of microfungi to destroy animal parasitic nematode. Copenhagen: Denmark, 1991. 61p. Thesis (PhD) – The Royal Veterinary and Agricultural University.
11. Maciel AS, Araújo JV, Campos AK. Viabilidade sobre larvas infectantes de

Ancylostoma spp dos fungos nematófagos *Arthrobotrys robusta*, *Duddingtonia flagrans* e *Monacrosporium thaumasium* após esporulação em diferentes meios de cultura. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 2006; 15: 182-187.

12. Liu XZ, Zhang KQ. Nematode-trapping species of *Monacrosporium* with special reference to two new species. Mycol. Res. 1994; 98: 862-868.

13. Magalhães KA, Valadares Filho SC, Pereira OG. Tabelas de composição de alimentos. In: Exigências nutricionais de zebuínos e tabelas de composição de alimentos BR-corte (1.ed.). Viçosa: UFV. 2006; 95-142.

14. Mota MA, Campos AK, Araújo JV. Influence of different storage methods on the predatory capacity of the fungi *Arthrobotrys robusta* and *Monacrosporium thaumasium* after passage through the bovine gastrointestinal tract. World J. Microbiol. Biotechnol. 2003; 19: 913-916.

15. Saxena G. e Mittal N. Trap formation by conidia of nematode-trapping *Monacrosporium* spp. Mycol. Res. 1995; 7: 839-840.

16. Sanyal PK, Sarkar AK, Patel NK, Mandal SC, Pal S. Formulation of a strategy for the application of *Duddingtonia flagrans* to control caprine parasitic gastroenteritis. J. Helminthol. 2008; 82: 169–174.

17. Scholler M, Rubner A. Predacious activity of the nematode destroying fungus *Arthrobotrys oligospora* in dependence of the medium composition. Microbiol. Res. 1994; 149: 145-149.

18. Silva ME, Araújo JV, Braga FR, Soares FEF, Rodrigues DS. Control of infective larvae of gastrointestinal nematodes in heifers using different isolates of nematophagous fungi. Rev. Bras. Parasitol. Vet. V. 2013; 22: 78-83.

19. Tavela AO, Araújo JV, Braga FR, Silva AR, Carvalho RO, Araújo JM, Ferreira SR, Carvalho GR. Biological control of cyathostomin (Nematoda: Cyathostominae) with nematophagous fungus *Monacrosporium thaumasium* in tropical southeastern Brazil. Vet. Parasitol. 2011; 175: 92-96.

20. Waller PJ, Faedo M, Ellis K. The potential of nematophagous fungi to control the free living stages of nematodes parasites of sheep: towards the development of a fungal controlled release device. Vet. Parasitol. 2001; 102: 321-330.

21. Zhang K, Liu X, Cao L, Gao R. A new species of *Arthrobotrys* from China. Mycol. Res. 1996; 100: 527-530.

Tabla 1 - Promedio de esporas producidas por diferentes aislados fúngicos en diferentes medios sólidos de cultivo después de 7 días de incubación a 26.5°C.

Inóculo (ml)	Medio de cultivo	Aislados fúngicos		
		AC001*	NF34A*	CG722*
10ml	QA	7,3x10 ⁴ (±2x10 ⁵)a	1,1x10 ⁴ (±3,3x10 ⁴)a	2x10 ⁵ (±4x10 ⁵)a
	QM	2,2x10 ³ (±4,1x10 ³)a	0ab	1,1x10 ³ (±3,3x10 ³)a
	BC	0a	1,1x10 ⁴ (±3,3x10 ⁴)ab	0a
	PA	3,4x10 ⁴ (±1,4x10 ⁴)a	1x10 ⁴ (±8,6x10 ³)a	0a
	CC	2,2x10 ³ (±4,1x10 ³)a	7,7x10 ³ (±9,7x10 ³)a	2,2x10 ³ (±6,6x10 ³)a
15ml	QA	3x10 ⁵ (±6x10 ⁵)a	0ab	5x10 ⁵ (±4x10 ⁵)b
	QM	2,6x10 ⁴ (±2x10 ⁴)a	0ab	0a
	BC	0a	1,5x10 ⁴ (±1,6x10 ⁴)a	0a
	PA	6,3x10 ⁴ (±2,9x10 ⁴)a	1,1x10 ⁴ (±1x10 ⁴)a	1,1x10 ³ (±3,3x10 ³)a
	CC	5,1x10 ⁴ (±6,7x10 ⁴)a	6,6x10 ³ (±1,3x10 ⁴)ac	0a
20ml	QA	2,5x10 ⁵ (±3x10 ⁵)a	0ab	5,2x10 ⁵ (±6,5x10 ⁵)b
	QM	3,4x10 ⁴ (±2,4x10 ⁴)a	0ab	3,3x10 ⁴ (±6,6x10 ⁴)a
	BC	0a	5,5x10 ³ (±8,8x10 ³)a	0a
	PA	1x10 ⁵ (±7,5x10 ⁴)a	6,6x10 ³ (±7x10 ³)a	0a
	CC	1,4x10 ⁴ (±2x10 ⁴)a	2,4x10 ⁴ (±1,8x10 ⁴)ac	0a

Promedios seguidos por diferentes letras minúsculas en las columnas no son estadísticamente diferentes(p>0.05) – prueba de Tukey

(QA – Sémola de arroz; QM – Sémola de Maíz; BC – Bagazo de caña; PA – Paja de arroz, CC – Cáscara de café)

* = Valores promedios de recuperación de esporas/clamidosporas después del período de incubación.

Tabla 2 - Promedios de esporas recuperadas después de la incubación de diferentes aislados fúngicos en diferentes medios sólidos de cultivo después de siete días de incubación.

Hongos	QA	QM	BC	PA	CC
AC001	2,5x10 ⁵ (3x10 ⁵)a	3.4x10 ⁴ (2,4x10 ⁴)a	0a	1x10 ⁵ (7,5x10 ⁴)a	1,4x10 ⁴ (2x10 ⁴)a
NF34A	0ab	0a	5,5x10 ³ (8,8x10 ³)a	6,6x10 ³ (7x10 ³)b	2,4x10 ⁴ (1,8x10 ⁴)ab
CG722	5,2x10 ⁵ (6,5x10 ⁵)ac	3,3x10 ⁴ (6,6x10 ⁴)a	0a	0b	0ac

Promedios seguidos por letras iguales las columnas no son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) - prueba de Tukey

(QA – Sémola de arroz; QM – Sémola de Maíz; BC – Bagazo de caña; PA – Paja de arroz, CC – Cáscara de café)

Nota: El inóculo inicial para cada hongo fue de 20 ml de una suspensión micelial.

CAPÍTULO 3

**“Control of infective larvae of gastrointestinal nematodes of heifers by isolates of
the nematophagous fungi”**

Artigo publicado na Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

(JCR 2011: 0.722 – Estrato Qualis B1)

Volume 22, páginas 78-83, 2013

**Control of infective larvae of gastrointestinal nematodes of heifers by isolates of
the nematophagous fungi**

Controle de larvas infectantes de nematóides gastrintestinais de novilhas por diferentes
isolados dos fungos nematófagos

Manoel Eduardo da Silva^{1B}

Jackson Victor de Araújo¹

Fabio Ribeiro Braga^{1a*}

Filippe Elias de Freitas Soares²

Daniel Sobreira Rodrigues^{3B}

ABSTRACT

The effect of different nematophagous fungi [*Duddingtonia flagrans* (AC001 and CG722) and *Monacrosporium thaumasium* (NF34)] on the control of infective larvae (L₃) of nematodes after gastrointestinal transit in bovine females (3/4 Holstein × Zebu) was evaluated. A total of 24 pubescent bovine females were used, weighing approximately 320 kg. There were three treatment groups; each contained six animals that received orally 150 g of pellets (0.2 g of mycelium), in a single dose, in a sodium alginate matrix containing mycelial mass of the fungi *D. flagrans* (AC001 or CG722), *M. thaumasium* (NF34) and a control group (without fungi). Faecal samples were collected from animals at intervals (12, 15, 18, 21, 24, 48 and 72 hours). At the end of 17 days, the L₃ not preyed were recovered by the Baermann method. The fungal isolates tested were capable of destroying the L₃ after gastrointestinal transit. It was observed that within 72 hours, the isolates AC001, CG722 and NF34 showed a higher predatory activity (81.2%, 97.3% and 98.3%, respectively). The results justify the need for studies in the field, and at longer intervals, in order to observe the efficiency of the fungi *D. flagrans* even *M. thaumasium* in the environmental control of nematodes of naturally infected cattle.

Keywords: Nematophagous fungi, *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium*, nematodes, cattle.

1. Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. B. a-Universidade de Vila Velha-ES. B. EPAMIG/URECO. 2. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo-Horizonte. 3. Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

MG. **Endereço para correspondência:** Dr. Fabio R. Braga. Deptº de Veterinária/UFV. Av. Ph Rolfes s/n, 36570-000 Viçosa, MG. Tel: 55 31 3899-1458.e-mail: fabioribeirobraga@hotmail.com

RESUMO

O efeito de diferentes fungos nematófagos [*Duddingtonia flagrans* (AC001 e CG722) e *Monacrosporium thaumasium* (NF34)] no controle de larvas infectantes (L3) de nematóides após o trânsito gastrointestinal em fêmeas bovinas (3/4 Holandês x Zebu) foi avaliado. Um total de 24 fêmeas bovina pubescentes foram utilizadas, pesando aproximadamente 320 kg. Havia três grupos de tratamento; cada um continha seis animais que receberam por via oral de 150 g de péletes (0,2g de micélio), em dose única, em uma matriz de alginato de sódio contendo massa micelial dos fungos *D. flagrans* (AC001 ou CG722), *M. thaumasium* (NF34) e um grupo controle (sem fungo). Amostras de fezes foram coletadas dos animais em intervalos (12, 15, 18, 21, 24, 48 e 72 horas). No final de 17 dias, as L3 não predadas foram recuperadas pelo método de Baermann. Os isolados de fungos testados foram capazes de destruir as L3 após trânsito gastrointestinal. Observou-se que dentro de 72 horas, os isolados AC001, CG722 e NF34 mostraram uma maior atividade predatória (81,2%, 97,3% e 98,3%, respectivamente). Os resultados justificam a necessidade de estudos a campo e em intervalos mais longos, a fim de observar a eficácia dos fungos *D. flagrans* ou mesmo *M. thaumasium* no controle ambiental dos nematóides de bovinos naturalmente infectados.

Palavras-chaves: Fungos nematófagos, *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium*, nematóides, bovinos.

1. INTRODUCTION

Cattle, goats and sheep represent one of the main sources of protein for the human population. However, one of the obstacles to their worldwide production is gastrointestinal helminthosis, most often responsible for damage to livestock, in which the estimated costs are about 68 million dollars a year, since almost all of the animals produced in the field harbour one or more species of helminth (ANUALPEC, 2003; TORINA et al., 2004; AMARANTE, 2009). In the world, the country that holds the largest commercial bovine herd is Brazil; however, due to the method of production, most often wholly or in part on pasture, there is constant infection by parasites present in the grazing land (ANUALPEC, 2003). Because of this, gastrointestinal nematodes are a serious problem in the production of ruminants; once the animals have been exposed to high parasite loads they may succumb, especially the younger ones that are the most susceptible (AMARANTE, 2009).

In this context, nematodes, especially the genus *Haemonchus*, are responsible for large economic losses in livestock (URQUHART et al., 1996). The conventional method to control such gastrointestinal parasites is the use of synthetic anthelmintic drugs. However, in recent decades there has been an increase in interest in the development of new methods to control nematode parasites of livestock, the main reason being the increasing development of anthelmintic resistance in several species of parasitic nematodes of ruminants, including anthelmintic resistance of nematode parasites of cattle (FIEL et al., 2001; ARAÚJO et al., 2004a; CONDI et al., 2009; SUTHERLAND and LEATHWICK, 2011).

Thus, the use of nematophagous fungi, in particular of the species *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium*, as an alternative control has been constantly tested, and with interesting results both in the field and laboratory conditions (BRAGA et al., 2009, 2011a; SILVA et al., 2009; PAZ-SILVA et al., 2011; TAVELA et al., 2011). In addition, the passage of different fungal structures, as well as of different isolates of the same species of fungus, through the gastrointestinal tract of different animal species has been the target of several studies (LARSEN, 1999; GRONVOLD et al., 1993, 1996). In this context, the challenge of these studies has been to investigate whether there are differences in viability and predatory activity of these fungi after suffering 'stress' during passage through the gastrointestinal tract of animals. The best fungal isolates need to be identified that can accommodate the characteristics of a potential biological control with a marketing purpose, as the production of

chlamydospores, resistant structures.

The objective of the present study was to evaluate the effect of different nematophagous fungi in the control of infective larvae (L₃) of gastrointestinal nematodes by nematophagous fungi after gastrointestinal transit in bovine females (3/4 Holstein × Zebu).

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Fungi

Two isolates of the nematophagous fungus *D. flagrans* (AC001 and CG722) and one isolate of the fungus *M. thaumasium* (NF34) were used. These isolates are from soil in Brazil. These isolates were obtained from Brazilian agricultural soil, in Viçosa city, Zona da Mata region of Minas Gerais state. They were collected using the soil-sprinkling method of Duddington (1955), modified by Santos et al. (1991).

2.2. Production of mycelial mass

For the formation of fungal mycelia of *D. flagrans* (AC001 and CG722) and *M. thaumasium* (NF34), culture discs of approximately 4 mm in diameter, in 2% water-agar (2% WA) were transferred to 250 ml Erlenmeyer flasks containing 150 ml of liquid medium GPY (glucose, sodium peptone and yeast extract), under agitation of 120 rpm, in the dark and at the temperature of 26°C for 10 days. After this period, the mycelia were removed, filtered, and weighed on an analytical balance. All procedures followed the methodology of Braga et al. (2009).

2.3. Animals

A total of 24 pubescent bovine females (3/4 Holstein × Zebu) with approximately 20 months old, were used, having approximately 320 kg live weight. During the whole experiment the animals were stabled and fed with sugarcane plus urea and concentrate with 16% protein. These animals are from the Santa Rita Experimental Farm, owned by Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG.

2.4. Experimental assay

For the *in vivo* assay, the animals were stabled and dewormed with Ivermectin 1% (Ivergen ®-Biogenesis; 200 µg/kg body weight) 45 days before receiving pellets containing mycelial mass (0.2 g of mycelium) of the isolates of *D. flagrans* (AC001 or CG722) and *M. thaumasium* (NF34) and pellets without fungus (control). Then they were separated into four groups of six animals each: one group was fed alginate pellets containing *D. flagrans* AC001; one group received pellets containing *D. flagrans*

CG722; a third group received pellets containing *M. thaumasium* NF34; and the fourth group remained as control group and was fed pellets without fungi.

Then, in the groups treated with AC001, CG722 and NF34, each animal received 150 g of pellets, in a single dose containing mycelial mass of fungi. For this, each one of the fungi was mixed in 500 g of feed for cattle with 16% protein. The animals from the control group received a single administration of 150 g of pellets without fungi plus 500 g of feed.

Later, after the administration of the fungi, faecal samples were collected from animals at intervals (12, 15, 18, 21, 24, 48 and 72 hours). About 30 g of faeces from each animal of the treated and control groups were homogenized to form a 'pool' for each experimental group. Next, from the faecal material collected ('pool') in the times after fungal administration, coprocultures were performed according to the technique described by Robersts;O'Sullivan (1950). From each set time (12, 15, 18, 21, 24, 48 and 72 hours), six repetitions for each coproculture were performed for each of the treated and control groups, totalling 24 samples per time and a total of 168 coprocultures. These coprocultures were incubated in a BOD chamber at 26°C and protected from light for 17 days. After this period the L₃ that had not been preyed upon were recovered in haemolysis tubes with the aid of the Baermann apparatus, and quantified and identified according to criteria proposed by Keith (1953). For this we used light microscope objectives of 10x and 40x. The data obtained were subjected to analysis of variance (*F* test) and subsequent regression analysis. Means were compared using the Tukey test at the 5% level of probability (AYRES et al., 2003).

3. RESULTS

In the present study, it was observed that the fungi *D. flagrans* (AC001 or CG722) and *M. thaumasium* (NF34) destroyed the L₃ of gastrointestinal nematodes after transit through the gastrointestinal tract of cattle. In the faeces of the treated groups, conidia and chlamydospores were identified of the fungal species tested (*D. flagrans* and *M. thaumasium*), as well as visualization of preyed L₃ (Figures 1a–d). For each time studied, the fungi showed a percentage reduction in the number of L₃ recovered by the Baermann method from the coprocultures after 17 days that varied from 87% to 81.2% for the AC001 isolate, from 88.4% to 97.3% for NF34 and from 98.2% to 98.3% for CG722 (Figure 2); comparisons with the control group are shown in Figure 3.

On the other hand, over the sampling time there was no difference ($p > 0.05$) in the action of the tested fungal isolates, and therefore in the recovery of L₃ at the end of 17 days. However, the CG722 isolate showed a better performance compared with AC001 and NF34. In relation to the identification of L₃ obtained from coprocultures, it was observed that the genus *Haemonchus* was the most prevalent with 69%, then *Oesophagostomum* with 26% and *Cooperia* with 5%.

4. DISCUSSION

The fungi tested (AC001, NF34 and CG722) were able to remain viable following gastrointestinal transit through naturally infected cattle, demonstrating their predatory activity at the end of the experiment (Figures 1a–d and Figure 2); therefore, they may be used in other studies in the field. It is worth remembering that in the present study, the genus *Haemonchus* was the most prevalent, confirming the studies cited above. Moreover, these results are compatible with other reports regarding the passage and predatory activity of nematophagous fungi in the control *in vitro* and *in vivo* of gastrointestinal nematodes of cattle (ARAÚJO et al., 2004b).

The use of nematophagous fungi for the biological control of gastrointestinal parasites of domestic animals reduces the contamination of soil, since they act directly on L₃ present in the environment (LARSEN, 1999; ARAÚJO et al., 2004a). Studies conducted in several regions in Brazil have shown a higher prevalence of the genera *Cooperia*, *Haemonchus*, *Oesophagostomum*, *Trichostrongylus*, *Trichuris* and *Bunostomum* in cattle (Furlong et al., 1985). This premise is in accordance with Lima (1989) who discussed that the L₃ of parasitic nematode species are available in pastures almost all year round, serving as a continuous source of infection for animals.

Regarding the results observed relating to the reduction of recovered L₃ from coprocultures, it was found that: (1) the three tested isolates (AC001, NF34 and CG722) showed similarity in predatory activity ($p > 0.05$), reflected thereby in a higher number of larvae destroyed; (2) the experimental assay was conducted in coprocultures; however, the same could be extrapolated for future assays in the field, especially with a longer time interval to be studied, noting that any one of the tested isolates may be used, save some peculiarities of each species (BRAGA et al., 2011b).

The literature reports that the most practical way for the utilization of the fungi *D. flagrans* (AC001 or CG722) and *M. thaumasium*, in addition to other nematophagous fungi, is the oral administration of fungal material as mycelium, conidia and/or

chlamydozoospores and the inoculation of these organisms in a sodium alginate matrix, 'pellets', a more recent method, which has presented good results (LARSEN, 1992; ARAÚJO et al., 2004a; DIAS et al., 2007; TAVELA et al., 2011). On the other hand, much has been discussed on the use of different isolates of the same species of fungus under the same conditions, in this case partly natural, and that could present distinct results. In relation to this fact, differences inter- and intra-specific in the predatory activity of nematophagous fungi are common and have already been observed in experiments with other fungal isolates (MENDOZA-DE-GUIVES et al., 1999).

The species *D. flagrans*, isolates AC001 and CG722, has been tested in laboratory conditions and in the field. In the past, Gronvold et al. (1993) observed a reduction of *Ostertagia ostertagi* L₃ in the faecal mass of calves, when fed with barley grain containing the fungus *D. flagrans*. In another study, Dias et al. (2007) demonstrated that the treatment of young bovine animals with pellets containing the fungus *D. flagrans* (CG722) was effective in reducing the EPG and consequently in reducing the number of L₃ of gastrointestinal nematodes obtained from coprocultures. Those results are in agreement with the present study, in which was also observed the efficiency of predation. However, it is worth remembering that even with no difference ($p > 0.05$) in the reduction of L₃ recovered from coprocultures, the isolate CG722 proved to be more efficient, with a percentage reduction of 98.3% compared with AC001 (81.2%) after 72 hours. However, there are few reports of comparison of the isolates AC001 and CG722 of *D. flagrans* species in the control of nematode parasites of naturally infected Holstein cattle.

Araújo et al. (2004b) evaluated the resistance of the nematophagous fungus *M. sinense* (isolate SF470) in passing through the gastrointestinal tract of cattle and then its predatory ability on infective trichostrongylid larvae after its passage. In that study, the authors reported a difference at the end of the experiment of 61.3% in the recovery of L₃ in the coprocultures. Furthermore, it was observed that the number of L₃ of gastrointestinal nematodes recovered from the animals of the control group was higher ($p < 0.05$) than that of the treated group. In another study, Araújo; Ribeiro (2003) demonstrated the capacity of the isolates *M. appendiculatum* (CGI) and *M. sinense* (SF53) to pass through the gastrointestinal tract of cattle and observed the presence of conidia after 14 days of incubation. Those results are in agreement with the present study, since the tested isolate *M. thaumasium* (NF34) was able to cause a reduction (97.3%) in the number of L₃ recovered at the end of 17 days, and, in addition, fungal

structures were also observed in agreement with this genus.

Finally, the use of nematophagous fungi for the biological control of nematode parasites of ruminants has been widely studied; however, the authors understand that this will only be possible after the involvement of industries in the development of fungal formulations. On the other hand, the results justify the need for studies in the field, at longer intervals, in order to observe the efficiency of fungi *D. flagrans* (AC001 or CG722) or *M. thaumasium* (NF34) in the environmental control of nematodes of naturally infected cattle, evaluating in the future the best approach for the integrated control of bovine helminths.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank FAPEMIG, CAPES and CNPq for financial support.

6. REFERENCES

- Amarante AFT. Nematoides gastrintestinais em ovinos. In: Cavalcante, A.C., Vieira, L.S., Chagas, A.C.S., Molento, M.B. Doenças parasitárias de caprinos e ovinos epidemiologia e controle. *Embrapa Informação Tecnológica*, Brasília, DF, 2009; p.17-63.
- Amarante AFT. Why is it important to correctly identify *Haemonchus* species? *Rev Bras Parasitol Vet* 2011; 20 (4): 263-268.
- Anualpec. Anuário estatístico da produção animal. São Paulo: *FNP Consultoria & Comércio* 2003, 380 p.
- Araújo JV, Assis RCL, Alves PH, Campos AK, Granda JR. Controle biológico de tricostrongilídeos (Nematoda: trichostrongyloidea) gastrintestinais de bovinos pelo fungo *Monacrosporium sinense*. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2004b; 56 (4): 467-468.
- Araújo JV, Mota MA, Campos AK. Controle de helmintos de animais por fungos nematófagos. *Rev Bras Parasitol Vet* 2004a; 13 (1): 165-169.
- Araújo JV, Ribeiro R. Atividade predatória sobre larvas de tricostrongilídeos (nematoda: trichostrongyloidea) de isolados fúngicos do gênero *Monacrosporium* após a passagem pelo trato gastrintestinal de bovinos. *Rev Bras Parasitol* 2003; 12 (2): 76-81.
- Ayres M, Ayres JRM, Ayres DL, Santos AS. Aplicações estatísticas nas áreas de ciências biológicas. Belém: Sociedade civil mamirauá: Brasília CNPq, p. 290, 2003.
- Braga FR, Araújo JV, Silva AR, Araujo JM, Carvalho RO, Kanadani AC et al.

Biological control of horse cyathostomin (Nematoda: Cyathostominae) with the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in tropical southeast Brazil. *Vet Parasitol* 2009; 163 (4): 335-340.

Braga FR, Araújo JV, Araujo JM, Tavela AO, Ferreira SR, Soares FEF et al. Influence of the preservation period in silica-gel on the predatory activity of the isolates of *Duddingtonia flagrans* on infective larvae of cyathostomins (Nematoda: Cyathostominae). *Exp Parasitol* 2011a; 128, 460–463.

Braga FR, Araújo JV, Soares FEF, Araujo JM, Ferreira SR, Frassy LN et al. Production and partial characterization of *Duddingtonia flagrans* (AC001) crude extract and its *in vitro* larvicidal action against trichostrongylid infective larvae. *Bioc Science Technol* 2011b, 21 (11): 1313-1320.

Condi GK, Soutello RVG, Amarante AFT. Moxidectin-resistance nematodes in cattle in Brazil. *Vet Parasitol* 2011; 161 (3-4): 213-217.

Dias AS, Araújo JV, Campos AK, Braga FR, Fonseca TA. Application of a formulation of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in the control of cattle gastrointestinal nematodioses. *World J Microbiol Biotechnol* 2007; 38 (9), 12454-1252.

