

ALESSANDRO SPALENZA MACIEL

**ATIVIDADE *in vitro* DOS FUNGOS *Arthrobotrys robusta*, *Duddingtonia*  
*flagrans* E *Monacrosporium thaumasium* SOBRE LARVAS INFECTANTES  
DE *Ancylostoma* spp. DE CÃES E SUA ESPORULAÇÃO EM MEIOS DE  
CULTURA**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL

2005

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

T

M152a  
2005

Maciel, Alessandro Spalenza, 1974-  
Atividade *in vitro* dos fungos *Arthrobotrys robusta*,  
*Duddingtonia flagrans* e *Monacrosporium thaumasium*  
sobre larvas infectantes de *Ancylostoma* spp. de cães e  
sua esporulação em meios de cultura / Alessandro Spalenza  
Maciel. – Viçosa : UFV, 2005.

xvi, 75f. : il. ; 29cm.

Inclui anexo.

Orientador: Jackson Victor de Araújo.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 49-73.

1. Cão - Doenças. 2. *Ancylostoma* - Controle biológico.  
3. Fungos nematófagos. 4. Esporos de fungos. I. Univer-  
sidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 636.70896

ALESSANDRO SPALENZA MACIEL

**ATIVIDADE *in vitro* DOS FUNGOS *Arthrobotrys robusta*, *Duddingtonia*  
*flagrans* E *Monacrosporium thaumasium* SOBRE LARVAS INFECTANTES  
DE *Ancylostoma* spp. DE CÃES E SUA ESPORULAÇÃO EM MEIOS DE  
CULTURA**

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

APROVADA: 15 de abril de 2005

---

Prof. Leandro Grassi de Freitas

---

Prof. Lissandro Gonçalves Conceição

---

Prof<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> Aparecida S. Moreira

---

Prof<sup>a</sup>. Rosângela D’Arc de Oliveira

---

Prof. Jackson Victor de Araújo  
(Orientador)

À Deus.

Aos meus pais, Maria de Lourdes e José.

Aos meus irmãos, Eunize, Jones e Herzem.

À minha namorada Maria Eugênia

À minha cadela, Juni.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela presença, fidelidade e amor maior.

A meus pais Maria de Lourdes Spalenza Maciel e José Gonçalves Maciel pelo amor. A minha irmã Eunize Maciel Zambolim e Professor Laércio Zambolim, pelo apoio moral e financeiro. À minha namorada Maria Eugênia Andrade de Oliveira pelo amor e carinho irrestrito. A minha querida e inseparável cadela Juni, pelo amor incondicional.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Medicina Veterinária, pela estrutura disponibilizada.

Ao Professor Jackson Victor de Araújo, pela orientação, conselhos, oportunidade, confiança e amizade.

Aos membros da banca examinadora, Professores Leandro Grassi de Freitas, Lissandro Gonçalves Conceição, Maria Aparecida Scatamburlo Moreira e Rosângela D’Arc de Oliveira pelos considerações e importantes sugestões.

Aos professores e funcionários do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, pelo convívio e auxílio. Aos funcionários e amigos do Laboratório de Parasitologia Veterinária, Arthur Kanadani Campos, José Geraldo de Oliveira e Ademir Alves, pela amizade, auxílio e apoio técnico.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

ALESSANDRO SPALENZA MACIEL, filho de Maria de Lourdes Spalenza Maciel e José Gonçalves Maciel, nasceu em 16 de janeiro de 1974, em Colatina, Espírito Santo.

Iniciou seus estudos na Universidade Federal de Viçosa – UFV em 1994, graduando-se em Medicina Veterinária em 1999 pelo Departamento de Medicina Veterinária desta instituição.

Em março de 2000, iniciou o curso de pós-graduação no Departamento de Economia Rural da Universidade Federal de Viçosa obtendo o título de *Magister Scientiae* em Economia Aplicada em junho de 2002.

Em março de 2004, iniciou um segundo curso de pós-graduação no Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa obtendo o título de *Magister Scientiae* em Medicina Veterinária em abril de 2002.