Fiel CA, Saumell CA, Steffan PE, Rodriguez EM. Resistance of *Cooperia* to ivermectin treatments in grazing cattle of the Humid Pampa, Argentina. *Vet Par* 2001; 97 (3), 211-217.

Furlong J, Abreu HGL, Verneque RS. Parasitoses dos bovinos da zona da mata de Minas Gerais. I. Comportamento estacional de nematódeos gastrintestinais. *Pesq Agropec Bras* 1985; 20 (2): 143-153.

Gronvold J, Henriksen SA, Larsen M, Nansen P, Wolstrup J. Biological control Aspects of biological control ,with special reference to arthropods, protozoans and helminths of domesticated animals. *Vet Par* 1996; 64 (1-2): 47-64.

Gronvold J, Wolstrup J, Nansen P, Henriksen SA, Larsen M, Bresciani J. Biological control of nematode parasites in cattle with nematode trapping fungi: a survey of Danish studies. *Vet Parasitol* 1993; 48 (1-4): 311- 325.

Keith RK. The differentiation on the infective larvae of some common nematode parasites of cattle. *Australian J Zool* 1953; 1 (4): 223–235.

Larsen M. Biological control of helminthes. *Int J Parasitol* 1999; 29 (1): 139-146.

Larsen M, Wolstrup J, Henriksen SA, Gronvold J, Nansen P. *In vivo* passage through calves of nematophagous fungi selected for biocontrol of parasitic nematodes. *J Helminthol* 1992; 66 (2): 137-141.

- Lima WS. Dinâmica das populações de nematóides parasitos gastrintestinais em bovinos de corte, alguns aspectos da relação parasito-hospedeiro e do comportamento dos estádios de vida livre na região do Vale do Rio Doce, MG, Brasil. Ph.D Thesis, ICB, UFMG, Belo Horizonte, 1989, Brazil.
- Mendoza-De-Guives P, Davies KG, Clarck SJ, Behnke JM. Predatory behavior of trapping fungi against srf mutants od *Caenorhabditis elegans* and different plant and animal parasitic nematodes. *Parasitol* 1999; (1): 95-104.
- Paz-Silva A, Francisco I, Valero-Coss R, Cortiñas F, Sánchez J, Francisco R et al. Ability of the fungus *Duddingtonia flagrans* to adapt to the cyathostomin egg-output by spreading chlamydospores. *Vet Parasitol* 2011; 179 (1-3): 277-82.
- Roberts FHS, O'sullivan PJ, Riek RF. The epidemiology of parasitic gastro-enteritis of cattle. *Aust J Agric Res* 1952; 3 (2): 87-226.
- Silva AR, Araújo JV, Braga FR, Carvalho RO, Tavela AO, Frassy LN et al. Biological control of sheep gastrointestinal nematodiosis in a tropical region of the southeast of Brazil with the nematode predatory fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium*. *Parasitol Res* 2009; 105 (6): 1707-1713.
- Sutherland IA, Leathwick DM. Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle: a global issue? *Trends in Parasitol* 2011; 27 (4): 176-181.
- Tavela AO, Araújo, JV, Braga FR, Silva AR, Araujo JM, Carvalho RO et al. Biological control of cyathostomin (Nematoda: Cythostominae) with nematophagous fungus *Monacrosporium thaumasium* in tropical southeastern Brazil. *Vet Parasitol* 2011; 175 (1-2): 92-96.
- Torina A, Ferrantelli V, Sparagano OAE, Reale S, Vitale F, Caracappa S. Climatic conditions and gastrointestinal nematode egg production. Observation in breeding sheep and goats. *Ann.N.Y.Acad. Sci* 2004; 1026 (1): 203-209.
- Urquhart GM, Armour J, Duncan JL. *Veterinary Parasitology*. Blackwell Science. London, United Kingdom, 1996.



Fig. 1a–d. Infective larvae captured by nematophagous fungi [*Duddingtonia flagrans* (AC001 and CG722) and *Monacrosporium thaumasium* (NF34)] (white arrow) in Petri dishes containing 2% water–agar, and trap formation by the fungal isolates (black arrow). Magnification: (A) 10× and (D) 40× objective lens.

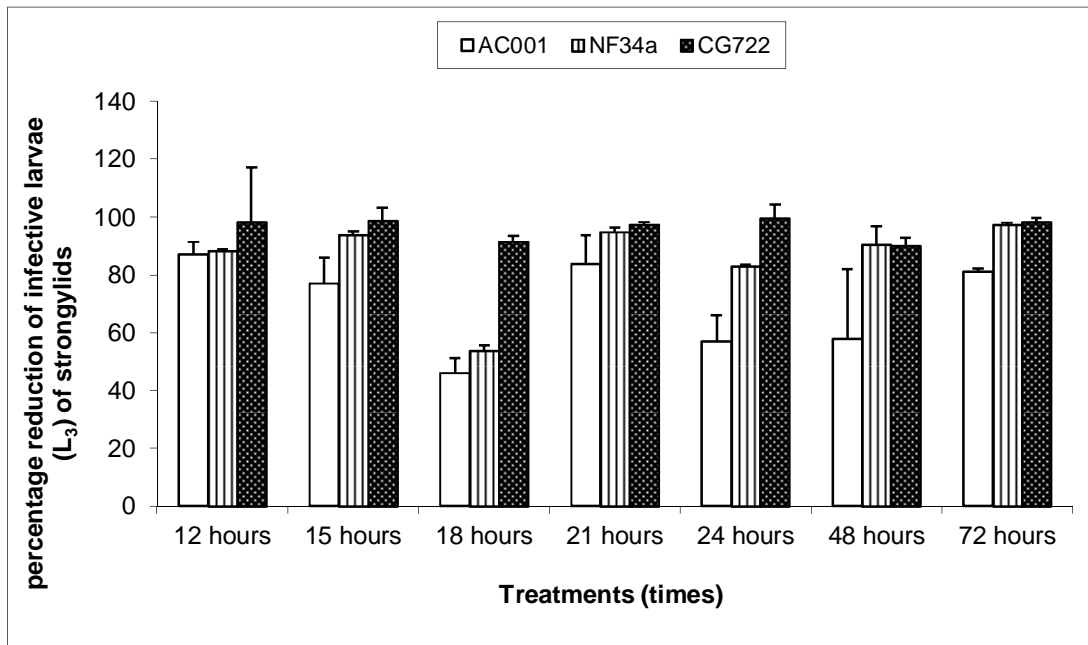


Fig. 2 - Mean reduction percentage of nematode infective larvae (L_3) recovered from coprocultures by the Baermann method after 17 days of incubation with the fungal isolates *Duddingtonia flagrans* (AC001 or CG722) and *Monacrosporium thaumasium* (NF34) at the time intervals of 12, 15, 18, 21, 24, 48 and 72 hours.

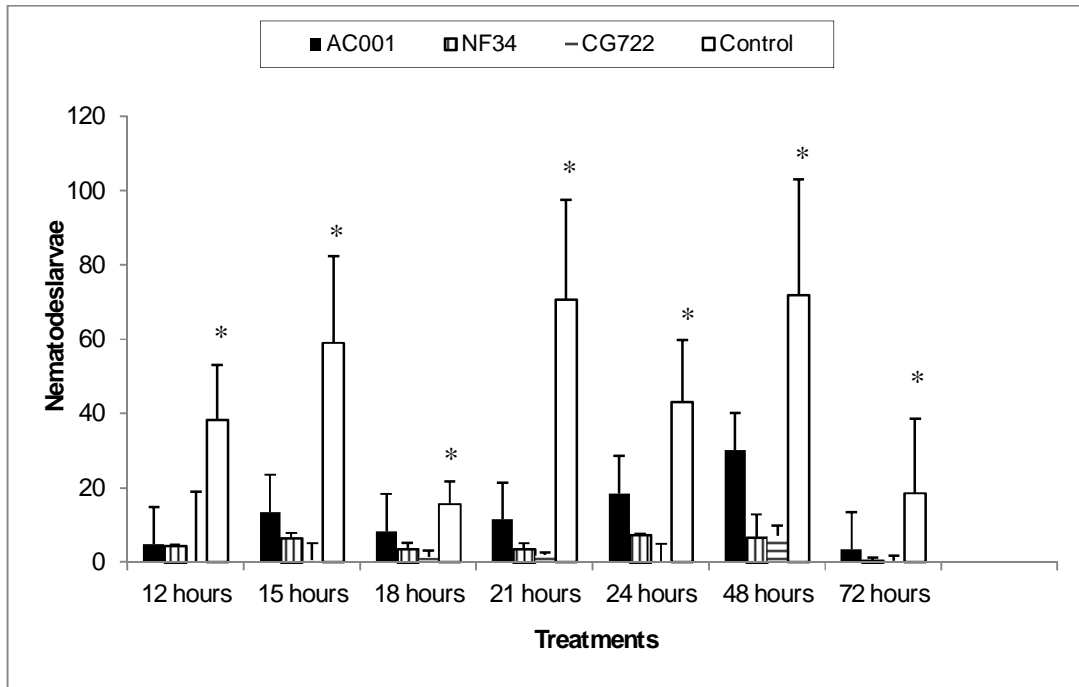


Fig. 3 - Mean number of infective larvae (L_3) recovered by the Baermann method from coprocultures after 17 days of treatment with the fungal isolates *Duddingtonia flagrans* (AC001 or CG722), *Monacrosporium thaumasium* (NF34) and the control group (without fungi). * Statistical difference ($p < 0.01$) among the isolates tested in relation to the control group at the sampling times.

CAPÍTULO 4

“Evaluation of the effectiveness of *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* in the biological control of gastrointestinal nematodes in female bovines bred in the semiarid region”

Artigo publicado na Revista Veterinary Research Communications

DOI: 10.1007/s11259-014-9590-5

(JCR 2012: 1.076)

Evaluation of the effectiveness of *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* in the biological control of gastrointestinal nematodes in female bovines bred in the semiarid region

Manoel Eduardo da Silva^{1,2}, Fabio Ribeiro Braga^{1,4}, Luana Alcântara Borges¹, Jair Mendes de Oliveira³, Walter dos Santos Lima⁵, Marcos Pezzi Guimarães⁵, Jackson Victor de Araújo^{1*}

¹Departamento de Veterinária, UFV, Viçosa, MG, Brasil.

²URECO/EPAMIG, Pitangui, MG, Brasil

³URENM/EPAMIG, Leme do Prado, MG, Brasil

⁴Universidade Vila Velha, Vila Velha, Espírito Santo, Brasil.

⁵Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil.

*Corresponding author: jvictor@ufv.br

ABSTRACT

Brazil has a herd of 212 million cattle and 171 million hectares of pastures that produce approximately 96% of Brazilian beef. The Brazilian production system enables animal infection by endoparasites, which are considered one of the main obstacles for the development of this industry and are responsible for considerable economic losses. The control of parasitic diseases is performed via the administration of antiparasitic drugs, but they leave residues of the products in the treated animal, affect non-target organisms and select resistant strains of the parasites. The species *D. flagrans* and *M. thaumasium* are promising and sustainable alternatives for controlling gastrointestinal helminths of ruminants and other herbivores. In this study, we evaluated the efficacy of isolates of these species, formulated in a sodium alginate matrix and administered twice a week, to reduce the number of environmental infective larvae of gastrointestinal nematodes that affect prepubescent zebu females. The treated animals presented fewer eggs and a lower number of infective larvae per gram of faeces ($p < 0.05$). The pastures occupied by treated animals showed a statistically significant reduction ($p < 0.05$) of the number of L₃ and, furthermore, the genera *Cooperia* sp., *Haemonchus* sp., and *Oesophagostomum* sp. were the most prevalent. The average weight of the animals did not differ statistically ($p > 0.05$) among the treated and control groups. The use of sodium alginate pellets as vehicle for delivery of the fungus mycelia *D. flagrans* (isolate AC001) and *M. thaumasium* (isolate NF34A) proved effective in controlling trichostrongylids in prepubescent cows bred in the semi-arid region, with an effective reduction in the number of infective larvae in the pastures.

Key words: Parasites, helminths, nematophagous fungus, beef cattle and zebu.

INTRODUCTION

Brazil has a herd of 212 million cattle, the largest commercial cattle herd in the world, and 171 million hectares of pastures responsible for producing approximately 96% of Brazilian beef (Abiec, 2013; Anualpec, 2012).

The Brazilian production system (extensive or semi-intensive) favours the frequent infection of animals with gastrointestinal nematodes, especially younger ones who have greater susceptibility, representing a major constraint to livestock production (Amarante, 2009). Endoparasites are considered one of the main obstacles to the full development of production activities and are responsible for major economic losses worldwide (Fortes et al., 2011).

Maintaining animal health becomes a challenge in production systems due to the misuse of the management alternatives available, such as chemotherapeutic treatments. Although widely used, drugs can leave residues in animal products, may have a toxic effect on non-target organisms in the environment and may facilitate the selection of parasitic species that are resistant to treatment. Therefore, there are limitations that must be considered in relation to the use of such products (Mendoza-de-Gives & Torres-Acosta, 2012).

The species *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* produce spores (conidia and / or chlamydospores) and mycelium capable of resisting the digestive process of ruminants and other herbivores and colonising faeces. Hyphae grow short tridimensional adhesive networks, constrictor rings and adhesives nodules that are able to capture and destroy nematode larvae (Cruz et al. 2011, Araujo et al. 2004; Sanyal et al., 2008, Braga, 2008).

The aim of this study was to evaluate the efficacy of a formulation in a sodium alginate matrix containing mycelium of the fungus *D. flagrans* (isolate AC001) and *M. thaumasium* (isolate NF34A) in the biological control of gastrointestinal nematodes in prepubescent female zebu cattle, bred in the Brazilian semi-arid region.

MATERIAL AND METHODS

46 prepubescent Zebu females, weaned, aged 7-9 months, free of gastrointestinal parasites were used, and they were separated by weight into six homogenous groups ($p > 0.05$) and kept for 6 months in pastures seeded with *Brachiaria brizantha* at 1 UA / ha. The pellet formulation was added to the concentrate to be given to the animals twice a week. Groups 1, 2, 3, 4, 5 and 6 were given, respectively, 5 grams of pellets without

the fungus addition, 10 grams of pellets without the fungus addition, 5 grams of the *D. flagrans* isolate AC001 pellet, 10 grams of AC001 isolate pellet, 5 grams of the *M. thaumasium* isolate NF34A pellet, 10 grams of the NF34A isolate pellet.

The experiment was conducted in Carbonita, in the meso-region of the Jequitinhonha River valley in Minas Gerais (17° 20' 25" South, 43° 12' 32" West and at an altitude of 620 metres). The AC001 and NF34A fungal isolates were obtained from the Fungal Culture Collection of the Veterinary Department of the Federal University of Viçosa DVT / UFV, grown in the liquid medium GPY (glucose, sodium peptone and yeast extract) and formulated in a sodium alginate matrix with 17% fungal mycelium, as proposed by Walker and Connick (1983) modified Lackey et al. (1993).

Pasture samples were taken every 28 days on alternate points of 0-20 and 20-40 cm away from the stool. Moreover, every 14 days, faeces samples were collected directly from the rectum to determine the number of eggs per gram of faeces (EPG) and reduction of larvae per gram of faeces (LPG) in the in vitro test. The animals were weighed every 28 days.

Rainfall was measured daily with a rain gauge installed on the farm, always at 9 am, and maximum and minimum temperatures were also measured using a thermometer.

The experiment was designed on a factorial scheme, fungal isolates x doses (eight repetitions, two fungal isolates and two dose levels) and two untreated control groups. The values of eggs per gram of faeces (EPG) and larvae per gram of faeces (LPG), after logarithmic transformation ($\log x+1$), weight gain of animals and Baermann method/technique for pastures were subjected to analysis of variance and compared with the Tukey test at a 1 and 5 % significance level using Bioestat 5 software.

RESULTS AND DISCUSSION

The number of eggs per gram of faeces (EPG) eliminated by the animals did not differ statistically ($p > 0.05$) among the treated and control groups, although there was a trend of linear decrease in egg elimination (Table 1), confirming the results obtained by Maingi et al. 2006; Waller et al. 2006 and Faessler et al. 2007 and demonstrating that the nematophagous fungi are environmental controllers and not act directly in the reduction of clinical parasitism. However, the species *D. flagrans* and *M. thaumasium* have previously demonstrated effectiveness in reducing the EPG after passing through

the gastrointestinal tract of bovines (Alves et al. 2003; Araujo et al. 2004; Dias et al. 2007; Jobim et al. 2008; Assis et al. 2012 and 2013; Silva et al., 2013). Moreover, for times after initial fungal dosage, animals in the control groups showed a statistically higher frequency of infection ($p > 0.05$) between time 0 (zero) and other times after treatment, thus showing a higher parasitic burden for the untreated animals compared to the treated groups (Table 1). Thus, applying the fungus for biocontrol should be done not only when there is heavy infestation of the free-living stages in the environment, but also when environmental conditions allow their growth.

Regarding the larvae present in the pastures, the groups treated with *D. flagrans* (10 g/animal) and *M. thaumasium* (10 g/animal) showed, at the end of the evaluation, a statistically significant reduction ($p < 0.05$) in the number of larvae recovered in relation to the other groups (Table 4), demonstrating efficiency of these isolates at this dosage, and confirming the works of Alves et al. 2003; Waller et al. 2004; the Gives et al. 2006; Faessler et al. 2007; Dias et al. 2007 and Assis et al. 2012. This fact demonstrates that even in low humidity conditions, the stool has enough moisture to allow fungal growth, predatory activity, and, thus, prevent clinical parasitism and productivity losses while maintaining a sufficient number of larvae for the animals to develop naturally acquired immunity (Waller & Larsen , 1993).

In the experimental period, the average temperature recorded was 24 °C, varying between 7 and 38 °C. The average daily rainfall registered for the months of March, April and May was, respectively, 4.3, 1.4 and 1.6 mm and in the other months (June, July and August) there was no precipitation. These environmental conditions are considered satisfactory for the development of the larvae of animal parasites (Freitas, 1982) and nematophagous fungi (Dhingra & Sinclair, 1995) (Figure 1).

In vitro test to evaluate the reduction of larvae the number of L₃ recovered in the faeces through the LPG technique showed a linear trend of growth from day 0 (zero) until the end of the evaluation, but the treated groups showed lower quantities of larvae ($p < 0.05$) compared to the control groups, demonstrating effectiveness in reducing infective larvae (L₃) of trichostrongylids in the "in vitro" test (Table 3). This especially applied to the group treated with *D. flagrans* at a dosage of 10 grams/ animal, which had the lowest quantity of larvae per gram of faeces, confirming the work of Kahn et al., 2007; Aguilar et al., 2008; Ojeda-Robertos et al., 2008; Assis et al. 2012 and demonstrating the ability of this isolate to pass through the gastrointestinal tract of ruminants without losing its predatory skill.

The genera *Cooperia* sp., *Haemonchus* sp. and *Oesophagostomum* sp. were the most prevalent in the assessments, confirming the works of Alves et al., 2003 and Jobim et al., 2008. Of these, the genus *Cooperia* sp. was the most prevalent (72%) infective agent of the animals.

The average weight of the animals showed no statistical differences ($p>0.05$) between the treated and control groups during the experimental period, but between the times of treatment, a gain in live weight was statistically significant ($p<0.05$) (Table 2). On the other hand, Waller et al., 2004; Dias et al., 2007, and Vilela et al., 2012 observed higher weight gain in sheep, cattle and goats, respectively, after fungal treatment.

CONCLUSION

The use of alginate pellets as a vehicle for fungal mycelium *D. flagrans* (isolate AC001) and *M. thaumasium* (isolate NF34A) proved effective in controlling trichostrongylids in prepubescent ruminant cows in the semi-arid region of the state of Minas Gerais - Brazil, and effectively reduced the number of infective larvae in pastures.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank FAPEMIG, CAPES and CNPq for their financial support and the owner of the Terra Branca Farm for allowing this experiment.

REFERENCES

- Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes – ABIEC.** Estatísticas. Disponível em: <www.abiec.com.br>. Acesso em: 10/07/2013
- Aguilar, J. A. C., de Gives, P. M., López-Arellano, M. E. & Hernández, E. L.** (2008) Evaluation of multinutritional pellets containing *Duddingtonia flagrans* chlamydospore for the control of ovine haemonchosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1149**, 161-163
- Alves, P. H., Araújo J. V., Guimarães, M. P., Assis, R. C. L., Sarti, P. & Campos, A. K.** (2003) Aplicação de formulação do fungo predador de nematóides *Monacrosporium thaumasium* (Drechsler, 1937) no controle de nematóides de bovinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **55**, 568-573
- Amarante, A. F. T.** (2009) Nematoides gastrintestinais em ovinos. In: Cavalcante, A. C., Vieira, L. S., Chagas, A. C. S. & Molento, M. B. (eds) *Doenças parasitárias de*

caprinos e ovinos epidemiologia e controle. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, pp 17-62.

Anuário da Pecuária Brasileira – ANUALPEC (2012) São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 378p.

Araújo, J. V., Guimarães, M. P., Campos, A. K., Sá, N. C., Sarti, P. & Assis, R. C. L. (2004) Control of bovine gastrointestinal nematode parasites using pellets of the nematode trapping fungus *Monacrosporium thaumasium*. *Ciência Rural* **34**, 457-463

Assis, R. C. L., Luns, F. D., Araújo, J. V. & Braga, F. R. (2012) Biological control of trichostrongyles in beef cattle by the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in tropical southeastern Brazil. *Experimental Parasitology* **132**, 373-377

Assis, R. C. L., Luns F. D., Araújo, J. V., Braga, F. R., Assis, R. L., Marcelino, J. L., Freitas, P. C. & Andrade, M. A. S. (2013) Comparison between the action of nematode predatory fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* in the biological control of bovine gastrointestinal nematodiasis in tropical southeastern Brazil. *Veterinary Parasitology* **193**, 134-140

Braga, F. R., Araújo, J. V., Campos, A. K., Silva, A. R., Araújo, J. M., Carvalho, R. o., Correa, D. N., Pereira, C. A. J. (2008) In vitro evaluation of the effect of the nematophagous fungi *Duddingtonia falgrans*, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on *Schistosoma mansoni* eggs. *World J Microbiol Biotechnol* **24**:2713-2716

Cruz, D. G., Araújo, F. B., Molento, M. B., DaMatta, R. A. & de Paula Santos, C. (2011) Kinetics of capture and infection of infective larvae of trichostrongylides and free-living nematodes *Panagrellus* sp. by *Duddingtonia flagrans*. *Parasitology Research* **109**, 1085-1091

De Gives, P. M., Zapata Nieto, C., Hernández, E. L., López-Arellano, M. E., Herrera, R. D. & González, G. R. (2006) Biological control of gastrointestinal parasitic nematodes using *Duddingtonia flagrans* in sheep under natural conditions in Mexico. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1081**, 355-359

Dias, A. S., Araújo, J. V., Campos, A. K., Braga, F. R. & Fonseca, T. A. (2007) Application of a formulation of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in the control of the cattle gastrointestinal nematodiasis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **23**, 1245-1252

Dhingra, O. D. & Sinclair J. B. (1995) Basic plant pathology methods. 2nd edition. CRC Press, Boca Raton.

- Faessler, H., Torgerson, P. R. & Hertzberg, H.** (2007) Failure of *Duddingtonia flagrans* to reduce gastrointestinal nematode infections in dairy ewes. *Veterinary Parasitology* **147**, 96-102
- Fortes, F. S., Pondelek, D. A. S. & Bier, D.** (2011) Nematoides gastrintestinais. In Chagas, A. C. S., Niciura, S. C. M. & Molento, M. B. (Eds) *Manual Prático: Metodologias de diagnóstico da resistência e de detecção de substâncias ativas em parasitas de ruminantes*. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica. pp. 13-16
- Freitas, M. G.** (1982) *Helminologia Veterinária*. 6ª edição. Belo Horizonte.
- Jobim, M. B., Santurio, J. M. & de la Rue, M. L.** (2008) *Duddingtonia flagrans*: controle biológico de nematodeos de bovinos a campo. *Ciência Rural* **38**, 2256-2263
- Kahn, L. P., Norman, T. M., Walkden-Brown, S. W., Crampton, A. & O'Connor, L. J.** (2007) Trapping efficacy of *Duddingtonia flagrans* against *Haemonchus contortus* at temperatures existing at lambing in Australia. *Veterinary Parasitology* **146**, 83-89
- Lackey, B. A., Muldoon, A. E. & Jaffe, B. A.** (1993) Alginate pellet formulation of *Hirsutiella rossiliensis* for biological control of plant-parasitic nematodes. *Biologic Control* **3**, 155-160
- Maingi, N., Krecek, R. C. & van Biljon, N.** (2006) Control of gastrointestinal nematodes in goats on pastures in South Africa using nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans* and selective anthelmintic treatments. *Veterinary Parasitology* **138**, 328-336
- Mendoza-de-Gives, P. & Torres-Acosta, F.** (2012) Biotechnological use of fungi in the control of ruminant parasitic nematodes. In Arias, M. S. & Paz-Silva, A. (Eds) *Fungi: types, environmental impact and role in disease*. Nova Editorial, New York, pp. 389-408
- Ojeda-Robertos, N. F., Torres-Acosta, J. F. J., Aguilar-Caballero, A. J., Ayala-Burgos, A., Cob-Galera, L. A., Sandoval-Castro, C. A., Barrientos-Medina, R. C. & Mendoza-de-Gives, P.** (2008) Assessing the efficacy of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores per gram of faeces to control *Haemonchus contortus* larvae. *Veterinary Parasitology* **158**, 329-335
- Sanyal, P. K., Sarkar, A. K., Patel, N. K., Mandal, S. C. & Pal, S.** (2008) Formulation of a strategy for the application of *Duddingtonia flagrans* to control caprine parasitic gastroenteritis. *Journal of Helminthology* **82**, 169-174
- Silva, M. E., Araújo, J. V., Braga, F. R., Soares, F. E. F. & Rodrigues, D. S.** (2013) Control of infective larvae of gastrointestinal nematodes in heifers using different

isolates of nematophagous fungi. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* **22**, 78-83

Vilela, V. L. R., Feitosa, T. F., Braga, F. R., Araújo, J. V., Souto, D. V. O., Santos, H. E. S., Silva, G. L. L. & Athayde, A. C. R. (2012) Biological control of goat gastrointestinal helminthiasis by *Duddingtonia flagrans* in a semi-arid region of the northeastern Brazil. *Veterinary Parasitology* **188**, 127-133

Walker, H. L. & Connick, W. J. (1983) Sodium alginate for production and formulation of mycoherbicides. *Weed Science* **31**, 333-338

Waller, P. J. & Larsen, M. (1993) The role of nematophagous fungi in the biological control of nematode parasites of livestock. *International Journal of Parasitology* **23**, 539-546

Waller, P. J., Schwan, O., Ljungström, B. L., Rydzik, A. & Yeates, G. W. (2004) Evaluation of biological control of sheep parasites using *Duddingtonia flagrans* under commercial farming conditions on the island of Gotland, Sweden. *Veterinary Parasitology* **126**, 299-315

Waller, P. J., Ljungström, B-L, Schwan, O., Rudby Martin L., Morrison D. A. & Rydzik A. (2006) Biological control of sheep parasites using *Duddingtonia flagrans*: trials on commercial farms in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica* **47**, 23-32.

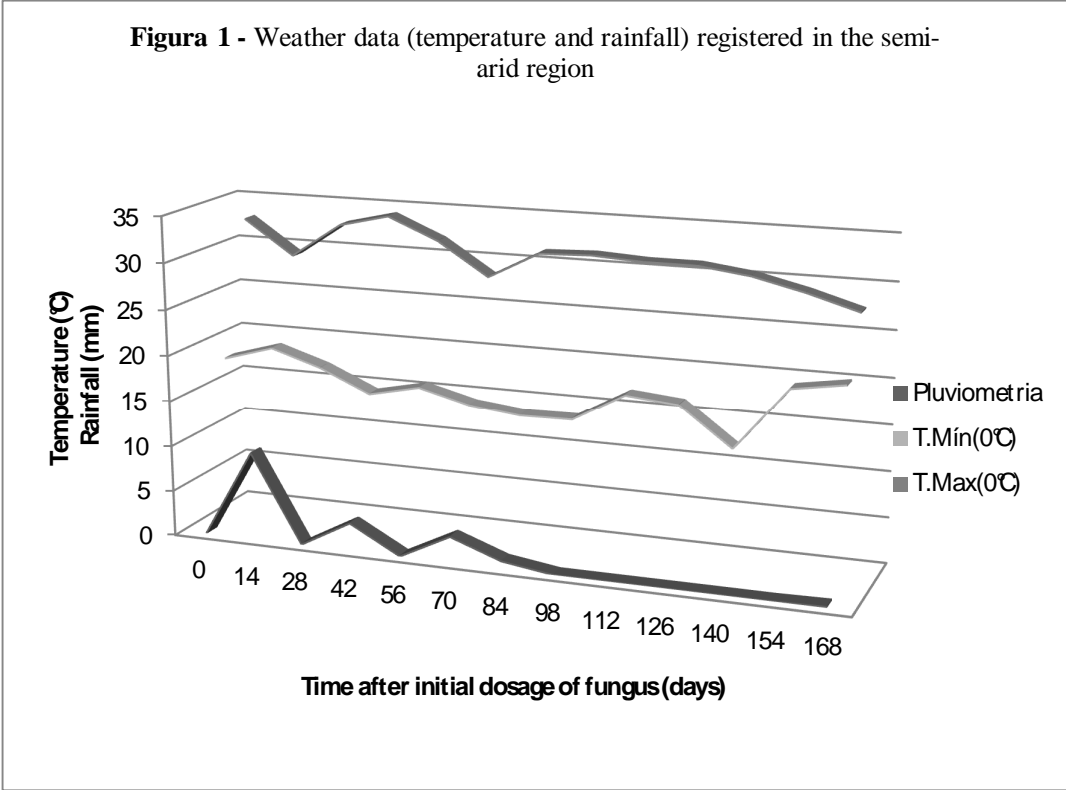


Figure 1 - Temperature (maximum and minimum) and rainfall climatological data observed during the experimental evaluation of different fungal isolates and doses administered to female prepubescent cattle under grazing conditions in a semi-arid region.

Table 1 - Average and standard deviation of the number of eggs per gram of faeces (EPG), counted on female bovines after receiving different doses of the fungal isolates of *D. flagrans* (AC001) and *M. thaumasium* (NF34A).

TREATMENT	0	14	28	42	56	70	84	98	112	126	140	154	168
	DPFA*	DPFA*	DPFA*	DPFA*	DPFA*	DPFA*	DPFA*	DPFA*	DPFA*	DPFA*	DPFA*	DPFA*	DPFA*
CONTROL	0Aa (0)	7Aa (±18)	92Aa (±130)	50Aa (±91)	28Aa (±26)	164Ab (±118)	128Aba (±118)	128Ab (±152)	50Aa (±40)	142Ab (±117)	125Ab (±125)	100Aa (±114)	100Aa (±94)
CONTROL	0Aa (0)	7Aa (±18)	35Aa (±55)	35Aa (±55)	121Aa (±125)	157Aba (±218)	114Aba (±134)	28Aa (±26)	92Aba (±117)	171Aa (±234)	221Ab (±308)	157Ab (±136)	278Ab (±399)
AC001/5G	0Aa (0)	0Aa (0)	106Aa (±172)	268Aa (±587)	268Aa (±443)	106Aa (±129)	275Aa (±618)	225Aa (±389)	100Aa (±169)	156Aa (±293)	131Aa (±146)	200Aa (±243)	331Aa (±387)
AC001/10G	0Aa (0)	0Aa (0)	156Aa (±441)	6Aa (±17)	43Aa (±49)	75Aa (±119)	137Ab (±140)	50Aa (±80)	106Aa (±134)	175Ab (±164)	106Aa (±111)	125Ab (±88)	62Aa (±69)
NF34A/5G	0Aa (0)	0Aa (0)	75Aa (±212)	43Aa (±72)	112Aa (±182)	68Aa (±136)	162Aa (±195)	125Aa (±237)	200Aa (±381)	193Aa (±323)	243Ab (±388)	125Aa (±162)	237Aa (±417)
NF34A/10GR	0Aa (0)	0Aa (0)	81Aa (±99)	137Aa (±199)	137Ab (±118)	162Aa (±266)	212Ab (±269)	81Aa (±99)	125Aa (±162)	181Aa (±346)	106Aa (±101)	256Aa (±325)	231Ab (±257)

Different lowercase letters in rows mean that there is statistical difference ($p > 0.05$) - Tukey test

Same capital letters in columns mean that there is no statistical difference ($p > 0.05$) - Tukey test

* Days after initial fungal pellet distribution (DPFA)

Table 02 - Average weight and standard deviation of female bovines (kg) observed after the administration of different doses of the fungal isolates of *D. flagrans* (AC001) and *M. thaumasium* (NF34A).

TREATMENT	0 DPFA*	28 DPFA*	56 DPFA*	84 DPFA*	112 DPFA*	140 DPFA*	168 DPFA*
CONTROL	222,28Aa (±49,2)	245,85Aa (±53.7)	268,14Aa (±52.6)	275,85Aa (±44.7)	290,71Aa (±47.4)	295,83Aa (±46.3)	292,83Aa (±44.8)
CONTROL	218,71Aa (±25,0)	243.42Aa (±30.4)	255.14Aa (±29.7)	268.57Ab (±32.0)	282.42Ab (±27.8)	276.57Ab (±31.6)	281.71Ab (±30.3)
AC001 5GR	221,0Aa (±19,0)	252.25Ab (±20.5)	274.62Ab (±19.4)	282.12Aba (±19.2)	283.87Aba (±18.3)	286.25Aba (±16.4)	294.5Aba (±16.3)
AC00110GR	220,0Aa (±49,4)	248.62Aa (±50.7)	255.37Aa (±53.8)	267.75Aa (±53.9)	267.25Aa (±48.2)	261.0Aa (±52.0)	267.62Aa (±53.6)
NF34A 5GR	222,0Aa (±33,2)	233.62Aa (±32.0)	264.0Aa (±31.3)	274.0Aba (±30.5)	276.62Aba (±35.1)	278.5Aba (±33.3)	282.0Aba (±31.4)
NF34A10GR	227,62Aa (±34,1)	239.87Aa (±33.9)	257.25Aa (±33.1)	265.75Aa (±31.3)	270.37Aa (32.3)	270.75Aa (±32.9)	270.5Aa (±32.5)

Different lowercase letters in rows mean that there is statistical difference (p> 0.05) - Tukey test

Same capital letters in columns mean that there is no statistical difference (p> 0.05) - Tukey test

* Days after initial fungal pellet distribution (DPFA)

Table 03 - Average and standard deviation of the number of larvae per gram of faeces (LPG) recovered after administration of different doses of the fungal isolates of *D. flagrans* (AC001) and *M. thaumasium* (NF34A).

TREATMENT	0 DPFA*	28 DPFA*	56 DPFA*	84 DPFA*	112 DPFA*	140 DPFA*	168 DPFA*
CONTROL	0.83Aa (±0.24)	41.53Ab (±15.94)	7.65Aab (±2.23)	45.12Ab (±23.56)	54.04Ab (±7.14)	34.81Aba (±24.02)	39.33Ab (±25.98)
CONTROL	4.12Aa (±1.78)	33.92Ab (±20.73)	25.15Aa (±9.66)	17.36Bab (±5.98)	31.27Aab (±17.95)	40.39Aba (±19.58)	38.98Aba (±22.55)
AC001 5gr	3.59Aa (±2.24)	58.75Ab (±26.25)	92.82Bb (±49.66)	53.21Ab (±11.33)	71.16ABb (±17.86)	37.2Aab (±14.88)	47.83Aab (±29.33)
AC001 10gr	4.56Ba (±2.5)	26.30ABb (±9.89)	6.76Aa (±3.41)	13.91Bab (±5.41)	14.10Bab (±10.11)	12.21Aab (±9.75)	13.54Aab (±14.83)
NF34A 5gr	5.57Ba (±0.83)	3.63Ba (±1.79)	23.26Aa (±11.90)	27.33Aa (±14.79)	56.14Ab (±15.54)	60.47ABb (±20.33)	44.23Aba (±18.95)
NF34A 10gr	3.53Aa (±2.67)	23.73Aba (±11.97)	69.4Bb (±42.60)	33.57Aab (±17.26)	32.29Aab (±14.83)	32.24Aab (±10.80)	35.86Aab (±19.31)

Different lowercase letters in rows mean that there is statistical difference ($p > 0.05$) - Tukey test

Same capital letters in columns mean that there is no statistical difference ($p > 0.05$) - Tukey test

* Days after fungal pellet distribution

Table 04 Average and standard deviation of the number of trichostrongylids larvae recovered per kg / MS after administration of different doses of the fungal isolates *D. flagrans* (AC001) and *M. thaumasium* (NF34A).

TREATMENT	0 DPFA*	28 DPFA*	56 DPFA*	84 DPFA*	112 DPFA*	140 DPFA*	168 DPFA*
CONTROL	281.95Aa (±443.63)	2390.08Aa (±4615.05)	3.77Aa (±9.23)	170.36Aa (±281.67)	213.49Aa (±138.35)	101.21Aa (±66.46)	73.37Aa (±9.47)
CONTROL	281.95Aa (±443.63)	4088.25Aa (±7098.83)	13.89Aa (±21.52)	762.21Aa (±1261.07)	222.62Aa (±94.59)	108.11Aa (±31.57)	109.86Aa (±74.96)
AC001 5GR	281.95Aa (±443.63)	344.99Aa (±510.31)	3.96Aa (±9.7)	21.41Aa (±27.08)	248.85Aa (±75.20)	99.23Aa (±77.77)	71.09Aa (±33.18)
AC001 10GR	281.95Aa (±443.63)	941.9Aab (±1040.38)	76.55Aac (±88.24)	17.73Aac (±24.87)	228.9Aab (±96.15)	78.2Aac (±30.07)	24.9ABac (±30.5)
NF34A 5GR	281.95Aa (±443.63)	1421.56Aa (±1692.17)	9.33Aa (±22.85)	2011.21Aa (±4481.5)	197.76Aa (±82.9)	147.68Aa (±54.85)	42.93Aa (±55.39)
NF34A 10GR	281.95Aa (±443.63)	1957.34Aa (±3102,19)	93.56Aa (±159.28)	12886.74Aa (±19700.41)	894.63Ba (±569.47)	220.58ABa (±139.52)	30.92Aba (±36.04)

Different lowercase letters in lines mean that there is statistical difference (p> 0.05) - Tukey test

Same capital letters in columns mean that there is no statistical difference (p> 0.05) - Tukey test

* Days after fungal pellet distribution

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os meios líquidos de cultivo soja dextrose (SD) e quirera de milho (CG) com valores de pH ajustados para 6.0-7.0 se mostraram eficientes para produção de massa micelial dos fungos *D. flagrans* e *M. thaumasium*;

Os subprodutos da agroindústria testados se mostraram eficientes, com viabilidade técnica e econômica para produção de esporos fúngicos (conídios e/ou clamidósporos) de *D. flagrans* e *M. thaumasium*;

Os subprodutos com maior densidade protéica e energética (quirera de arroz – QA e quirera de milho – QM), assim como o maior inóculo inicial, foram mais eficientes na produção de estruturas reprodutivas;

Os resultados encontrados na produção de massa micelial e de esporos fúngicos terão importante implicação em futuros trabalhos que objetivem avaliar a administração oral destas estruturas como estratégia de controle biológico de nematoides gastrintestinais parasitas de animais de produção;

Os resultados encontrados no teste de passagem e redução de larvas *in vitro* justificam a necessidade de estudos à campo, por períodos prolongados, para avaliar a eficiência dos fungos *D. flagrans* (AC001 e CG722) e *M. thaumasium* (NF34A) no controle ambiental de nematoides em bovinos naturalmente infectados sob diferentes condições ambientais, buscando a melhor maneira para estabelecer o controle integrado das helmintoses bovinas;

O uso de péletes de alginato de sódio como veículo para administração de micélio fúngico de *D. flagrans* (AC001) e *M. thaumasium* (NF34A) mostrou-se efetivo na redução do número de larvas infectantes de tricontrongilídeos em pastagens na região semi-árida do estado de Minas Gerais – Brasil.

ANEXOS

CAPÍTULO 1

“Mycelial mass production of fungi
Duddingtonia flagrans and *Monacrosporium*
thaumasium under different culture conditions”

Tabela 01 – Produção de massa micelial (em gramas) do fungo *Duddingtonia flagrans* (isolado AC001) sob diferentes condições de cultivo (meios, tempos e pH).

<i>Duddingtonia flagrans</i> (isolado AC001)																				
pH	SD – Soja Dextrose					BD – Batata Dextrose					QM – Quirera de milho					CMA – Corn Meal Ágar				
	24 hs	48 hs	72 hs	96 hs	168 hs	24 hs	48 hs	72 hs	96 hs	168 hs	24 hs	48 hs	72 hs	96 hs	168 hs	24 hs	48 hs	72 hs	96 hs	168 hs
4	0,2825	0,3534	0,8837	0,1534	0,2722	0,0555	0,2186	0,2745	0,3117	0,1837	0,0000	0,0200	1,1629	0,1957	0,1404	0,0235	0,1567	0,2215	0,1334	0,0000
	0,5410	0,4795	0,4803	0,3103	0,2884	0,2479	0,2760	0,4204	0,2957	0,3550	0,0105	1,9536	0,8278	0,7588	0,5495	0,0069	0,1631	0,1510	0,1470	0,0447
	0,2226	0,5636	0,4714	0,3153	0,3015	-	0,2026	0,1946	0,3043	0,2680	1,9549	0,9321	1,0660	1,6371	0,5885	0,0026	0,0714	0,1750	0,1443	0,1461
5	0,5521	0,6911	0,6556	1,3154	1,3939	0,0456	0,5454	0,4768	0,2903	0,5405	1,6576	1,5681	1,8785	0,6459	1,4163	0,0000	0,0692	0,1300	0,0378	0,1120
	0,3566	0,5260	0,4144	1,4368	1,2796	0,0915	0,2115	0,2620	0,2080	0,5285	1,1496	1,4924	1,7565	1,4048	0,0000	0,0040	0,0987	0,1109	0,1019	0,1826
	0,3136	0,5717	0,8589	0,5684	0,8619	0,0588	0,3208	0,5112	0,2038	0,5477	1,4148	1,2474	1,4289	1,3774	1,8153	0,0000	0,0689	0,1068	0,1171	0,1821
6	0,2596	0,3621	0,7757	0,5800	1,1754	0,0565	0,3686	0,1405	0,1753	0,6362	1,3149	2,2209	1,2607	1,3669	1,2545	0,0964	0,1418	0,1909	0,2501	0,1710
	0,1241	0,6129	0,9456	0,5551	1,2390	0,0636	0,1915	0,6998	0,1594	0,8303	0,4074	1,4317	1,0251	0,8864	1,7992	0,1127	0,1368	0,1394	0,1452	0,1328
	0,1121	0,5266	0,4890	0,6449	1,0377	0,5630	0,2511	0,4479	0,1277	0,7337	2,1685	1,2475	1,7763	0,9470	1,4673	0,0875	0,1733	0,1578	0,1300	0,1976
7	0,1157	0,0986	0,7398	1,4905	0,7577	0,0756	0,3194	0,5025	0,1527	0,8894	1,3356	0,5466	1,4804	0,7563	1,0803	0,1181	0,1087	0,1553	0,1270	0,1211
	0,2460	0,1910	0,4937	0,6223	0,7314	0,0680	0,2504	0,3224	0,2191	0,7412	2,3924	1,0926	2,1389	0,9722	0,0000	0,1250	0,1289	0,1388	0,1539	0,1849
	0,2231	2,9247	0,5332	0,8683	0,7927	0,1542	0,2232	0,3981	0,2354	0,7097	1,8740	1,7119	2,2756	1,0751	0,4571	0,0066	0,1177	0,1363	0,1449	0,1393

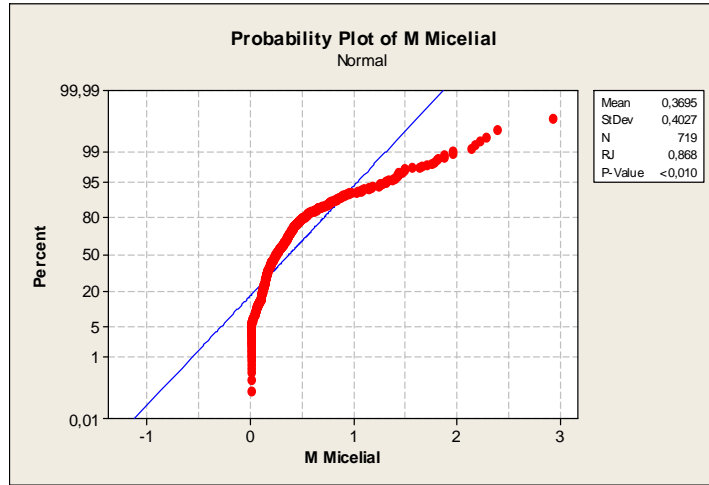
Tabela 02 – Produção de massa micelial (em gramas) do fungo *Duddingtonia flagrans* (isolado CG722) sob diferentes condições de cultivo (meios, tempos e pH).

<i>Duddingtonia flagrans</i> (isolado CG722)																				
pH	SD – Soja Dextrose					BD – Batata Dextrose					QM – Quirera de milho					CMA – Corn Meal Ágar				
	24 hs	48 hs	72 hs	96 hs	168 hs	24 hs	48 hs	72 hs	96 hs	168 hs	24 hs	48 hs	72 hs	96 hs	168 hs	24 hs	48 hs	72 hs	96 hs	168 hs
4	0,2866	0,2099	0,2761	0,2498	0,3507	0,1649	0,1709	0,1896	0,2356	0,2639	0,0000	0,2183	0,1427	0,1602	0,0000	0,0347	0,1635	0,1135	0,1248	0,0002
	0,2947	0,2032	0,2616	0,2817	0,6792	0,1308	0,1761	0,2217	0,2384	0,2661	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,1356	0,0041	0,0594	0,0077	0,1238	0,1176
	0,2480	0,2149	0,2470	0,3145	0,9516	0,1721	0,2188	0,2245	0,2305	0,2465	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,3214	0,1913	0,1053	0,1177	0,2195
5	0,1958	0,2446	0,2570	0,2822	1,2945	0,1574	0,2212	0,2325	0,2339	0,2392	0,0000	0,0000	0,2992	0,0000	0,0000	0,0260	0,0488	0,0410	0,0677	0,0223
	0,1874	0,2528	0,2300	0,3018	0,7483	0,1349	0,2028	0,2699	0,3624	0,2277	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,1145	0,1193	0,0250	0,0716	0,0000
	0,2881	0,2591	0,2659	0,3263	0,8776	0,1719	0,2242	0,2779	0,2377	0,2347	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0768	0,0549	0,0171	0,0632	0,0354
6	0,1568	0,1733	0,2593	0,4338	1,4242	0,2735	0,1658	0,2912	0,5343	0,4115	0,4754	0,5286	0,5852	0,4086	0,1833	0,0408	0,0524	0,0969	0,0709	0,1490
	0,1318	0,1529	0,1896	0,3351	0,5018	0,1667	0,2202	0,2840	0,3580	0,4353	0,4648	0,0160	0,2071	0,1750	0,1390	0,0235	0,0000	0,1055	0,0801	0,1265
	0,1776	0,1514	0,1896	0,4161	1,3137	0,1462	0,1533	0,3748	0,3591	0,4504	0,9109	0,3127	0,6775	0,5675	0,2059	0,0134	0,0222	0,0795	0,0969	0,0920
7	0,1602	0,1319	0,2308	0,3476	0,8718	0,1978	0,1936	0,4230	0,7631	0,3309	0,0389	0,1443	0,5611	0,3098	0,4540	0,0392	0,0523	0,0470	0,1452	0,0218
	0,1258	0,1561	0,3547	0,2636	0,6146	0,2121	0,2855	0,2410	0,2906	0,3400	0,0000	0,2580	0,4463	0,2746	0,0000	0,0378	0,0269	0,0359	0,0719	0,0444
	0,1424	0,1738	0,2545	0,2906	1,1452	0,1992	0,1882	0,5073	0,4180	0,2571	0,3986	0,1567	0,3505	0,4463	0,1585	0,0984	0,0660	0,1146	0,0774	0,0531

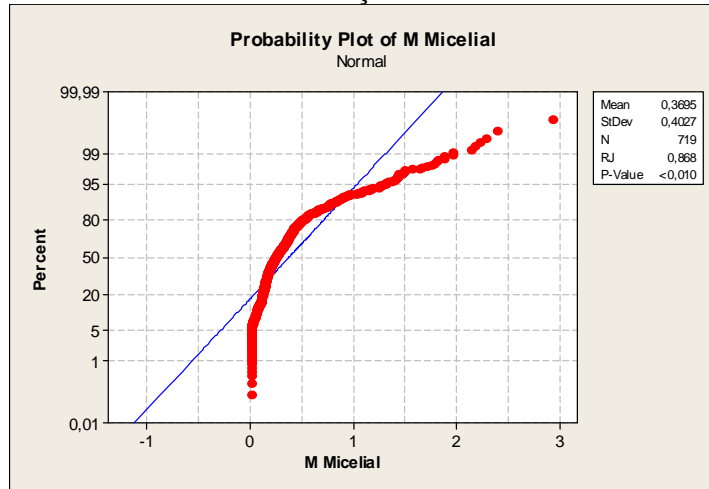
Tabela 03 – Produção de massa micelial (em gramas) do fungo *Monacrosporium thaumasium* (isolado NF34A) sob diferentes condições de cultivo (meios, tempos e pH).