## ÍNDICE

|                                                          | Página |
|----------------------------------------------------------|--------|
| LISTA DE FIGURAS.....                                    | vii    |
| LISTA DE TABELAS.....                                    | ix     |
| LISTA DE GRÁFICOS.....                                   | x      |
| RESUMO.....                                              | xiii   |
| ABSTRACT.....                                            | xv     |
| 1. INTRODUÇÃO.....                                       | 1      |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA.....                            | 4      |
| 2.1. Nematóides.....                                     | 4      |
| 2.1.1. <i>Ancylostoma</i> spp. em cães.....              | 6      |
| 2.1.2. <i>Ancylostoma</i> spp. em humanos.....           | 7      |
| 2.2. Fungos Nematófagos.....                             | 9      |
| 2.2.1. <i>Arthrobotrys robusta</i> (I31).....            | 13     |
| 2.2.2. <i>Duddingtonia flagrans</i> (CG768).....         | 15     |
| 2.2.3. <i>Monacrosporium thaumasium</i> (NF34A).....     | 18     |
| 2.3. Biocontrole de nematóides parasitas de animais..... | 19     |
| 2.4. Mecanismo de ação de fungos nematófagos.....        | 21     |
| 4. OBJETIVOS.....                                        | 24     |
| 4.1. Objetivo Geral.....                                 | 24     |
| 4.2. Objetivos Específicos.....                          | 24     |
| 3. HIPÓTESE.....                                         | 24     |

|                                                                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5. MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                                                                                                              | 25 |
| 5.1. Organismos.....                                                                                                                                                                    | 25 |
| 5.1.1. Isolados Fúngicos.....                                                                                                                                                           | 25 |
| 5.1.2. Larvas infectantes (L <sub>3</sub> ) de <i>Ancylostoma</i> spp.....                                                                                                              | 26 |
| 5.2. Ensaio Experimentais.....                                                                                                                                                          | 26 |
| 5.2.1. Predação de larvas infectantes (L <sub>3</sub> ) de <i>Ancylostoma</i> spp. em meio de cultura AA 2%.....                                                                        | 27 |
| 5.2.2. Predação de larvas infectantes (L <sub>3</sub> ) de <i>Ancylostoma</i> spp. em coproculturas de fezes de cães.....                                                               | 28 |
| 5.2.3. Esporulação dos isolados fúngicos de <i>Arthrobotrys robusta</i> (I31), <i>Duddingtonia flagrans</i> (CG768) e <i>Monacrosporium thaumasium</i> (NF34A) em meios de cultura..... | 29 |
| 5.4. Análises Estatísticas.....                                                                                                                                                         | 30 |
| 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                                                                                                                                                          | 31 |
| 6.1. Predação de larvas infectantes (L <sub>3</sub> ) de <i>Ancylostoma</i> spp. em meio de cultura AA 2%.....                                                                          | 31 |
| 6.2. Predação de larvas infectantes (L <sub>3</sub> ) de <i>Ancylostoma</i> spp. em coproculturas de fezes de cães.....                                                                 | 39 |
| 6.3. Esporulação dos isolados fúngicos de <i>Arthrobotrys robusta</i> (CG768), <i>Duddingtonia flagrans</i> (I31) e <i>Monacrosporium thaumasium</i> (NF34A) em meios de cultura.....   | 42 |
| 7. CONCLUSÕES.....                                                                                                                                                                      | 47 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                                                                                                                                      | 49 |
| 9. ANEXOS.....                                                                                                                                                                          | 74 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                       | Página |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Figura 1 Larva infectante (L <sub>3</sub> ) de <i>Ancylostoma</i> spp. em placa de Petri do controle contendo meio ágar-água 2% (Aumento 10 x 20).....                                                                | 3      |
| Figura 2 Dermatite Linear Serpiginosa causada por larva infectante (L <sub>3</sub> ) de <i>Ancylostoma</i> spp. em abdômen de adulto do sexo masculino infectado acidentalmente durante os ensaios experimentais..... | 8      |
| Figura 3 Conídios de <i>Arthrobotrys robusta</i> em placa de Petri contendo meio ágar-água 2% (Aumento 10 x 20).....                                                                                                  | 15     |
| Figura 4 Conídios de <i>Duddingtonia flagrans</i> em placa de Petri contendo meio ágar-água 2% (Aumento 10 x 20).....                                                                                                 | 16     |
| Figura 5 Conídio de <i>Monacrosporium thaumasium</i> em placa de Petri contendo meio ágar-água 2% (Aumento 10 x 20).....                                                                                              | 18     |
| Figura 6 Larva infectante (L <sub>3</sub> ) de <i>Ancylostoma</i> spp. em desintegração após predação por <i>Arthrobotrys robusta</i> em placa de Petri contendo meio ágar-água 2% (Aumento 10 x 10).....             | 22     |
| Figura 7 Larvas infectantes (L <sub>3</sub> ) de <i>Ancylostoma</i> spp. em placa de Petri do controle sem fungos contendo meio ágar-água 2% (Aumento 10 x 4).....                                                    | 35     |
| Figura 8 Predação de larvas infectantes (L <sub>3</sub> ) de <i>Ancylostoma</i> spp.                                                                                                                                  |        |