<i>Monacrosporium thaumasium</i> (isolado NF34A)																				
pH	SD – Soja Dextrose					BD – Batata Dextrose					QM – Quirera de milho					CMA – Corn Meal Ágar				
	24 hs	48 hs	72 hs	96 hs	168 hs	24 hs	48 hs	72 hs	96 hs	168 hs	24 hs	48 hs	72 hs	96 hs	168 hs	24 hs	48 hs	72 hs	96 hs	168 hs
4	0,6000	0,4123	0,3998	0,3818	0,6503	0,0921	0,1644	0,1086	0,1446	0,4797	0,2831	0,3909	0,3537	0,3358	0,3376	0,1401	0,1097	0,0000	0,0539	0,1400
	0,4116	0,3591	0,4582	0,3243	0,4720	0,1203	0,1133	0,1056	0,1466	0,4064	0,2004	0,3433	0,4043	0,4083	0,3239	0,0892	0,0263	0,0000	0,0000	0,1308
	0,4155	0,3028	0,4639	0,3890	0,4015	0,1333	0,1107	0,1223	0,1251	0,3641	0,3663	0,3464	0,3835	0,3555	0,3558	0,0484	0,0953	0,0994	0,0981	0,3333
5	0,3743	0,3728	0,4058	0,3726	0,8226	0,1961	0,1396	0,1927	0,2255	0,8048	0,3783	0,4764	0,4317	0,3492	0,4227	0,1874	0,1417	0,1754	0,1605	0,2043
	0,3664	0,4323	0,4440	0,3728	0,6272	0,2591	0,1507	0,2000	0,1880	0,7874	0,3193	0,3652	0,3885	0,3794	0,3137	0,0683	0,1360	0,1429	0,1077	0,1196
	0,3904	0,3446	0,4171	0,3298	0,4935	0,1954	0,1409	0,1982	0,2953	0,8200	0,3891	0,3932	0,3466	0,3984	0,3210	0,0582	0,1040	0,1557	0,0965	0,1003
6	0,3070	0,3906	0,5015	0,4670	0,5229	0,8385	0,2062	0,1457	0,1276	0,1367	0,2349	0,3619	0,3678	0,3756	0,4081	0,1995	0,1159	0,1462	0,1375	0,1886
	0,3404	0,3684	0,4054	0,6251	0,7189	0,5138	0,2630	0,1615	0,1330	0,1075	0,3885	0,3708	0,3376	0,3269	0,3694	0,0775	0,1659	0,1694	0,1301	0,1009
	0,3960	0,5597	0,4781	0,6457	0,5406	0,4711	0,2228	0,1320	0,1481	0,1483	0,3542	0,3150	0,4130	0,3387	0,3189	0,1029	0,1257	0,1138	0,1158	0,1057
7	0,2680	0,4223	0,6894	1,1631	1,1393	0,6764	0,2677	0,1043	0,1066	0,1255	0,3932	0,4456	0,3465	0,4402	0,4564	0,1639	0,1830	0,1641	0,2470	0,1950
	0,3190	0,6369	0,7510	0,8364	0,7809	0,9191	0,3114	0,1004	0,1262	0,1053	0,2907	0,3029	0,4154	0,2776	0,3429	0,1566	0,1687	0,1633	0,2309	0,0945
	0,2299	1,0580	0,7717	0,7611	0,4881	0,9044	0,3729	0,1706	0,0819	0,0876	0,3725	0,3844	0,3761	0,4149	0,3495	0,0960	0,2035	0,1372	0,1730	0,1518

Teste de normalidade



Transformação de dados



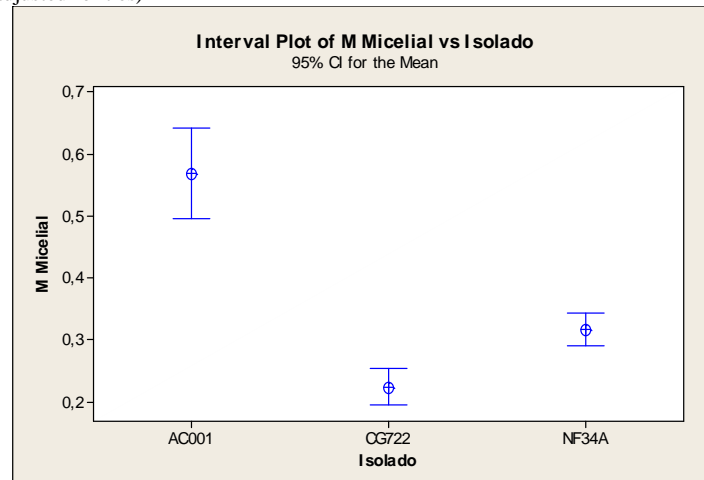
Transformação NÃO resolveu o problema da anormalidade

Kruskal-Wallis Test on M Micelial

Isolado	N	Median	Ave Rank	Z
AC001	239	0,3153	424,6	5,89
CG722	240	0,1878	277,6	-7,53
NF34A	240	0,3192	378,1	1,65
Overall	719		360,0	

H = 62,75 DF = 2 P = 0,000

H = 62,75 DF = 2 P = 0,000 (adjusted for ties)



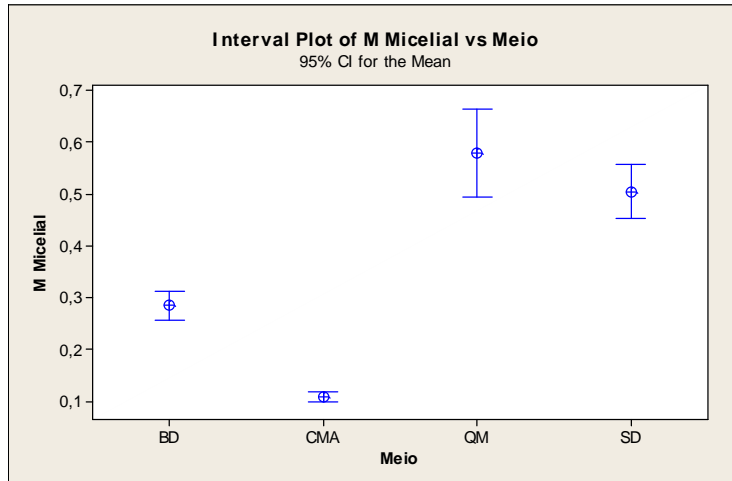
Todos os isolados diferem entre si

Kruskal-Wallis Test on M Micelial

Meio	N	Median	Ave Rank	Z
BD	179	0,2245	353,7	-0,47
CMA	180	0,1131	157,3	-15,12
QM	180	0,3759	437,2	5,76
SD	180	0,4035	491,8	9,83
Overall	719		360,0	

H = 268,93 DF = 3 P = 0,000

H = 268,97 DF = 3 P = 0,000 (adjusted for ties)



**Os meios Quirera de Milho e Soja Dextrose não diferem entre si, mas diferem dos demais.
Os meios Batata Dextrose e Corn Meal Agar diferem entre si.**

Kruskal-Wallis Test: M Micelial versus PH

719 cases were used

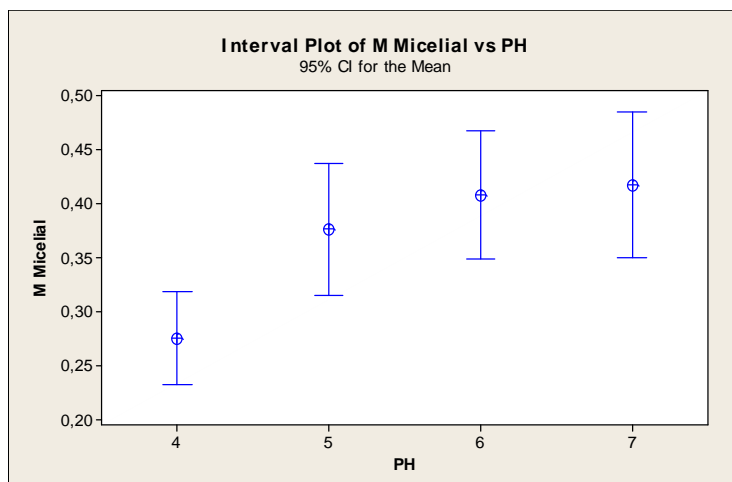
1 cases contained missing values

Kruskal-Wallis Test on M Micelial

PH	N	Median	Ave Rank	Z
4	179	0,2188	317,1	-3,19
5	180	0,2385	352,4	-0,57
6	180	0,2788	389,4	2,19
7	180	0,2576	380,9	1,56
Overall	719		360,0	

H = 13,30 DF = 3 P = 0,004

H = 13,30 DF = 3 P = 0,004 (adjusted for ties)



Regression Analysis: M Micelial versus PH; PH2

The regression equation is

$$M \text{ Micelial} = -0,554 + 0,300 \text{ PH} - 0,0231 \text{ PH}^2$$

719 cases used, 1 cases contain missing values

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	-0,5539	0,4385	-1,26	0,207 N S
PH	0,3003	0,1644	1,83	0,068 N S
PH2	-0,02312	0,01489	-1,55	0,121 N S

Modelo quadrático não se ajusta

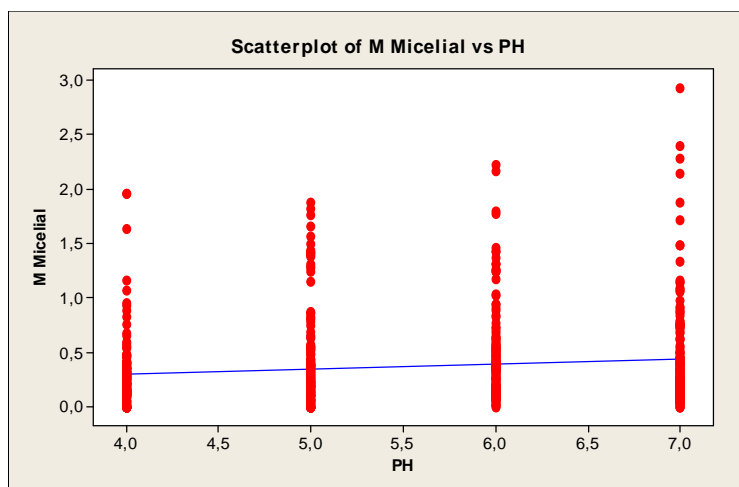
The regression equation is

$$M \text{ Micelial} = 0,117 + 0,0459 \text{ PH}$$

719 cases used, 1 cases contain missing values

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	0,11678	0,07490	1,56	0,119
PH	0,04593	0,01334	3,44	0,001 **

S = 0,399724 R-Sq = 1,6% R-Sq(adj) = 1,5%



Regression Analysis: M Micelial versus Tempo

The regression equation is

$$M \text{ Micelial} = 0,299 + 0,000866 \text{ Tempo}$$

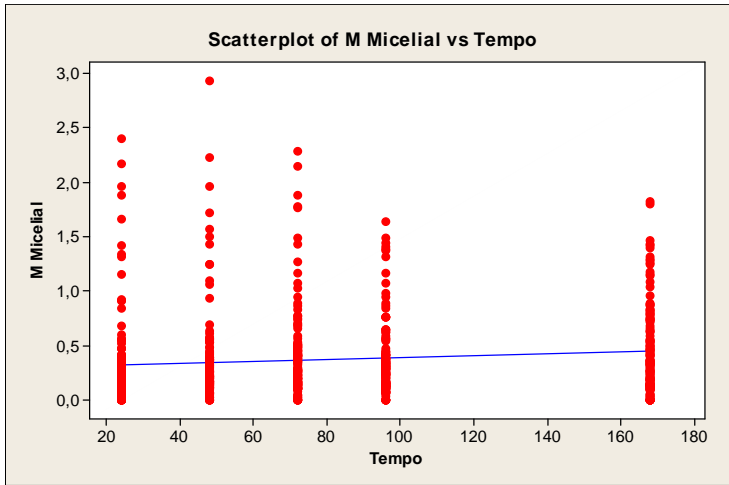
719 cases used, 1 cases contain missing values

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	0,29875	0,02888	10,35	0,000 **
Tempo	0,0008658	0,0003025	2,86	0,004 **

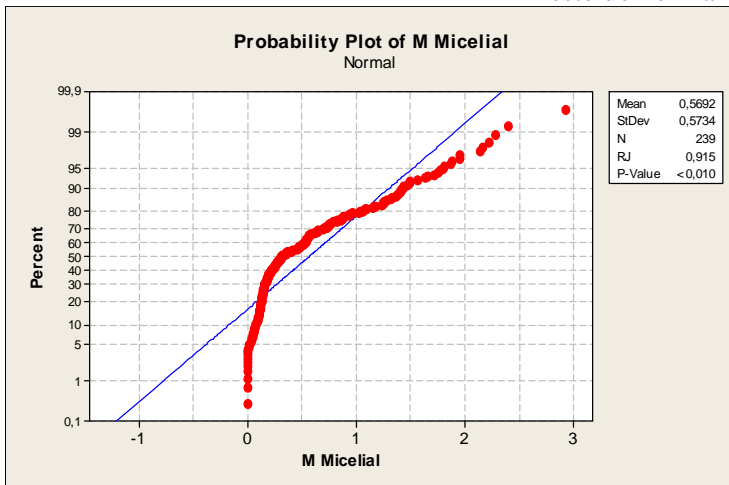
S = 0,400731 R-Sq = 1,1% R-Sq(adj) = 1,0%

Analysis of Variance

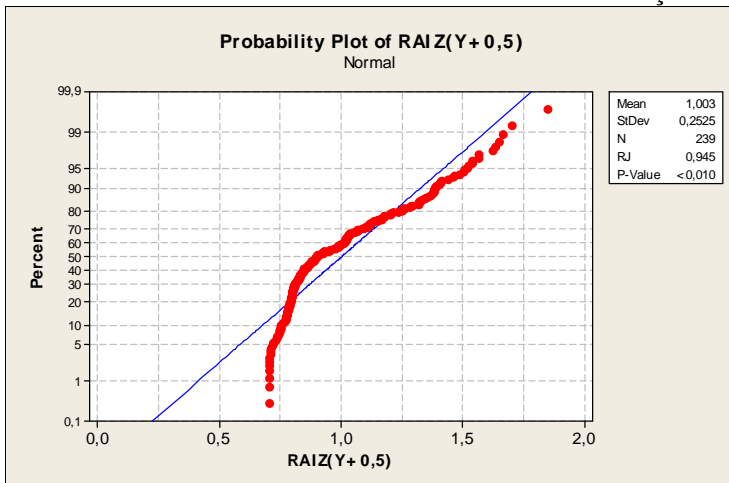
Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	1,3158	1,3158	8,19	0,004
Residual Error	717	115,1398	0,1606		
Total	718	116,4556			



ISOLADO AC001
 Teste de normalidade



Transformação de dados



A transformação não resolve

Kruskal-Wallis Test: M Micelial versus Meio

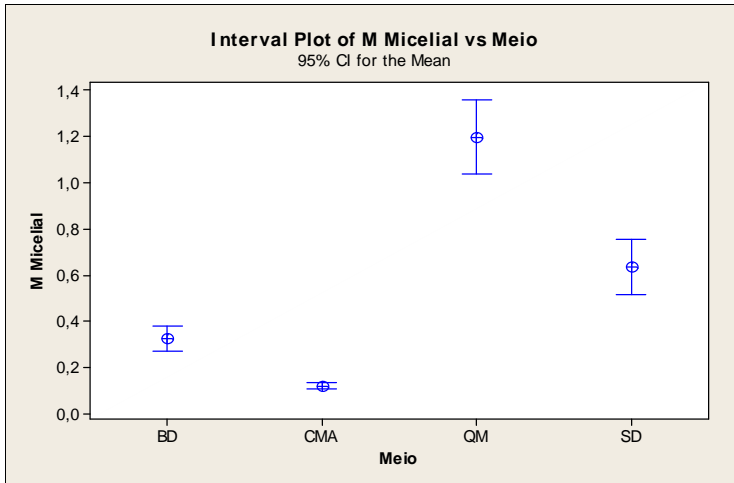
239 cases were used
 1 cases contained missing values

Kruskal-Wallis Test on M Micelial

Meio	N	Median	Ave Rank	Z
BD	59	0,2680	104,1	-2,04
CMA	60	0,1300	47,2	-9,42

QM 60 1,2576 183,2 8,19
 SD 60 0,5466 145,2 3,26
 Overall 239 120,0

H = 127,75 DF = 3 P = 0,000
 H = 127,76 DF = 3 P = 0,000 (adjusted for ties)



Todos os meios diferem entre si

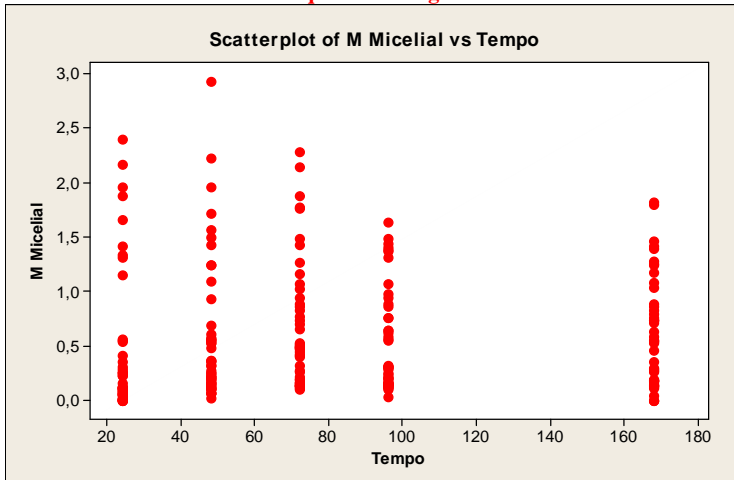
Regression Analysis: M Micelial versus Tempo

The regression equation is
 $M \text{ Micelial} = 0,515 + 0,000666 \text{ Tempo}$

239 cases used, 1 cases contain missing values

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	0,51470	0,07182	7,17	0,000
Tempo	0,0006657	0,0007514	0,89	0,377 N S

Não há tendência linear e nem quadrática significativa



Não há tendência significativa em relação ao tempo

Regression Analysis: M Micelial versus PH

The regression equation is
 $M \text{ Micelial} = 0,194 + 0,0682 \text{ PH}$

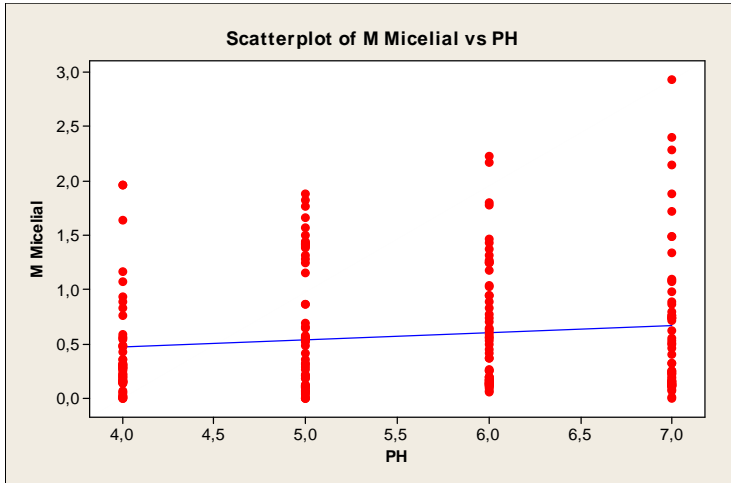
239 cases used, 1 cases contain missing values

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	0,1936	0,1854	1,04	0,298
PH	0,06821	0,03300	2,07	0,040 *

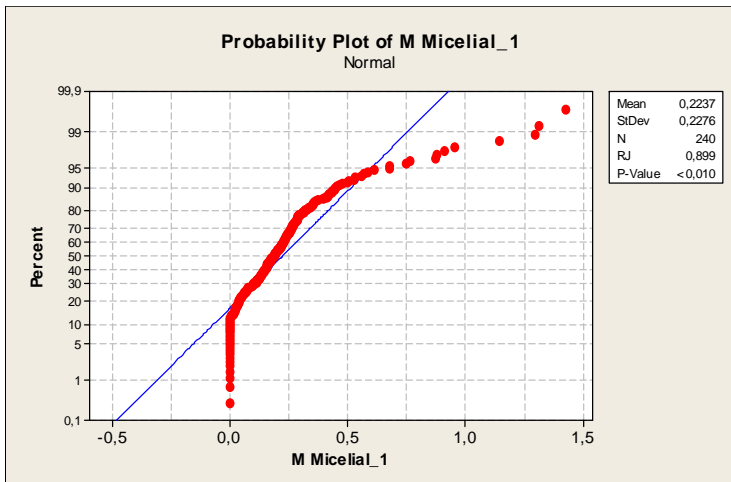
S = 0,569460 R-Sq = 1,8% R-Sq(adj) = 1,4%

Analysis of Variance

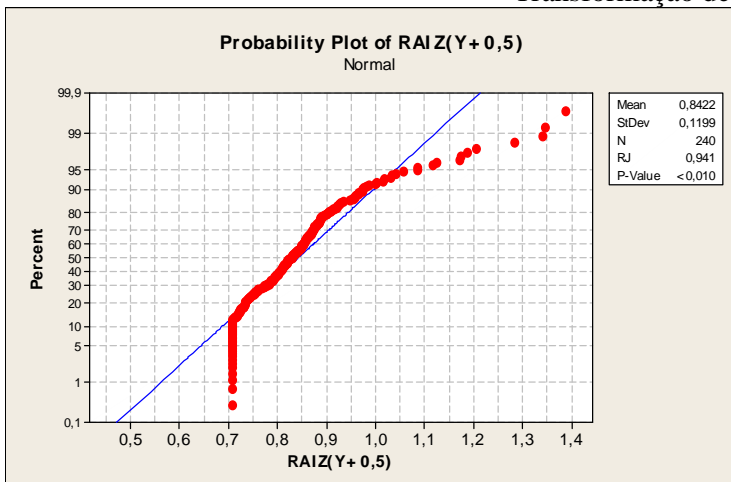
Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	1,3854	1,3854	4,27	0,040
Residual Error	237	76,8555	0,3243		
Total	238	78,2409			



ISOLADO CG722
Teste de normalidade



Transformação de dados



A transformação não resolveu o problema da anormalidade dos dados

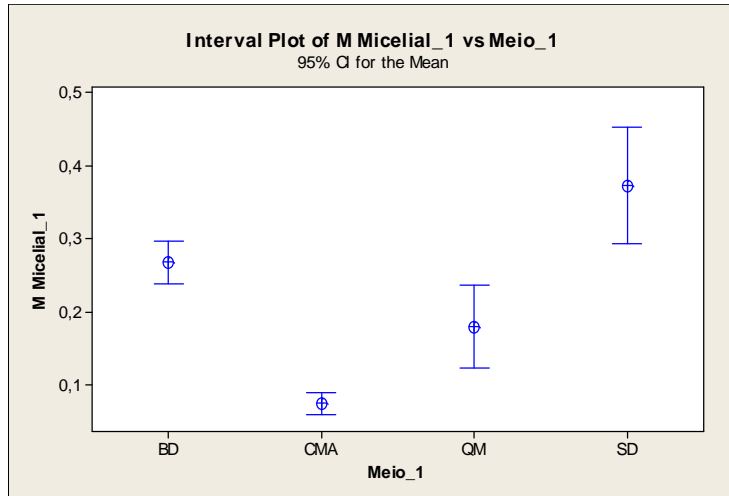
Kruskal-Wallis Test: M Micelial_1 versus Meio_1

Kruskal-Wallis Test on M Micelial_1

Meio_1	N	Median	Ave Rank	Z
BD	60	0,23515	156,4	4,63
CMA	60	0,06460	62,6	-7,46
QM	60	0,13730	96,3	-3,11
SD	60	0,26045	166,7	5,95
Overall	240		120,5	

H = 91,59 DF = 3 P = 0,000

H = 91,75 DF = 3 P = 0,000 (adjusted for ties)



BD não difere de QM e de SD

CMA difere de todos

QM difere de SD

Regression Analysis: M Micelial_1 versus Tempo_1

The regression equation is

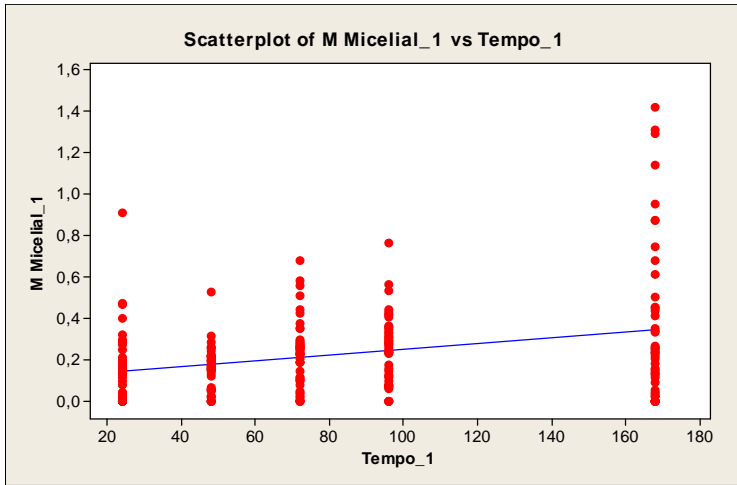
$$M \text{ Micelial}_1 = 0,110 + 0,00140 \text{ Tempo}_1$$

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	0,10973	0,02708	4,05	0,000 **
Tempo_1	0,0013964	0,0002839	4,92	0,000 **

S = 0,217316 R-Sq = 9,2% R-Sq(adj) = 8,8%

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	1,1429	1,1429	24,20	0,000
Residual Error	238	11,2399	0,0472		
Total	239	12,3828			



Regression Analysis: M Micelial_1 versus PH_1

The regression equation is

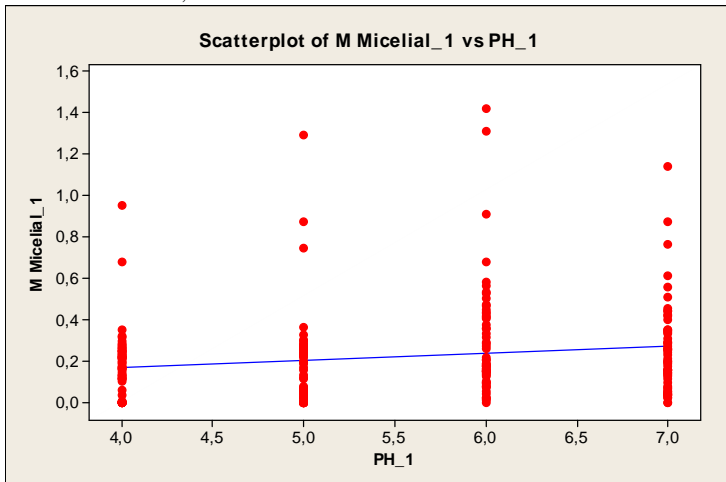
$$M \text{ Micelial}_1 = 0,0367 + 0,0340 PH_1$$

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	0,03673	0,07287	0,50	0,615
PH_1	0,03399	0,01298	2,62	0,009 **

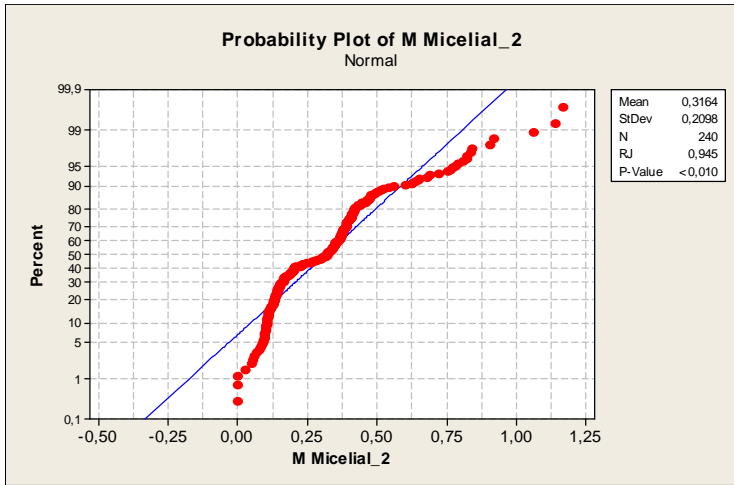
S = 0,224883 R-Sq = 2,8% R-Sq(adj) = 2,4%

Analysis of Variance

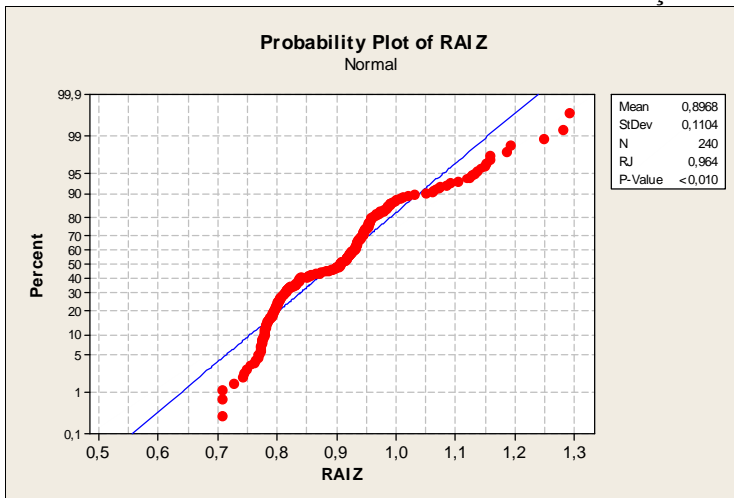
Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	0,34659	0,34659	6,85	0,009
Residual Error	238	12,03622	0,05057		
Total	239	12,38281			



ISOLADO NF34A
Teste de normalidade



Transformação de dados



A transformação não resolveu o problema da anormalidade

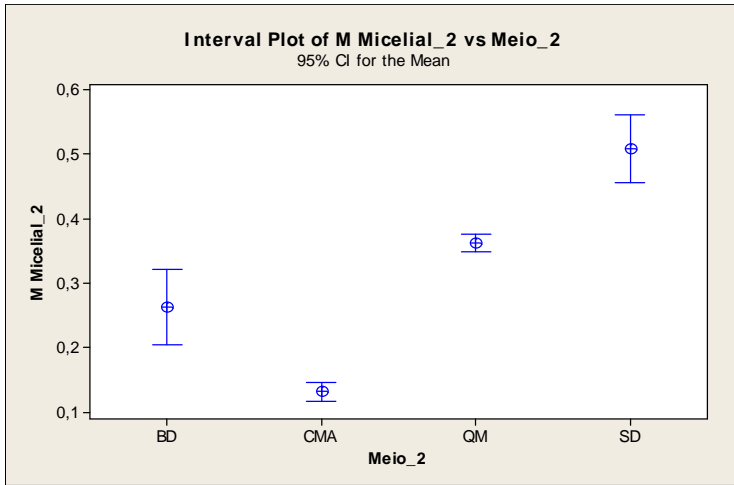
Kruskal-Wallis Test: M Micelial_2 versus Meio_1

Kruskal-Wallis Test on M Micelial_2

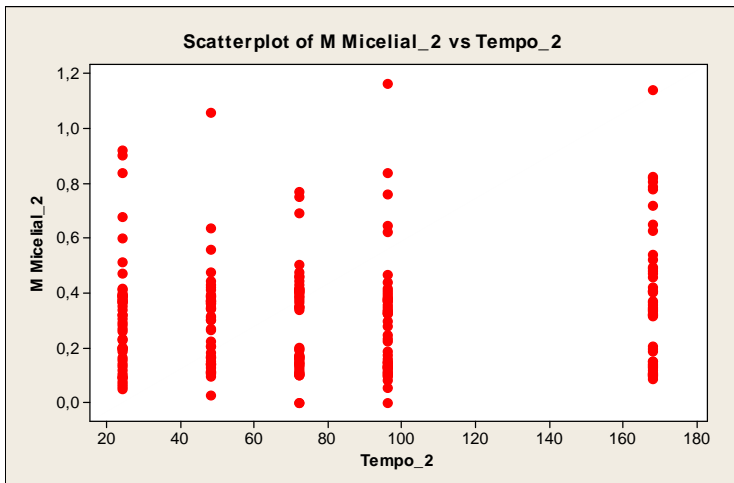
Meio_1	N	Median	Ave Rank	Z
BD	60	0,1561	93,6	-3,47
CMA	60	0,1334	49,3	-9,17
QM	60	0,3658	151,7	4,02
SD	60	0,4273	187,4	8,62
Overall	240		120,5	

H = 139,88 DF = 3 P = 0,000

H = 139,88 DF = 3 P = 0,000 (adjusted for ties)



CMA difere de todos
BD não difere de QM
SD difere de todos



Não há tendência significativa em relação ao tempo

Regression Analysis: M Micelial_2 versus PH_2

The regression equation is

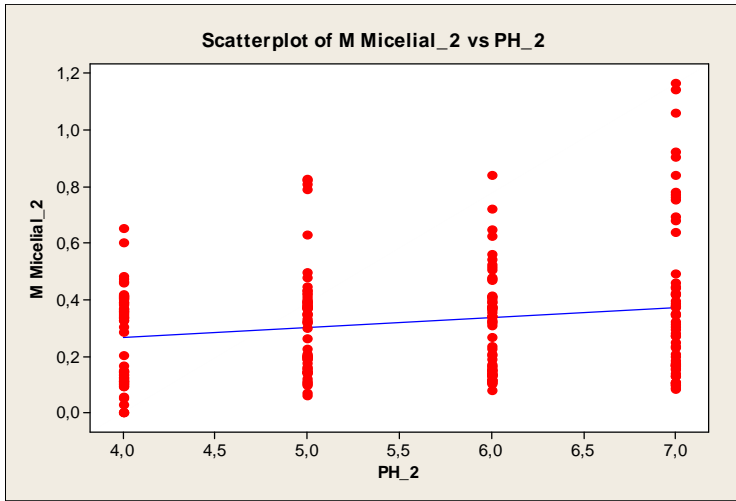
$$M \text{ Micelial}_2 = 0,125 + 0,0347 PH_2$$

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	0,12528	0,06695	1,87	0,063
PH_2	0,03475	0,01193	2,91	0,004 * *

S = 0,206613 R-Sq = 3,4% R-Sq(adj) = 3,0%

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	0,36224	0,36224	8,49	0,004
Residual Error	238	10,15996	0,04269		
Total	239	10,52220			



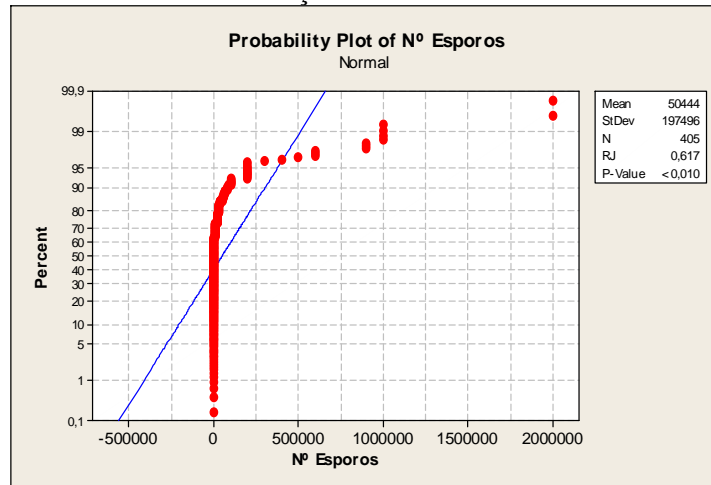
CAPÍTULO 2

“Producción de conidios y clamidosporas de los hongos *Duddingtonia flagrans* y *Monacrosporium thaumasium* en diferentes medios sólidos”

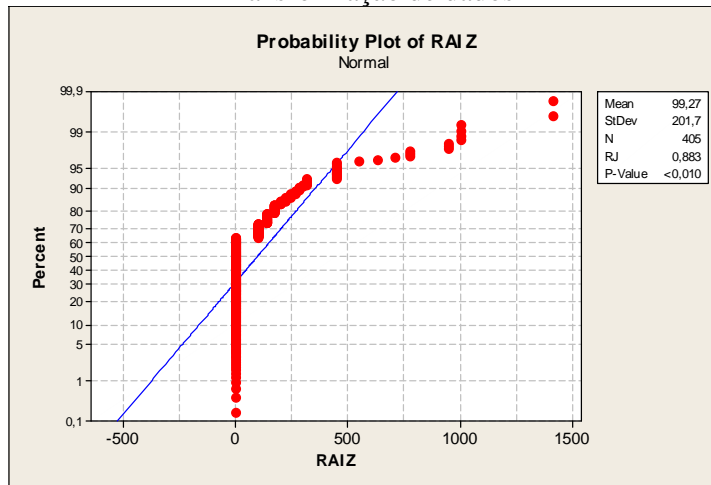
Tabela 04 – Número médio de esporos (conídios e clamidósporos) dos fungos *Duddingtonia flagrans* (isolados AC001 e CG722) e *Monacrosporium thaumasium* (isolado NF34A) produzidos em diferentes meios sólidos de cultivo após 7 dias de incubação a 26,5°C.

<i>Duddingtonia flagrans</i> (isolado AC001)														
Quirera de arroz - QA			Quirera de milho - QM			Bagaço de cana - BC			Palha de arroz - PA			Casca de café - CC		
10mL	15mL	20mL	10mL	15mL	20mL	10mL	15mL	20mL	10mL	15mL	20mL	10mL	15mL	20mL
0	200000	1000000	0	0	30000	0	0	0	20000	80000	80000	0	0	10000
0	50000	200000	0	0	70000	0	0	0	30000	30000	30000	0	10000	0
10000	2000000	200000	0	20000	10000	0	0	0	60000	30000	200000	0	0	10000
0	20000	30000	10000	40000	60000	0	0	0	50000	40000	70000	10000	0	60000
600000	100000	200000	0	20000	30000	0	0	0	10000	70000	30000	0	10000	30000
20000	0	10000	0	70000	60000	0	0	0	30000	90000	80000	10000	0	20000
50000	0	400000	0	20000	20000	0	0	0	30000	40000	90000	0	200000	0
0	80000	60000	0	40000	10000	0	0	0	20000	100000	200000	0	100000	0
0	0	200000	10000	30000	20000	0	0	0	20000	70000	200000	0	200000	0
<i>Duddingtonia flagrans</i> (isolado CG722)														
1000000	0	200000	10000	0	0	0	0	0	0	0	0	20000	0	0
300000	10000	200000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30000	80000	100000	0	0	0	0	0	0	0	10000	0	0	0	0
0	900000	2000000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	600000	900000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	900000	1000000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	600000	100000	0	0	50000	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	500000	200000	0	0	50000	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1000000	100000	0	0	200000	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Monacrosporium thaumasium</i> (isolado NF34A)														
100000	0	0	0	0	0	0	10000	0	10000	10000	0	20000	40000	0
0	0	0	0	0	0	0	30000	0	10000	0	0	20000	0	10000
0	0	0	0	0	0	0	50000	20000	10000	10000	0	0	0	30000
0	0	0	0	0	0	0	0	0	30000	20000	0	10000	0	60000
0	0	0	0	0	0	0	0	10000	0	30000	10000	20000	10000	40000
0	0	0	0	0	0	0	0	20000	10000	0	10000	0	0	30000
0	0	0	0	0	0	0	20000	0	0	10000	10000	0	0	20000
0	0	0	0	0	0	10000	20000	0	10000	20000	10000	0	0	20000
0	0	0	0	0	0	0	10000	0	10000	0	20000	0	10000	10000

PRODUÇÃO DE ESPOROS



Transformação de dados



A transformação dos dados não resolveu o problema da anormalidade

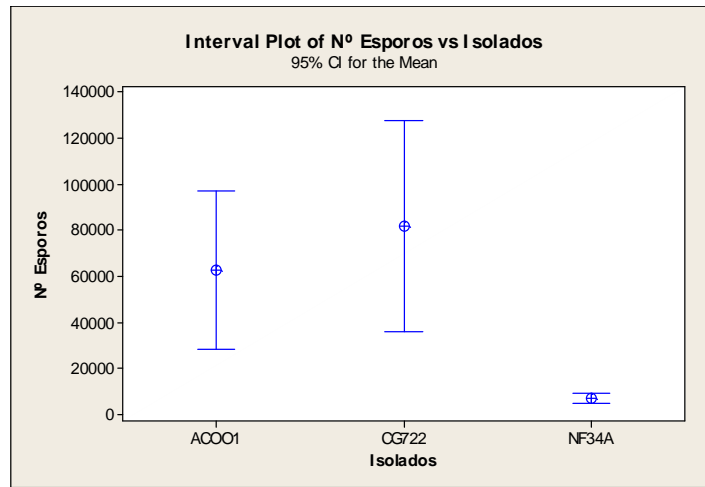
Kruskal-Wallis Test: N° Esporos versus Isolados

Kruskal-Wallis Test on N° Esporos

Isolados	N	Median	Ave Rank	Z
ACOO1	135	1,00000E+04	247,4	5,39
CG722	135	0,000000000	175,8	-3,30
NF34A	135	0,000000000	185,8	-2,09
Overall	405		203,0	

H = 29,57 DF = 2 P = 0,000

H = 40,10 DF = 2 P = 0,000 (adjusted for ties)



**ACOO1 e CG722 não diferem entre si.
NF34A difere de ACOO1 e de CG722.**

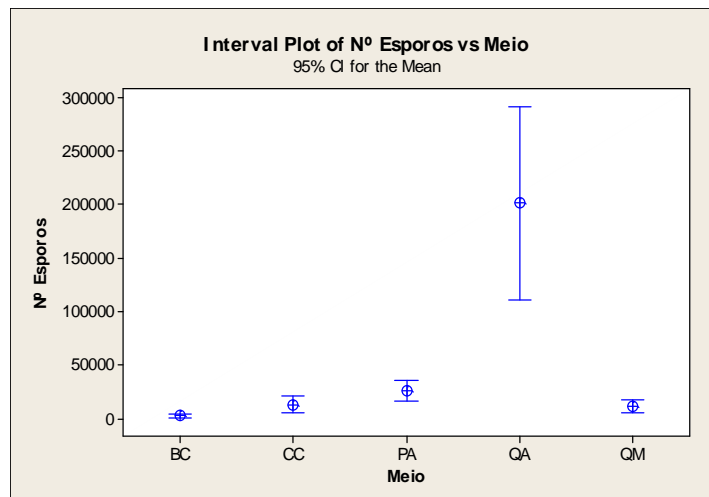
Kruskal-Wallis Test: Nº Esporos versus Meio

Kruskal-Wallis Test on Nº Esporos

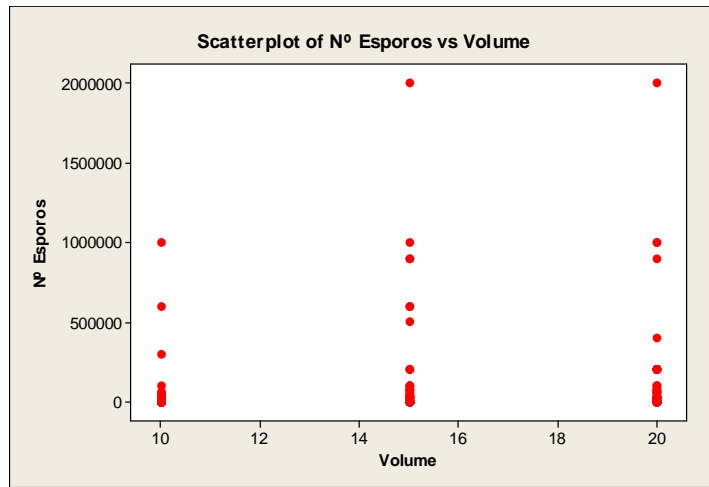
Meio	N	Median	Ave Rank	Z
BC	81	0,000000000	151,4	-4,44
CC	81	0,000000000	193,2	-0,85
PA	81	1,00000E+04	239,3	3,12
QA	81	0,000000000	248,5	3,91
QM	81	0,000000000	182,7	-1,75
Overall	405		203,0	

H = 38,81 DF = 4 P = 0,000

H = 52,64 DF = 4 P = 0,000 (adjusted for ties)



**BC, CC e QM não diferem entre si.
BC difere de PA e QA.
QA difere de todos os demais**



Não há tendência significativa em função de volume

CAPÍTULO 3

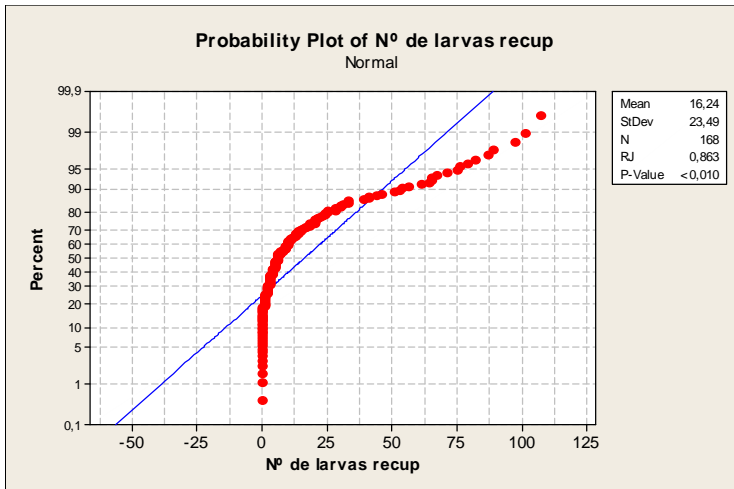
“Control infective larvae of gastrointestinal nematodes of heifers by isolates of the nematophagous fungi”

Tabela 05 – Número médio de larvas infectantes de tricostrongilídeos (L₃) por grama de fezes, recuperadas pelo método de Baermann, após 17 dias de coprocultivo em grupos tratados com *Duddingtonia flagrans* (isolados AC001 e CG722), *Monacrosporium thaumasium* (isolado NF34A) e grupo controle.

12 HORAS				15 HORAS				18 HORAS				21 HORAS				24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS			
AC001	CG722	NF34A	CONTR	AC001	CG722	NF34A	CONTR	AC001	CG722	NF34A	CONTR	AC001	CG722	NF34A	CONTR	AC001	CG722	NF34A	CONTR	AC001	CG722	NF34A	CONTR	AC001	CG722	NF34A	CONTR
2	1	1	28	15	6	0	24	6	4	0	10	20	4	3	76	18	0	0	39	10	5	4	28	2	2	0	20
11	2	0	25	13	9	0	41	14	1	4	12	17	3	0	79	25	9	0	54	20	5	7	61	9	1	0	33
2	6	0	65	4	6	0	75	8	7	3	18	4	4	2	65	15	13	0	64	33	10	5	46	1	0	0	13
10	6	0	30	10	8	1	71	2	3	0	22	24	3	3	21	5	5	0	28	67	5	6	89	6	0	1	18
5	0	0	44	30	1	3	87	7	3	0	23	2	5	3	101	31	6	0	21	5	6	3	97	0	0	0	14
1	12	0	41	9	10	0	56	16	4	1	9	2	3	0	82	17	11	1	53	51	11	20	107	3	0	1	14
3,5	4	0	35,5	11,5	7	0	63,5	7,5	3,5	0,5	15	10,5	3,5	2,5	77,5	17,5	5,5	0,5	46	26,5	5,5	5,5	75	2,5	0	0	16

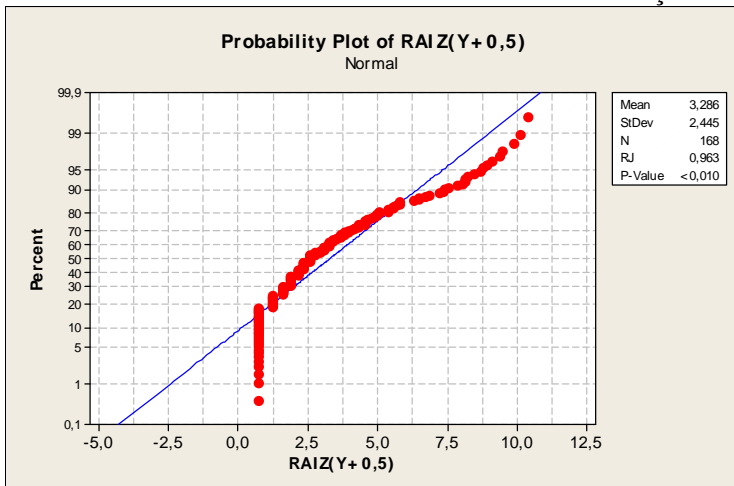
LARVAS RECUPERADAS

Teste de normalidade



Os dados não tem distribuição normal

Transformação de dados



A transformação dos dados não resolveu a anormalidade dos dados

Kruskal-Wallis Test: N° de larvas recup versus Tempo

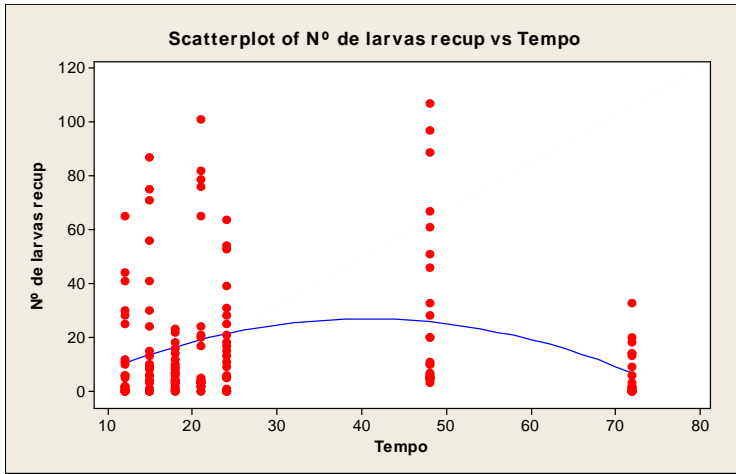
Kruskal-Wallis Test on N° de larvas recup

Tempo	N	Median	Ave Rank	Z
12	24	3,500	73,9	-1,15
15	24	9,000	92,0	0,82
18	24	5,000	76,3	-0,89
21	24	4,000	88,1	0,39
24	24	12,000	91,3	0,74
48	24	10,500	113,4	3,15
72	24	1,000	56,4	-3,06
Overall	168		84,5	

H = 19,50 DF = 6 P = 0,003

H = 19,64 DF = 6 P = 0,003 (adjusted for ties)

Há efeito significativo de tempo



Regression Analysis: N° de larvas recup versus Tempo; tem2

The regression equation is

$$\text{N° de larvas recup} = -6,48 + 1,65 \text{ Tempo} - 0,0203 \text{ tem2}$$

PONTO DE MÁXIMO (31,37; 32,36)

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	-6,478	7,798	-0,83	0,407
Tempo	1,6466	0,5081	3,24	0,001 **
tem2	-0,020306	0,005997	-3,39	0,001 **

S = 22,8270 R-Sq = 6,7% R-Sq(adj) = 5,5%

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	2	6137,4	3068,7	5,89	0,003
Residual Error	165	85977,0	521,1		
Total	167	92114,5			

Kruskal-Wallis Test: N° de larvas recup versus TRAT

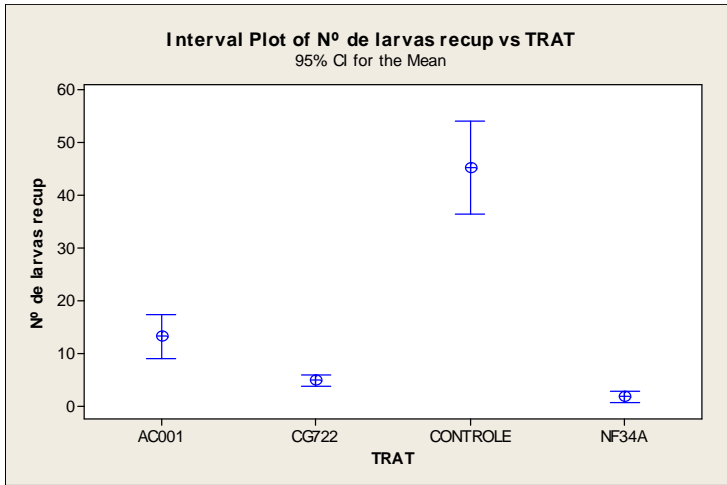
Kruskal-Wallis Test on N° de larvas recup

TRAT	N	Median	Ave Rank	Z
AC001	42	9,500000000	94,2	1,49
CG722	42	4,500000000	66,7	-2,75
CONTROLE	42	4,00000E+01	141,9	8,83
NF34A	42	0,000000000	35,3	-7,58
Overall	168		84,5	

H = 108,87 DF = 3 P = 0,000

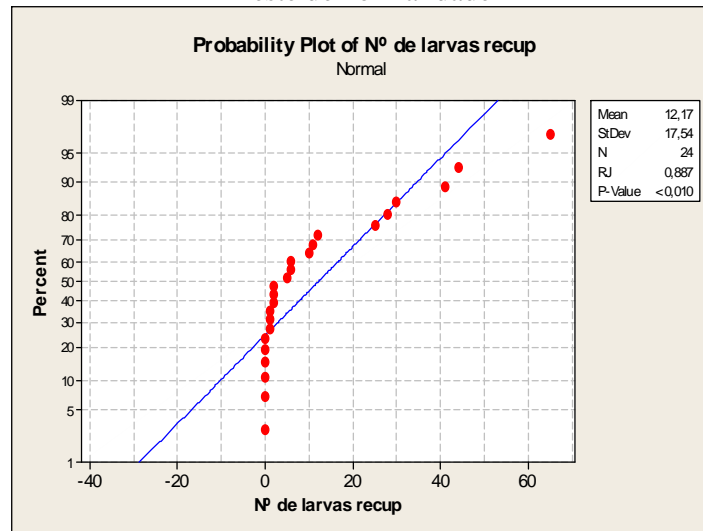
H = 109,65 DF = 3 P = 0,000 (adjusted for ties)

Há efeito significativo de tratamento

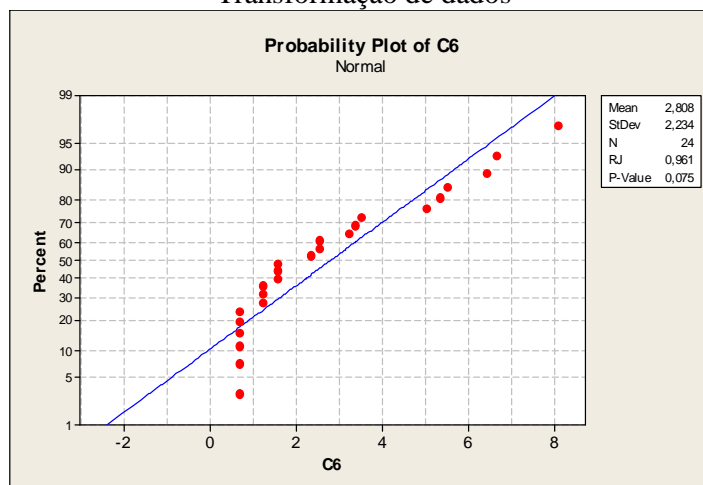


CG722 não difere de NF34A
AC001 difere de todos
Controle difere de todos

DESDOBRAMENTO DA INTERAÇÃO ESTUDO DE TRATAMENTO DENTRO DE CADA TEMPO 12 Teste de normalidade



Transformação de dados



Dados transformados tem distribuição normal
One-way ANOVA: RAIZ(Nº+0,5) versus Trat

Source	DF	SS	MS	F	P
Trat	3	98,530	32,843	40,42	0,000 **
Error	20	16,252	0,813		
Total	23	114,782			

S = 0,9014 R-Sq = 85,84% R-Sq(adj) = 83,72%

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev	+-----+-----+-----+-----+	
AC001	6	2,2273	0,9203	(---*---)	
CG722	6	2,0246	1,0398	(---*---)	
CONTROLE	6	6,1862	1,1302	(---*---)	(---*---)
NF34A	6	0,7934	0,2113	(---*---)	

+-----+-----+-----+-----+

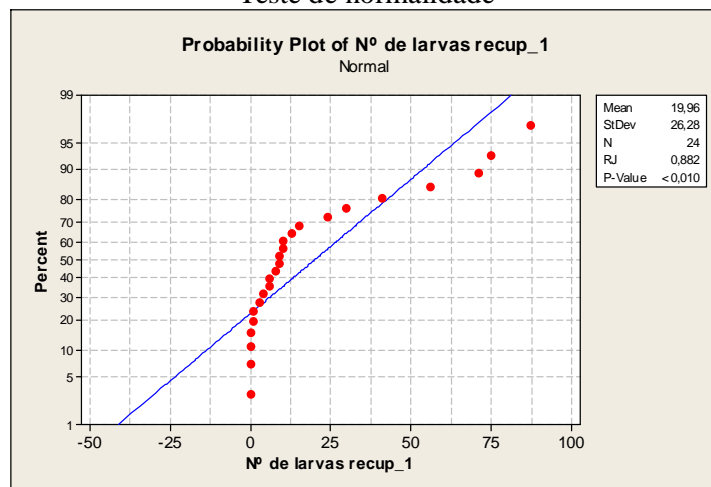
0,0 2,0 4,0 6,0

Pooled StDev = 0,9014

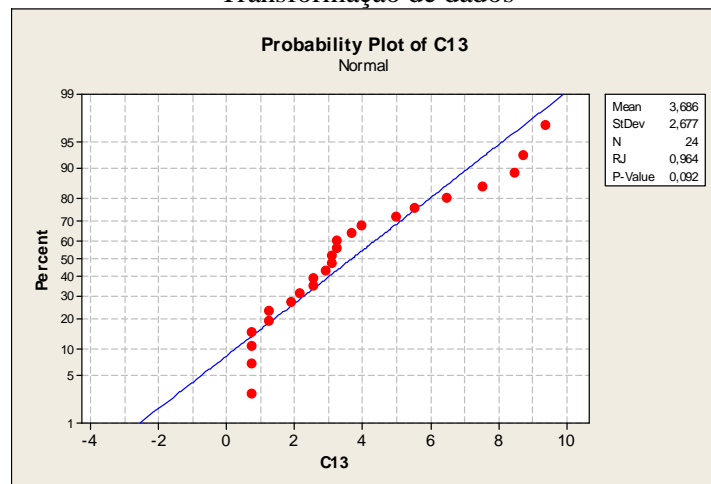
Controle superou todos os demais
Os demais não diferem entre si

ESTUDO DE TRATAMENTO DENTRO DE CADA TEMPO 15

Teste de normalidade



Transformação de dados



Os dados transformados tem distribuição normal

One-way ANOVA: RAIZ(Nº+0,5 versus Trat

Source	DF	SS	MS	F	P
--------	----	----	----	---	---

Trat 3 141,32 47,11 40,01 0,000 **
 Error 20 23,55 1,18
 Total 23 164,87

S = 1,085 R-Sq = 85,72% R-Sq(adj) = 83,57%

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev	-----+-----+-----+-----
AC001	6	3,596	1,131	(--*--)
CG722	6	2,594	0,726	(--*--)
CONTROLE	6	7,568	1,635	(--*--)
NF34A	6	0,987	0,480	(--*--)

+-----+-----+-----+-----
 0,0 2,5 5,0 7,5

Pooled StDev = 1,085

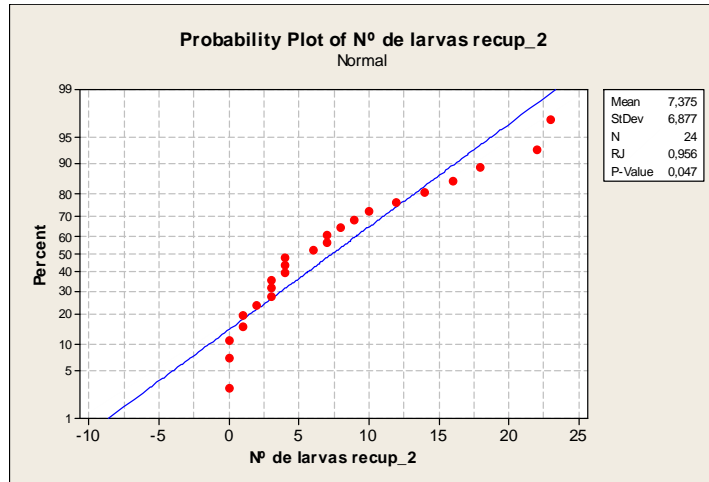
AC001 difere d NF34A

CG722 não difere de AC001 e NF34A

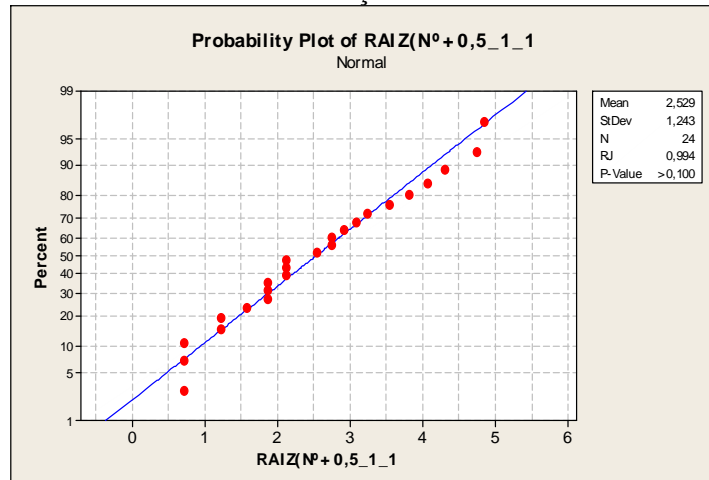
Controle difere de todos os demais

ESTUDO DE TRATAMENTO DENTRO DE CADA TEMPO 18

Teste de normalidade



Transformação de dados



Dados transformados tem distribuição normal

One-way ANOVA: RAIZ(Nº+0,5_1_1 versus Trat_2

Source	DF	SS	MS	F	P
Trat_2	3	25,253	8,418	16,39	0,000
Error	20	10,273	0,514		
Total	23	35,526			

S = 0,7167 R-Sq = 71,08% R-Sq(adj) = 66,75%

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev	-----*-----
AC001	6	2,9424	0,9003	(-----*-----)
CG722	6	1,9913	0,4917	(-----*-----)
CONTROLE	6	3,9584	0,7729	(-----*-----)
NF34A	6	1,2230	0,6364	(-----*-----)

-----*-----
1,0 2,0 3,0 4,0

Pooled StDev = 0,7167

NF34A não difere de CG722

CG722 não difere de AC001

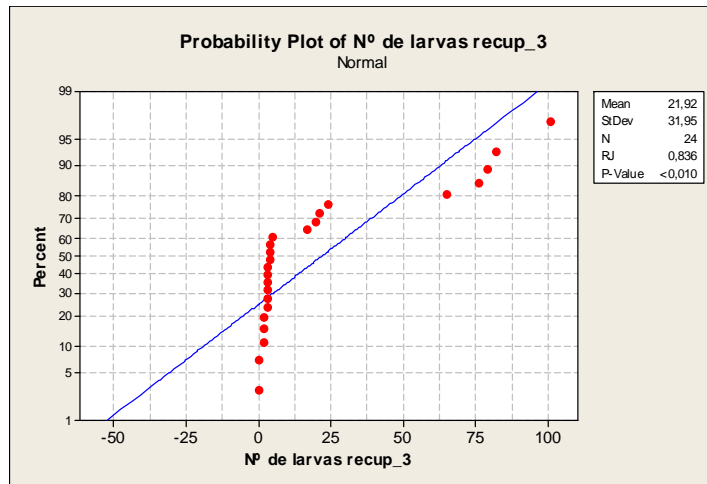
AC001 não difere de controle

Controle não difere de CG722 e de NF34A

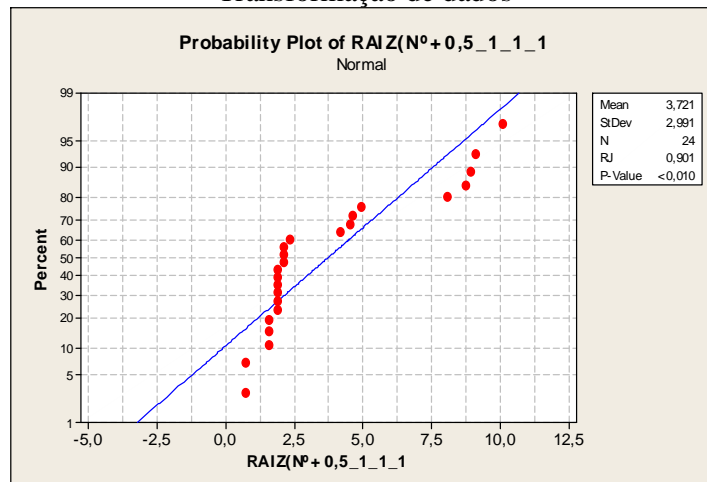
AC001 difere de NF34A

ESTUDO DE TRATAMENTO DENTRO DE CADA TEMPO 21

Teste de normalidade



Transformação de dados



A transformação dos dados não resolveu a anormalidade

Kruskal-Wallis Test: Nº de larvas recup_3 versus Trat_3

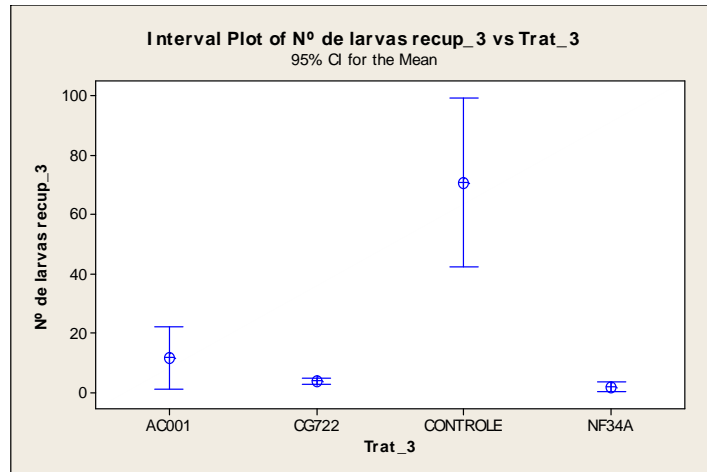
Kruskal-Wallis Test on Nº de larvas recup_3

Trat_3	N	Median	Ave Rank	Z
--------	---	--------	----------	---

AC001	6	10,500	12,2	-0,13
CG722	6	3,500	11,1	-0,57
CONTROLE	6	77,500	21,3	3,53
NF34A	6	2,500	5,4	-2,83
Overall	24		12,5	

H = 15,64 DF = 3 P = 0,001

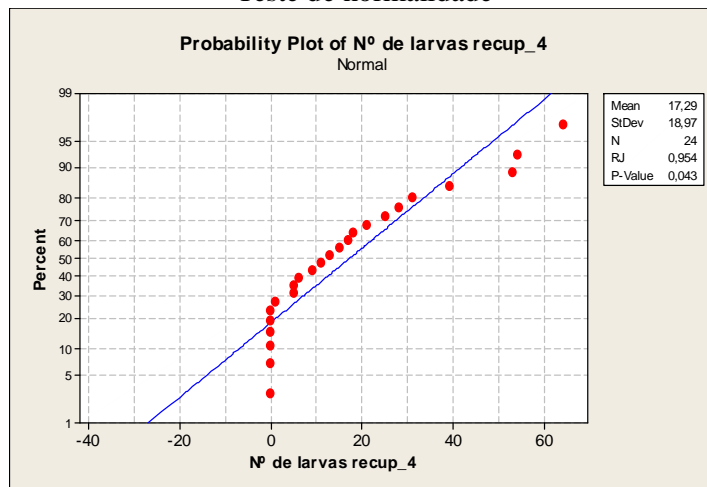
H = 15,94 DF = 3 P = 0,001 (adjusted for ties)



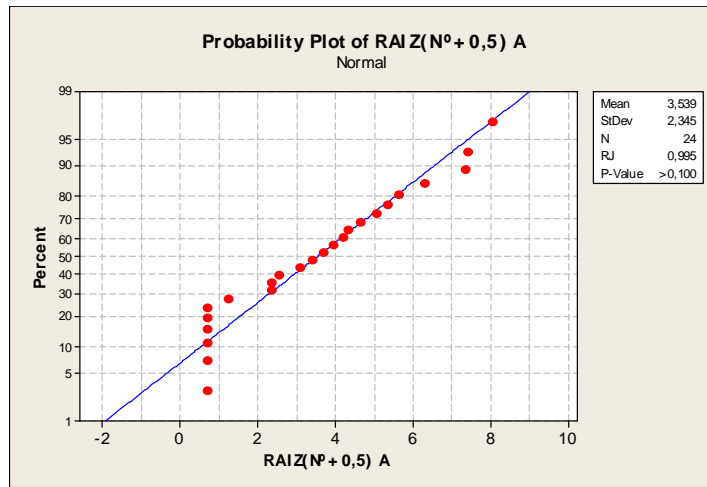
Controle difere de todos os demais
Os demais não diferem entre si

ESTUDO DE TRATAMENTO DENTRO DE CADA TEMPO 24

Teste de normalidade



Transformação de dados



Dados transformados tem distribuição normal

One-way ANOVA: RAIZ(Nº+0,5) A versus Trat_4

Source	DF	SS	MS	F	P
Trat_4	3	105,71	35,24	33,94	0,000
Error	20	20,76	1,04		
Total	23	126,48			

S = 1,019 R-Sq = 83,58% R-Sq(adj) = 81,12%

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

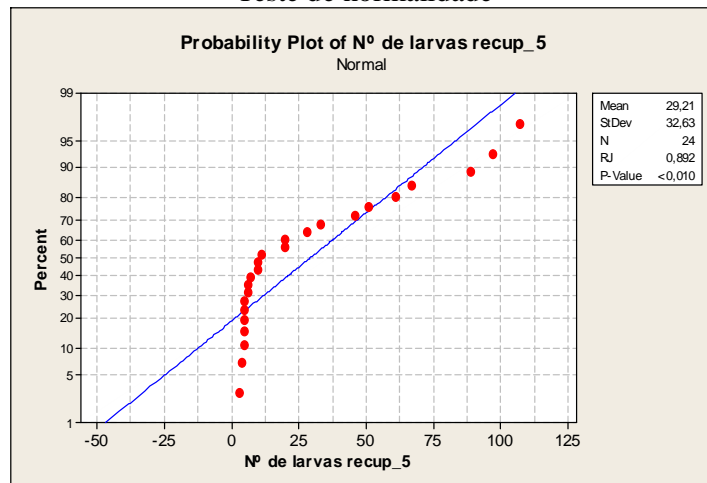
Level	N	Mean	StDev	CI Lower	CI Upper
AC001	6	4,238	1,116	2,000	6,476
CG722	6	2,625	1,064	0,485	4,765
CONTROLE	6	6,498	1,316	4,166	8,830
NF34A	6	0,793	0,211	0,371	1,215

Pooled StDev = 1,019

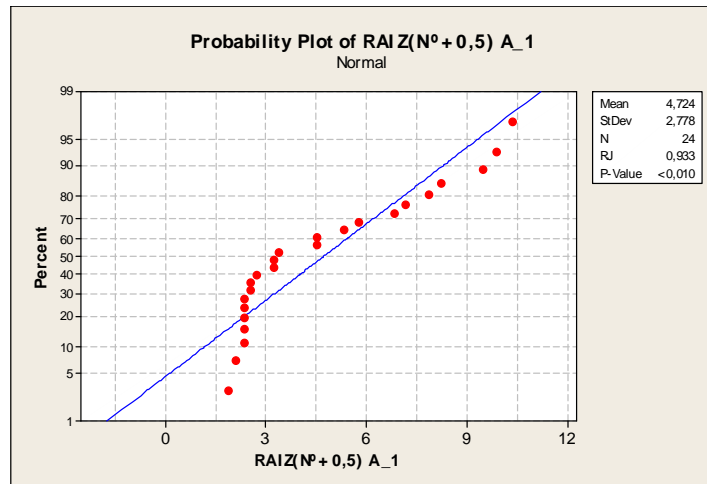
Controle e NF34A diferem de todos e entre si
AC001 e CG722 não diferem

ESTUDO DE TRATAMENTO DENTRO DE CADA TEMPO 48

Teste de normalidade



Transformação de dados



Transformação não resolveu o problema da anormalidade

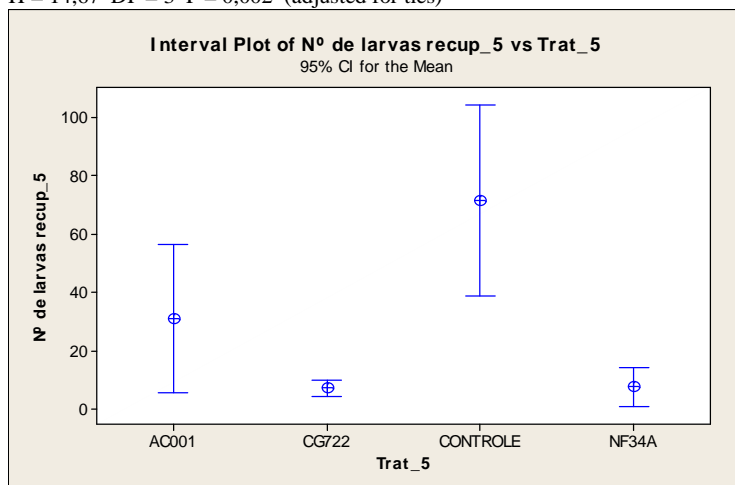
Kruskal-Wallis Test: Nº de larvas recup_5 versus Trat_5

Kruskal-Wallis Test on Nº de larvas recup_5

Trat_5	N	Median	Ave Rank	Z
AC001	6	26,500	14,7	0,87
CG722	6	5,500	8,0	-1,80
CONTROLE	6	75,000	20,5	3,20
NF34A	6	5,500	6,8	-2,27
Overall	24		12,5	

H = 14,53 DF = 3 P = 0,002

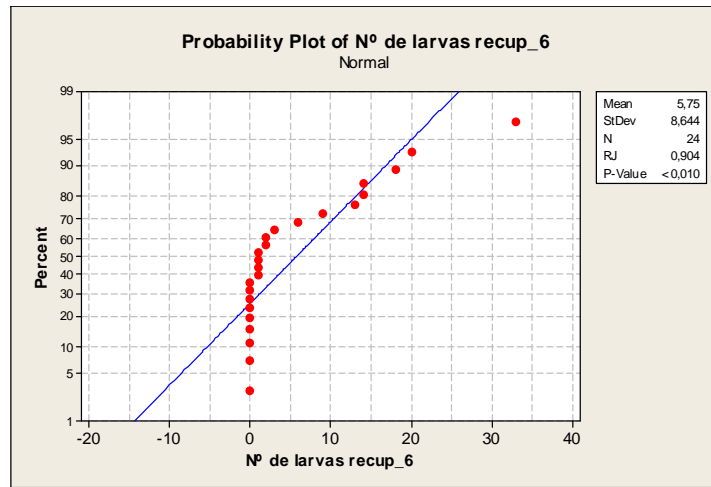
H = 14,67 DF = 3 P = 0,002 (adjusted for ties)



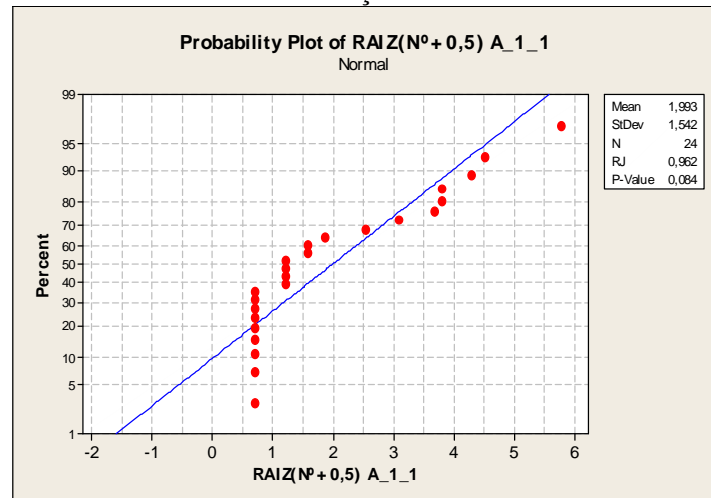
Apenas controle difere de CG722 e de NF34A

ESTUDO DE TRATAMENTO DENTRO DE CADA TEMPO 72

Teste de normalidade



Transformação de dados



Os dados transformados tem distribuição normal

One-way ANOVA: RAIZ(Nº+0,5) A_1_1 versus Trat_6

Source	DF	SS	MS	F	P
Trat_6	3	46,678	15,559	38,98	0,000
Error	20	7,982	0,399		
Total	23	54,661			

S = 0,6318 R-Sq = 85,40% R-Sq(adj) = 83,21%

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev	Lower CI	Upper CI
AC001	6	1,8359	0,8691	(---*---)	
CG722	6	0,9391	0,3766	(---*---)	
CONTROLE	6	4,3178	0,7924		(---*---)
NF34A	6	0,8797	0,2673	(---*---)	

1,2 2,4 3,6 4,8

Pooled StDev = 0,6318

Controle difere dos demais
Os demais não diferem entre si

ESTUDO DE TEMPO DENTRO DE CADA TRATAMENTO – AC001

Regression Analysis: Nº de larvas recup versus Tempo; tem2

The regression equation is

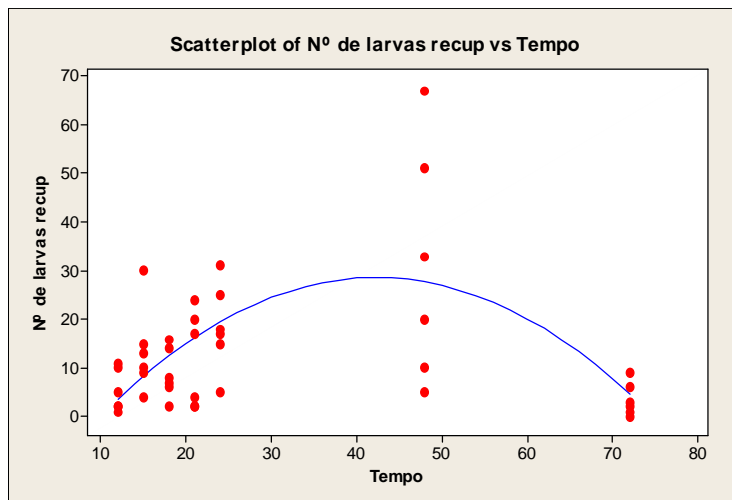
N° de larvas recup = - 20,1 + 2,30 Tempo - 0,0271 tem2
PONTO DE MÁXIMO (41,52; 27,64)

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	-20,077	7,725	-2,60	0,013 **
Tempo	2,2958	0,5033	4,56	0,000 **
tem2	-0,027133	0,005941	-4,57	0,000 **

S = 11,3073 R-Sq = 35,0% R-Sq(adj) = 31,6%

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	2	2682,8	1341,4	10,49	0,000
Residual Error	39	4986,3	127,9		
Total	41	7669,1			



ESTUDO DE TEMPO DENTRO DE CADA TRATAMENTO – CG722

Regression Analysis: N° de larvas recup_1 versus Tempo_1; tem2_1

The regression equation is

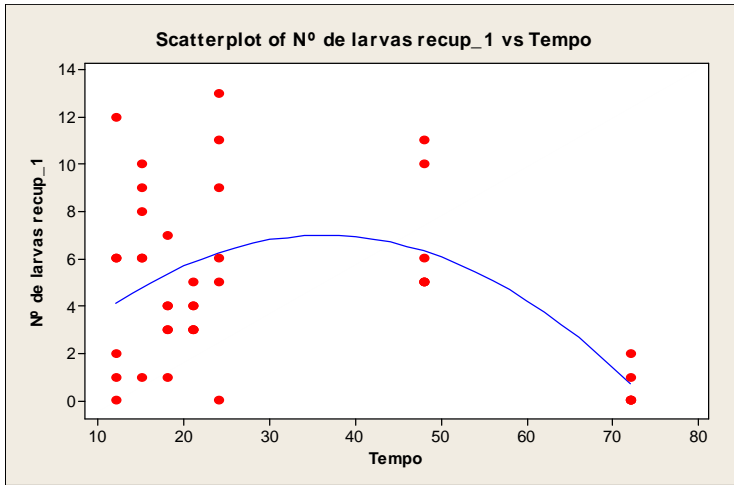
N° de larvas recup_1 = 0,52 + 0,356 Tempo_1 - 0,00491 tem2_1
PONTO DE MÁXIMO(35,96; 6,92)

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	0,522	2,195	0,24	0,813
Tempo_1	0,3564	0,1430	2,49	0,017 **
tem2_1	-0,004910	0,001688	-2,91	0,006 **

S = 3,21280 R-Sq = 25,4% R-Sq(adj) = 21,6%

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	2	137,06	68,53	6,64	0,003
Residual Error	39	402,56	10,32		
Total	41	539,62			



ESTUDO DE TEMPO DENTRO DE CADA TRATAMENTO – NF34A

The regression equation is

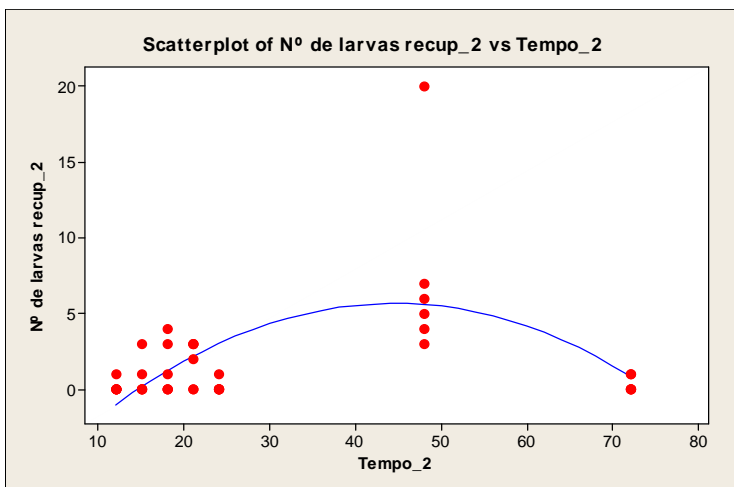
N° de larvas recup_2 = - 6,85 + 0,562 Tempo_2 - 0,00631 tem2_2
PONTO DE MÁXIMO (44,53; 5,66)

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	-6,852	1,947	-3,52	0,001 **
Tempo_2	0,5617	0,1269	4,43	0,000 **
tem2_2	-0,006305	0,001498	-4,21	0,000 **

S = 2,85025 R-Sq = 34,3% R-Sq(adj) = 31,0%

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	2	165,738	82,869	10,20	0,000
Residual Error	39	316,833	8,124		
Total	41	482,571			



ESTUDO DE TEMPO DENTRO DE CADA TRATAMENTO – CONTROLE

Regression Analysis: N° de larvas recup_3 versus Tempo_2; tem2_2

The regression equation is

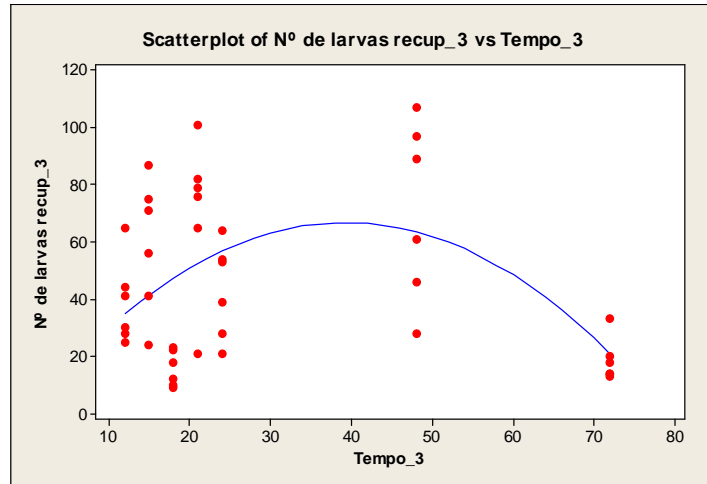
N° de larvas recup_3 = 0,5 + 3,37 Tempo_2 - 0,0429 tem2_2
PONTO DE MÁXIMO (39,36; 66,96)

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	0,50	17,53	0,03	0,978
Tempo_2	3,373	1,142	2,95	0,005 **
tem2_2	-0,04288	0,01348	-3,18	0,003 **

S = 25,6576 R-Sq = 22,4% R-Sq(adj) = 18,4%

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	2	7401,1	3700,5	5,62	0,007
Residual Error	39	25674,3	658,3		
Total	41	33075,3			



CAPÍTULO 4

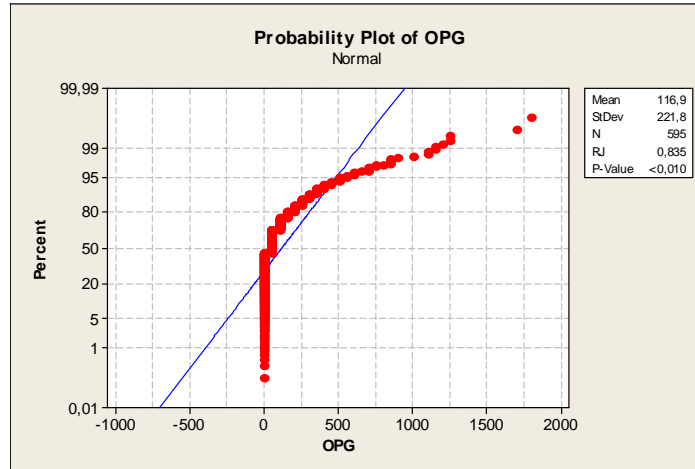
“Evaluation of the effectiveness of *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* in the biological control of gastrointestinal nematodes in female bovines bred in the semiarid region”

Tabela 06 – Número médio de ovos por grama de fezes (OPG) eliminado por fêmea bovina após recebimento de diferentes doses dos fungos *D. flagrans* (isolado AC001) ou *M. thaumasium* (NF34A).

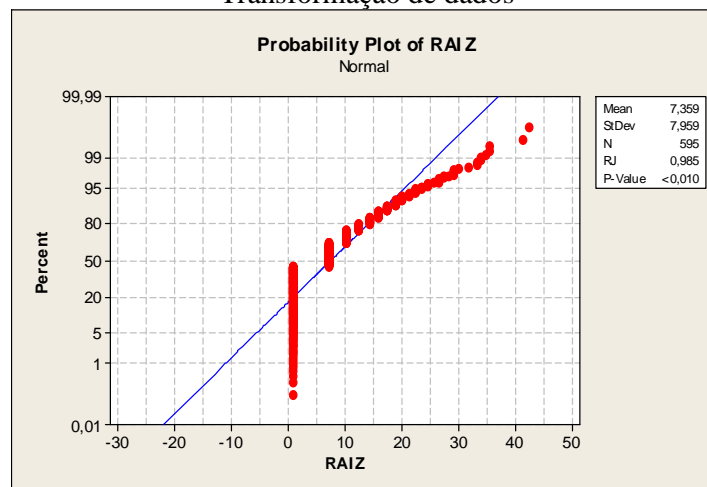
CONTROLE	0	50	300	50	0	350	200	200	50	150	50	0	100	
	0	0	100	250	50	100	50	50	100	200				
	0	0	250	0	0	300	300	450	50	300	50	250	100	
	0	0	0	0	50	50	250	50	0	0	50	0	0	
	0	0	0	0	0	150	50	50	0	0	50	0	0	
	0	0	0	50	50	50	50	50	100	250	350	150	150	
	0	0	0	0	50	150	0	50	50	100	200	200	250	
	0	0	150	0	250	600	400	50	350	400	850	400	1150	
	0	0	50	150	50	50	50	50	50	100	50	50	100	
	0	0	0	50	50	50	50	50	50	50	50	100	200	
	0	0	50	0	200	0	100	0	50	50	150	200	50	
	0	50	0	0	0	50	50	0	100	0	0	0	50	
	0	0	0	0	0	50	0	0	0	0	50	100	50	
	0	0	0	50	300	300	150	50	50	600	400	250	350	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0	50	0	100	50	50	50	0	0	0	100	150	
	0	0	50	250	100	200	50	300	100	100	350	250	600	
	0	0	50	0	0	0	50	0	0	0	100	50	100	
	AC001/5GR	0	0	0	0	0	0	150	100	100	0	100	100	50
0		0	200	200	700	350	100	200	100	250	150	700	850	
0		0	0	0	50	50	0	0	0	50	0	0	0	
0		0	500	1700	1200	200	1800	1150	500	850	350	400	900	
AC001/10GR		0	0	0	0	50	50	0	0	0	0	50	0	0
		0	0	1250	0	100	100	250	200	300	450	200	150	100
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0
		0	0	0	0	0	0	50	0	0	250	50	100	50
		0	0	0	0	100	0	350	150	250	150	300	300	200
		0	0	0	0	100	350	50	50	50	150	200	150	50
		0	0	0	50	0	0	100	0	0	50	50	150	0
		0	0	0	0	0	100	300	0	250	350	0	50	100
NF34A/5GR		0	0	0	0	50	0	0	0	0	0	0	50	150
		0	0	0	0	0	0	500	0	50	50	50	0	0
		0	0	0	0	50	0	50	0	50	50	50	150	100
		0	0	0	50	150	0	50	150	350	850	550	100	250
		0	0	600	200	550	400	400	700	1100	550	1100	500	1250
		0	0	0	100	0	50	50	50	0	0	50	50	50
		0	0	0	0	50	50	250	50	50	50	100	150	100
	0	0	0	0	50	50	0	50	0	0	50	0	0	
	0	0	0	0	50	100	50	0	0	0	50	50	50	
	0	0	100	0	50	100	100	0	0	0	150	100	100	
	0	0	250	400	100	100	50	100	100	50	50	0	0	
NF34A/10GR	0	0	100	500	200	800	750	200	300	1000	150	750	450	
	0	0	0	100	350	0	200	0	50	300	150	450	500	
	0	0	0	0	0	0	50	0	50	0	0	0	50	
	0	0	0	0	100	0	0	100	50	100	0	0	50	
	0	0	200	100	250	200	500	250	450	0	300	700	650	

OPG

Teste de normalidade



Transformação de dados



Transformação não resolve

Kruskal-Wallis Test: OPG versus Trat

595 cases were used
3 cases contained missing values

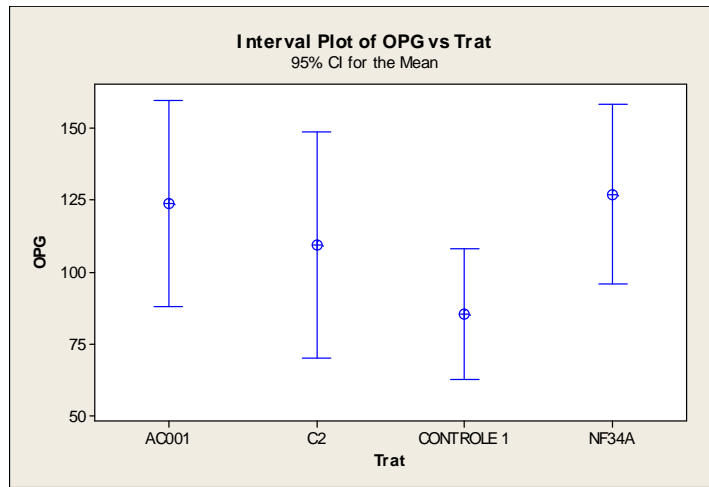
Kruskal-Wallis Test on OPG

Trat	N	Median	Ave Rank	Z
AC001	208	0,000000000	287,3	-1,11
C2	91	5,00000E+01	310,4	0,75
CONTROLE 1	88	5,00000E+01	307,4	0,56
NF34A	208	5,00000E+01	299,3	0,13
Overall	595		298,0	

H = 1,55 DF = 3 P = 0,671

H = 1,73 DF = 3 P = 0,631 (adjusted for ties)

Não há efeito significativo de tratamento



Regression Analysis: OPG versus Dose; Dose2

The regression equation is

$$\text{OPG} = 97,5 + 17,9 \text{ Dose} - 1,71 \text{ Dose}^2$$

PONTOS DE MÁXIMO (5,23 ;144,34)

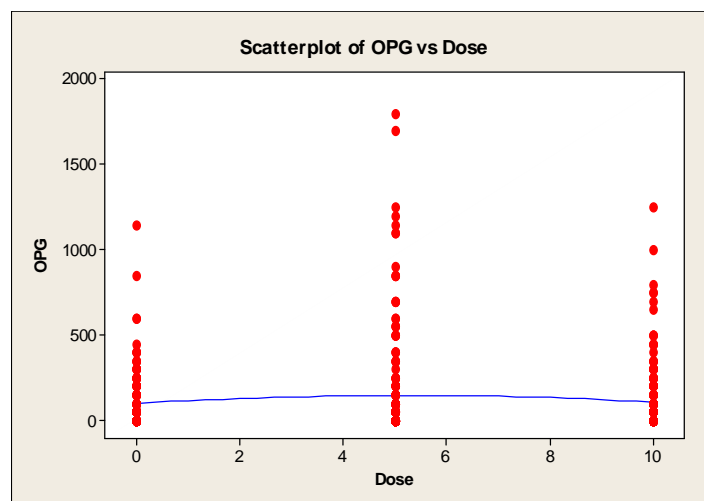
595 cases used, 3 cases contain missing values

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	97,49	16,54	5,89	0,000 **
Dose	17,942	8,039	2,23	0,026 *
Dose2	-1,7089	0,7617	-2,24	0,025 *

S = 221,262 R-Sq = 0,9% R-Sq(adj) = 0,5%

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	2	250249	125125	2,56	0,078
Residual Error	592	28982499	48957		
Total	594	29232748			



Regression Analysis: OPG versus Dias

The regression equation is

$$\text{OPG} = 33,8 + 0,993 \text{ Dias}$$

595 cases used, 3 cases contain missing values

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	33,84	16,70	2,03	0,043 *
Dias	0,9929	0,1693	5,87	0,000 **

S = 215,855 R-Sq = 5,5% R-Sq(adj) = 5,3%

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	1602830	1602830	34,40	0,000
Residual Error	593	27629918	46593		
Total	594	29232748			

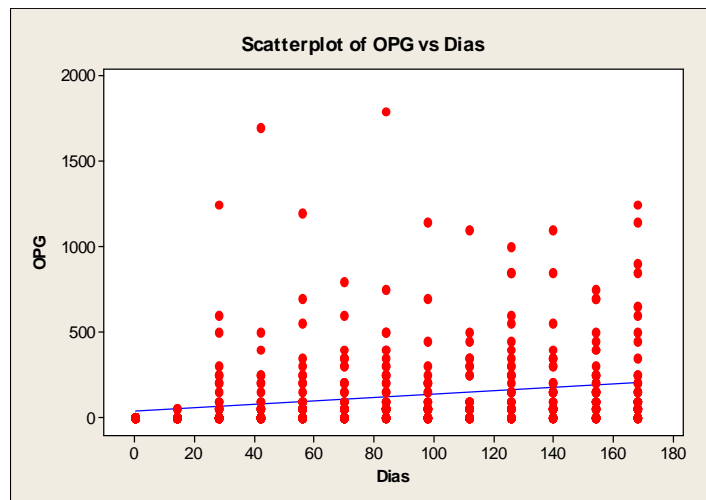
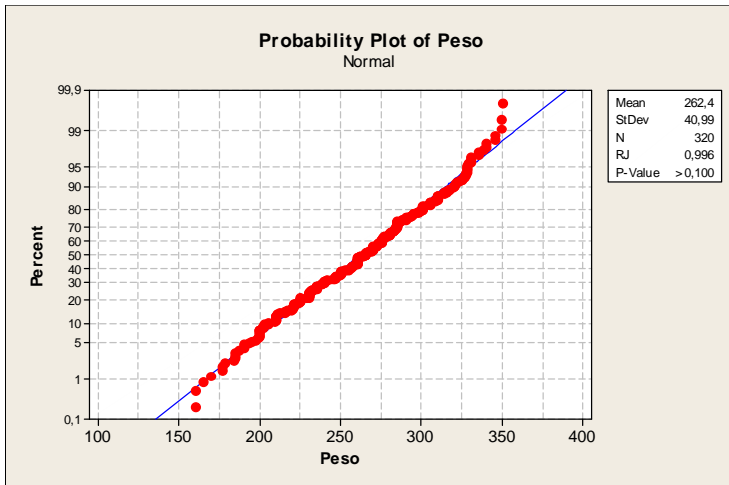


Tabela 07 – Peso de fêmeas bovinas (kg) observado após administração de diferentes doses dos fungos *D. flagrans* (isolado AC001) ou *M. thaumasium* (isolado NF34A).

	0 DPFA	28 DPFA	56 DPFA	84 DPFA	112 DPFA	140 DPFA	168 DPFA
CONTROLE	250	284	305	301	319	320	315
	178	200	221	230	248	-	-
	187	210	233	273	260	250	260
	160	177	200	210	231	236	231
	285	310	328	325	345	335	326
	221	235	262	267	283	285	275
	275	305	328	325	349	349	350
CONTROLE	225	260	275	278	288	285	290
	190	210	229	241	270	258	258
	256	270	282	305	310	310	317
	215	247	260	268	277	270	280
	246	282	290	308	320	323	322
	202	235	240	260	277	257	265
	197	200	210	220	235	233	240
AC001/5GR	256	293	310	308	315	310	321
	200	225	247	249	260	260	280
	210	245	260	269	270	275	284
	212	251	275	277	272	285	285
	202	232	260	270	272	275	281
	238	257	285	293	297	300	300
	225	255	285	297	295	300	317
	225	260	275	294	290	285	288
AC001/10GR	275	305	320	338	325	330	340
	165	195	202	209	222	210	216
	230	250	255	265	260	257	265
	240	283	285	292	285	281	280
	160	185	193	205	217	205	215
	170	200	199	221	211	203	210
	285	314	328	340	335	328	345
	235	257	261	272	283	274	270
NF34A/5GR	260	262	293	300	298	300	295
	253	270	305	314	330	328	329
	177	190	225	230	230	238	240
	247	266	291	299	310	310	317
	190	210	235	252	250	246	260
	239	250	273	281	270	280	287
	225	221	260	276	284	282	278
	185	200	230	240	241	244	250
NF34A/10GR	219	220	223	247	263	265	270
	283	300	310	326	327	327	330
	221	250	260	265	272	270	265
	184	200	220	235	230	230	235
	250	248	280	273	276	275	276
	224	235	255	260	265	266	256
	255	266	285	290	299	303	300
	185	200	225	230	231	230	232

PESO

Teste de normalidade



Os dados tem distribuição normal

DADOS NÃO BALANCEADOS PARA A ANÁLISE DE VARIÂNCIA

Kruskal-Wallis Test: Peso versus Trat

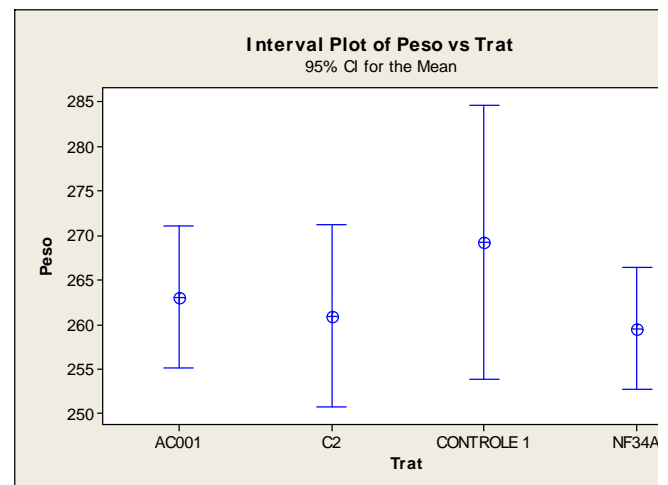
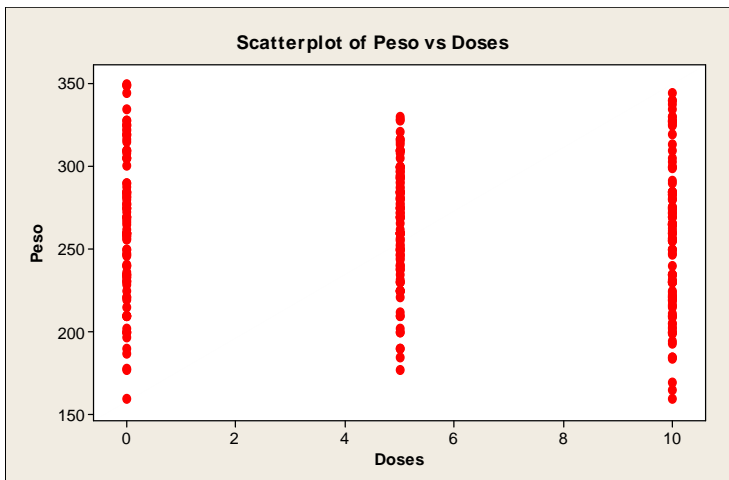
320 cases were used
2 cases contained missing values

Kruskal-Wallis Test on Peso

Trat	N	Median	Ave Rank	Z
AC001	112	270,0	164,1	0,51
C2	49	260,0	156,4	-0,34
CONTROLE 1	47	273,0	175,0	1,16
NF34A	112	260,0	152,6	-1,12
Overall	320		160,5	

H = 2,24 DF = 3 P = 0,525

H = 2,24 DF = 3 P = 0,524 (adjusted for ties)



Não há efeito significativo de tratamento

Não há tendência em função de doses

Regression Analysis: Peso versus Dias; Dias2

The regression equation is

$$\text{Peso} = 223 + 0,833 \text{ Dias} - 0,00298 \text{ Dias}^2$$

PONTO DE MÁXIMO (139,77 ;291,21)

320 cases used, 2 cases contain missing values

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	222,950	4,599	48,48	0,000 **
Dias	0,8326	0,1284	6,48	0,000 **
Dias2	-0,0029838	0,0007355	-4,06	0,000 **

S = 35,7271 R-Sq = 24,5% R-Sq(adj) = 24,0%

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	2	131406	65703	51,47	0,000
Residual Error	317	404627	1276		
Total	319	536033			

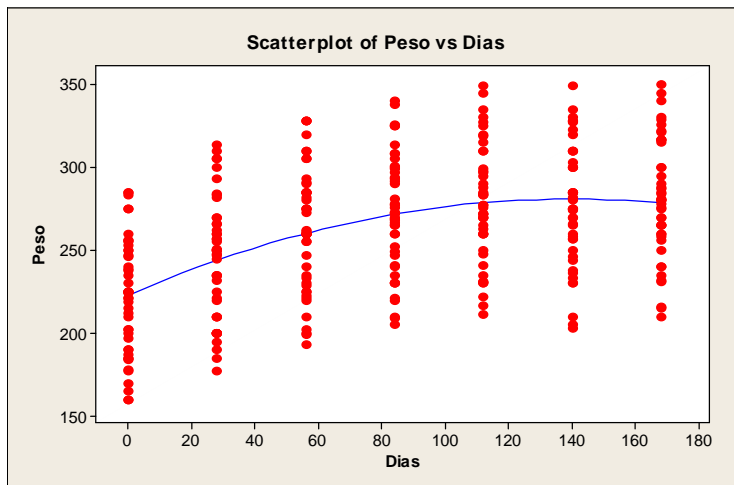
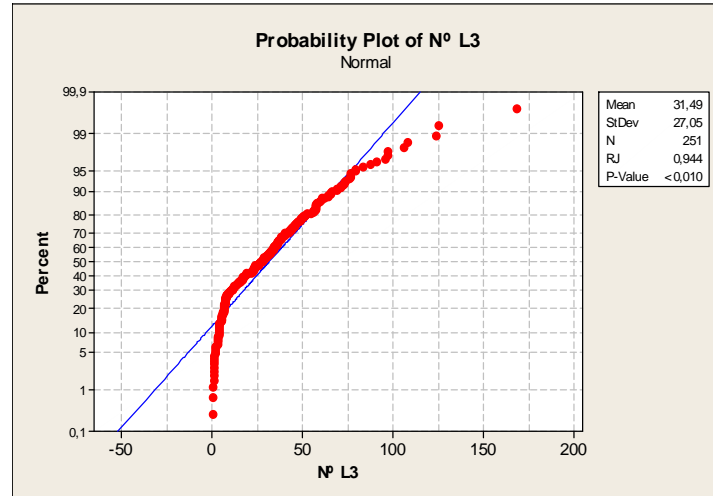


Tabela 08 – Número médio de larvas infectantes de tricostrongilídeos (L₃) por grama de fezes, recuperadas pelo método de Baermann, após administração de diferentes doses dos fungos *D. flagrans* (isolado AC001) ou *M. thaumasium* (isolado NF34A).

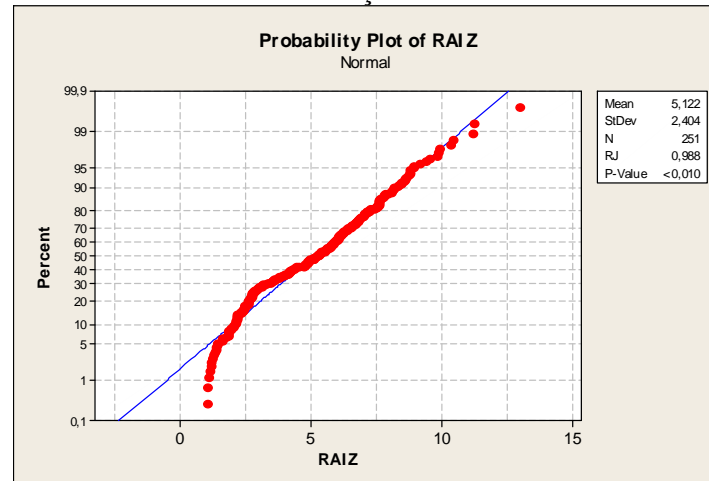
	0 DPFA	28 DPFA	56 DPFA	84 DPFA	112 DPFA	140 DPFA	168 DPFA
CONTROLE	1,2	36,0	8,7	76,4	52,2	38,3	75,9
	0,9	65,6	5,7	34,3	57,9	38,9	7,0
	0,7	42,7	8,3	36,0	59,2	76,7	40,0
	0,6	40,2	9,7	15,1	40,4	31,1	13,7
	1,0	48,0	4,2	38,3	56,5	7,6	42,0
	0,6	16,7	9,3	70,6	58,1	16,3	57,5
	0,8	41,5	7,7	45,1	54,0	34,8	39,3
CONTROLE	4,0	56,0	6,5	17,5	35,9	22,3	31,0
	7,0	23,7	26,4	14,9	18,7	35,0	73,2
	4,3	64,2	28,5	21,9	12,9	47,0	29,9
	3,8	25,5	29,8	6,8	57,3	36,5	37,8
	4,2	17,2	34,3	23,1	17,0	25,4	7,5
	1,4	16,9	25,5	20,1	45,9	76,1	54,4
	4,1	33,9	25,2	17,4	31,3	40,4	39,0
AC001/5GR	6,7	27,5	23,9	68,6	57,1	46,0	105,6
	0,8	60,4	72,4	50,1	96,8	50,0	36,9
	3,3	95,7	97,2	42,7	61,0	44,8	22,9
	1,5	57,5	70,8	39,3	90,5	39,9	44,5
	4,0	32,5	125,0	56,3	55,8	33,3	43,4
	5,3	78,9	167,8	62,3	65,8	9,2	33,8
	3,6	58,8	92,8	53,2	71,2	37,2	47,8
AC001/10GR	8,1	35,0	4,9	11,5	32,2	7,4	3,0
	3,3	34,0	2,1	11,6	7,4	22,3	1,5
	3,7	10,3	7,0	17,5	6,3	26,9	6,0
	1,4	26,6	11,7	22,3	6,4	4,9	5,7
	4,0	25,6	9,3	13,8	18,4	6,4	31,9
	7,0		5,5	6,7	14,0	5,3	33,2
	4,6	26,3	6,8	13,9	14,1	12,2	13,5
NF34A/5GR	5,4	4,2	18,8	32,8	33,8	64,3	46,4
	6,4	7,0	7,8	46,9	66,4	73,3	48,9
	6,3	3,0	17,1	27,5	57,5	69,2	73,9
	4,2	2,1	23,0	8,0	79,0	83,0	19,2
	5,2	2,9	30,8	12,4	51,4	45,4	28,7
	5,9	2,6	42,1	36,5	48,7	27,6	48,4
	5,6	3,6	23,3	27,3	56,1	60,5	44,2
NF34A/10GR	4,2	32,6	23,5	12,4	48,9	35,6	38,3
	3,6	35,3	43,7	36,5	15,6	15,4	59,9
	8,3	28,2	108,2	44,5	50,5	35,8	57,2
	3,0	6,6	30,1	51,7	29,1	45,6	23,0
	0,9	28,7	123,7	44,4	31,7	37,2	13,6
	1,3	10,9	87,2	12,0	18,0	23,9	23,1
	3,5	23,7	69,4	33,6	32,3	32,2	35,9

NÚMERO DE LARVAS POR GRAMA DE FEZES

Teste de normalidade



Transformação de dados



Transformação não resolve

Kruskal-Wallis Test: Nº L3 versus Trat

251 cases were used
1 cases contained missing values

Kruskal-Wallis Test on Nº L3

Trat	N	Median	Ave Rank	Z
AC001	83	23,90	122,4	-0,56
C2	42	24,55	120,5	-0,53
CONTROLE 1	42	36,00	130,6	0,45
NF34A	84	28,90	130,0	0,62
Overall	251		126,0	

H = 0,87 DF = 3 P = 0,832

H = 0,87 DF = 3 P = 0,832 (adjusted for ties)

Não há efeito significativo de tratamento

Regression Analysis: Nº L3 versus Dose; Doses2

The regression equation is

$$\text{Nº L3} = 29,6 + 5,54 \text{ Dose} - 0,621 \text{ Doses2}$$

PONTO DE MÁXIMO (4,46; 41,96)

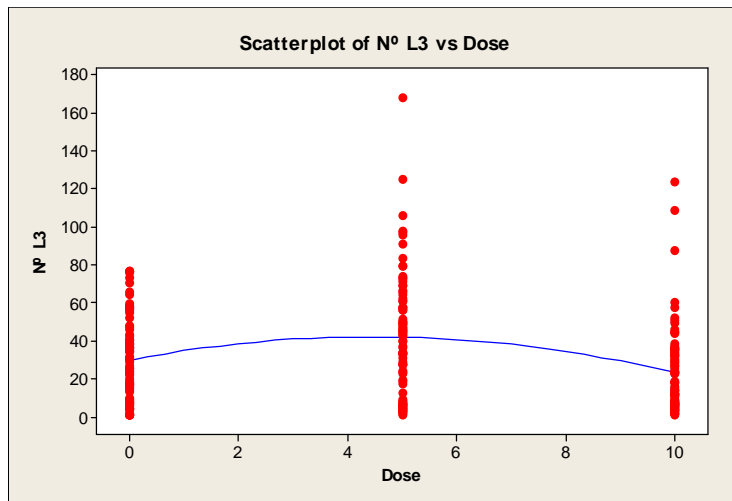
251 cases used, 1 cases contain missing values

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	29,612	2,836	10,44	0,000 **
Dose	5,543	1,447	3,83	0,000 **
Doses2	-0,6208	0,1391	-4,46	0,000 **

S = 25,9957 R-Sq = 8,4% R-Sq(adj) = 7,6%

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	2	15271,2	7635,6	11,30	0,000
Residual Error	248	167592,5	675,8		
Total	250	182863,7			



Regression Analysis: N° L3 versus Dias; Dias2

The regression equation is

$N^{\circ} L3 = 9,24 + 0,573 Dias - 0,00254 Dias2$
PONTO DE MÁXIMO (112,80 ; 41,56)

251 cases used, 1 cases contain missing values

Predictor	Coef	SE Coef	T	P
Constant	9,239	3,635	2,54	0,012 *
Dias	0,5729	0,1011	5,67	0,000 **
Dias2	-0,0025416	0,0005782	-4,40	0,000 **

S = 24,9263 R-Sq = 15,7% R-Sq(adj) = 15,1%

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	2	28776	14388	23,16	0,000
Residual Error	248	154088	621		
Total	250	182864			

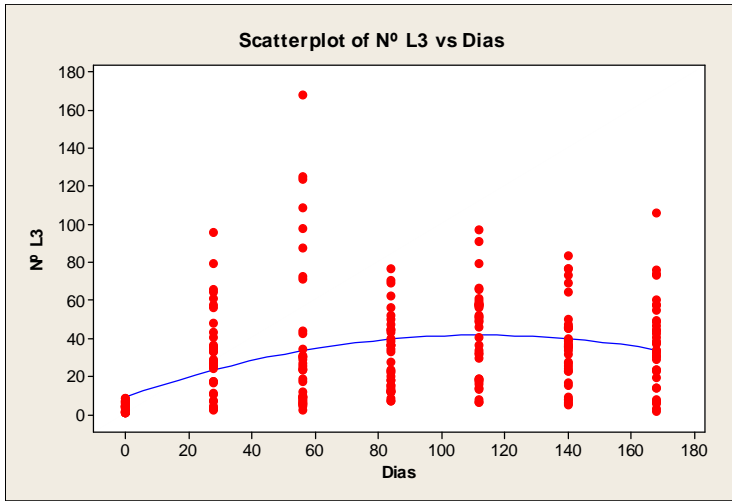
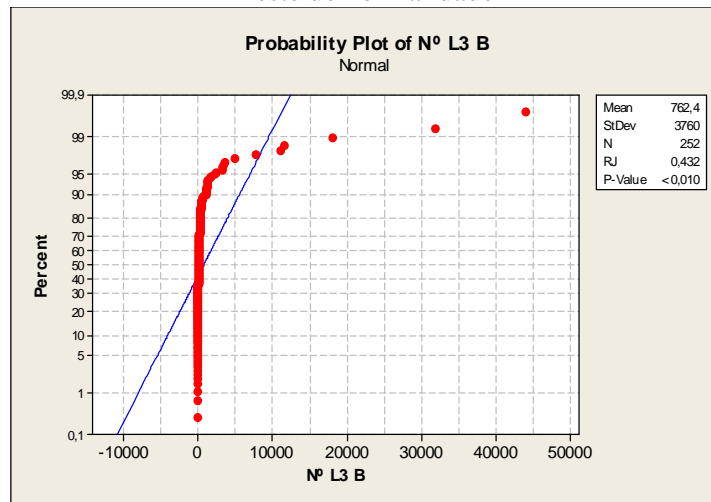


Tabela 09 – Número médio de larvas infectantes de tricostrongilídeos (L₃) por quilograma de matéria seca de pastagem (L₃/kgMS), recuperadas pelo método de Baermann, após administração de diferentes doses dos fungos *D. flagrans* (isolado AC001) ou *M. thaumasium* (isolado NF34A).

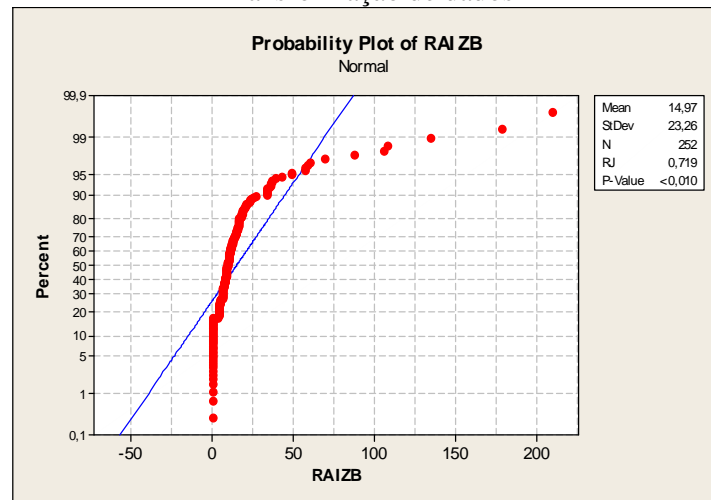
	0 DPFA	28 DPFA	56 DPFA	84 DPFA	112 DPFA	140 DPFA	168 DPFA
CONTROLE	1169,20	128,27	0,00	666,65	247,22	56,94	62,89
	83,50	88,90	0,00	0,00	382,04	75,90	75,47
	271,90	11623,60	0,00	0,00	269,64	18,98	75,47
	104,40	2371,42	0,00	355,52	44,94	208,74	62,89
	41,80	19,68	0,00	0,00	292,15	132,83	75,47
	20,90	108,58	22,62	0,00	44,94	113,86	88,04
	281,95	2390,08	3,77	170,36	213,49	101,21	73,37
CONTROLE	1169,20	21,88	0,00	218,81	185,51	68,79	210,37
	83,50	1312,90	0,00	3304,13	148,41	84,56	154,26
	271,90	153,16	0,00	21,88	166,96	110,05	140,24
	104,40	87,52	41,66	65,64	148,41	151,35	98,16
	41,80	4879,63	41,67	525,16	333,92	96,32	56,10
	20,90	18074,39	0,00	437,62	352,48	137,59	0,00
	281,95	4088,25	13,89	762,21	222,62	108,11	109,86
AC001/5GR	1169,20	88,08	0,00	21,41	157,18	48,60	46,95
	83,50	264,24	23,75	0,00	176,83	85,05	50,61
	271,90	66,07	0,00	0,00	333,70	243,00	37,95
	104,40	264,25	0,00	0,00	255,44	24,30	88,58
	41,80	22,02	0,00	64,23	334,14	121,50	126,53
	20,90	1365,25	0,00	42,82	235,79	72,90	75,90
	281,95	344,99	3,96	21,41	248,85	99,23	71,09
AC001/10GR	1169,20	88,18	41,75	63,83	399,99	64,75	12,45
	83,50	1869,49	0,00	21,28	104,34	25,90	74,72
	271,90	17,64	125,26	0,00	226,07	90,66	49,80
	104,40	52,91	62,63	0,00	226,07	106,56	12,45
	41,80	2388,40	229,64	0,00	226,07	77,70	0,00
	20,90	1234,79	0,00	21,28	191,29	103,61	0,00
	281,95	941,90	76,55	17,73	228,97	78,20	24,90
NF34A/5GR	1169,20	180,99	0,00	11153,85	116,72	104,16	136,35
	83,50	226,23	55,97	432,69	194,53	156,25	45,45
	271,90	3506,77	0,00	144,22	330,67	156,25	75,75
	104,40	3687,77	0,00	48,06	175,07	243,70	0,00
	41,80	588,23	0,00	264,41	116,71	86,80	0,00
	20,90	339,34	0,00	24,03	252,87	138,89	0,00
	281,95	1421,56	9,33	2011,21	197,76	147,68	42,93
NF34A/10GR	1169,20	7745,50	20,79	524,86	382,78	110,28	50,59
	83,50	44,64	20,79	43895,03	263,15	128,67	50,59
	271,90	0,00	41,58	27,62	1363,64	165,44	84,32
	104,40	558,03	0,00	359,11	511,39	349,26	0,00
	41,80	3284,25	62,37	745,85	1291,86	441,18	0,00
	20,90	111,60	415,80	31767,96	1554,98	128,67	0,00
	281,95	1957,34	93,56	12886,74	894,63	220,58	30,92

NÚMERO DE LARVAS POR KG/MS

Teste de normalidade



Transformação de dados



A transformação não resolveu o problema de anormalidade

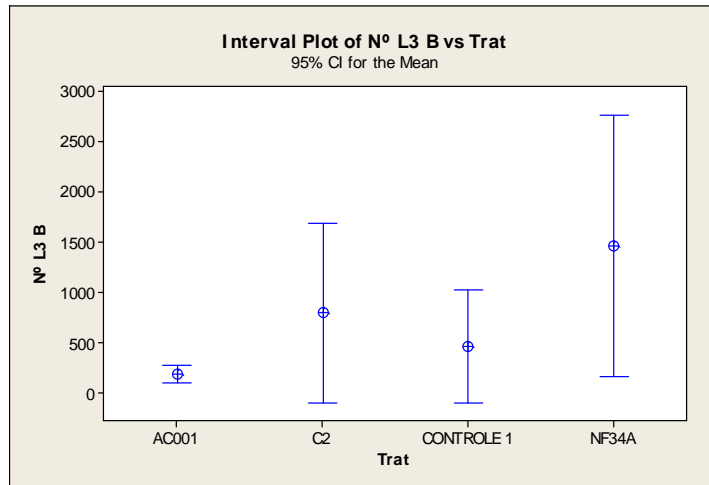
Kruskal-Wallis Test: Nº L3 B versus Trat

Kruskal-Wallis Test on Nº L3 B

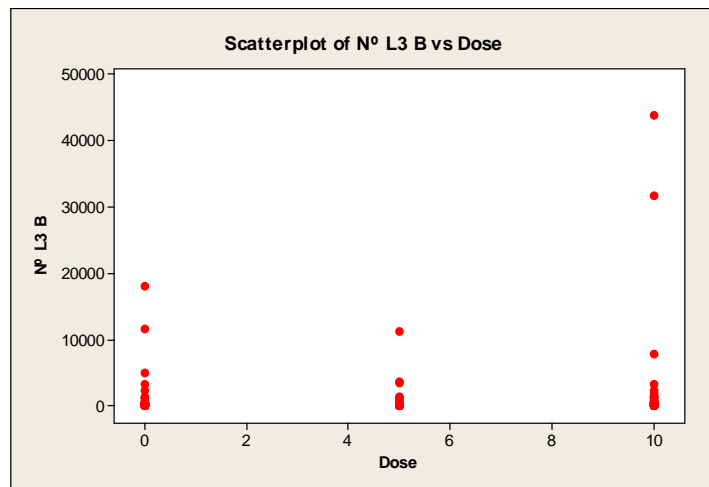
Trat	N	Median	Ave Rank	Z
AC001	84	69,49	111,5	-2,30
C2	42	123,82	138,2	1,14
CONTROLE 1	42	75,47	114,4	-1,18
NF34A	84	128,67	141,7	2,34
Overall	252		126,5	

H = 9,41 DF = 3 P = 0,024

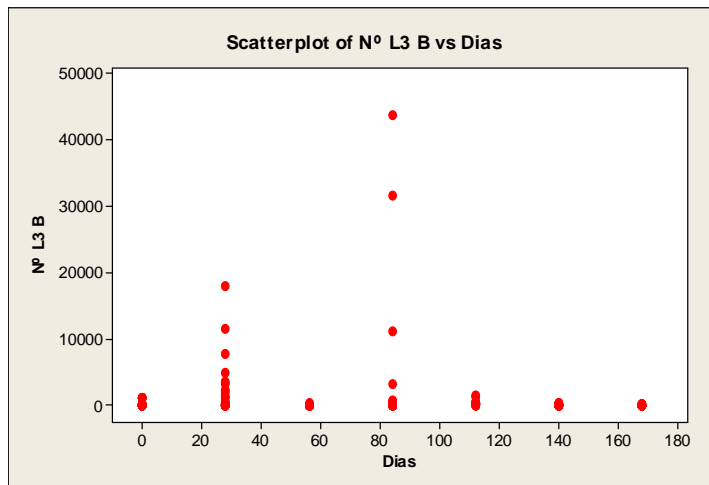
H = 9,46 DF = 3 P = 0,024 (adjusted for ties)



Contrariando o resultado de Kruskal-Wallis, os intervalos de confiança para as médias não apresentaram diferenças significativas



Não há tendência significativa em função de doses



Não há tendência significativa em função de dias