|           |                                                                                                                                                                                          |    |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|           | por <i>Duddingtonia flagrans</i> em placa de Petri contendo<br>meio ágar-água 2% (Aumento 10 x 4).....                                                                                   | 35 |
| Figura 9  | Predação de larva infectante (L <sub>3</sub> ) de <i>Ancylostoma</i> spp. por<br><i>Arthrobotrys robusta</i> em placa de Petri contendo meio<br>ágar-água 2% (Aumento 10 x 20).....      | 36 |
| Figura 10 | Predação de larva infectante (L <sub>3</sub> ) de <i>Ancylostoma</i> spp. por<br><i>Monacrosporium thaumasium</i> em placa de Petri contendo<br>meio ágar-água 2% (Aumento 10 x 20)..... | 36 |
| Figura 11 | Clamidósporos de <i>Duddingtonia flagrans</i> em placa de Petri<br>contendo meio ágar-água 2% (Aumento 10 x 10).....                                                                     | 45 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Página |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Tabela 1    Análise de variância da média de larvas infectantes (L <sub>3</sub> ) não predadas de <i>Ancylostoma</i> spp. por campo de 4 mm de diâmetro em meio AA 2% observados nos grupos durante um período de 10 dias.....                                                                                                                                                           | 74     |
| Tabela 2    Média diária de larvas infectantes (L <sub>3</sub> ) não predadas de <i>Ancylostoma</i> spp. por campo de 4 mm de diâmetro em meio ágar-água 2% no período de 10 dias nos tratamentos com os isolados fúngicos de <i>Arthrobotrys robusta</i> (I31), <i>Duddingtonia flagrans</i> (CG768) e <i>Monacrosporium thaumasium</i> (NF34A) e no controle sem fungos.....           | 32     |
| Tabela 3    Análise de variância da média de larvas infectantes (L <sub>3</sub> ) de <i>Ancylostoma</i> spp. recuperadas do meio AA 2% pelo método de Baermann no décimo dia dos tratamentos após interação com os isolados fúngicos de <i>Arthrobotrys robusta</i> (I31), <i>Duddingtonia flagrans</i> (CG768) e <i>Monacrosporium thaumasium</i> (NF34A) e do controle sem fungos..... | 74     |
| Tabela 4    Análise de variância da média de larvas infectantes (L <sub>3</sub> ) de <i>Ancylostoma</i> spp. recuperadas pelo método de Baermann no décimo dia das coproculturas dos tratamentos após interação com os isolados fúngicos de <i>Arthrobotrys robusta</i>                                                                                                                  |        |

|          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|          | (I31), <i>Duddingtonia flagrans</i> (CG768) e <i>Monacrosporium thaumasium</i> (NF34A) e do controle sem fungos.....                                                                                                                                                                                                                   | 75 |
| Tabela 5 | Análise de variância da média de conídios produzidos pelos isolados fúngicos de <i>Arthrobotrys robusta</i> (I31), <i>Duddingtonia flagrans</i> (CG768) e <i>Monacrosporium thaumasium</i> (NF34A) nos meios AA 2%, batata-dextrose-ágar 2% (BDA 2%), corn-meal-agar 2% (CMA 2%) e yeast-phosphate-sulphate-sacarose-agar (YPSSA)..... | 75 |
| Tabela 6 | Médias da produção de conídios dos isolados fúngicos de <i>Arthrobotrys robusta</i> (I31), <i>Duddingtonia flagrans</i> (CG768) e <i>Monacrosporium thaumasium</i> (NF34A) nos meios AA 2%, batata-dextrose-ágar 2% (BDA 2%), corn-meal-agar 2% (CMA 2%) e yeast-phosphate-sulphate-sacarose-agar (YPSSA).....                         | 43 |

## LISTA DE GRÁFICOS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Página |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Gráfico 1 Curvas de regressão linear de larvas infectantes (L <sub>3</sub> ) não predadas de <i>Ancylostoma</i> spp. observadas em campos de 4 mm de diâmetro em meio AA 2% em função do tempo nos tratamentos com os isolados fúngicos de <i>Arthrobotrys robusta</i> (I31), <i>Duddingtonia flagrans</i> (CG768) e <i>Monacrosporium thaumasium</i> (NF34A) e no controle sem fungos.....                    | 33     |
| Gráfico 2 Média de larvas infectantes (L <sub>3</sub> ) de <i>Ancylostoma</i> spp. recuperadas de meio AA 2% pelo método de Baermann no décimo dia dos tratamentos após interação com os isolados fúngicos de <i>Arthrobotrys robusta</i> (I31), <i>Duddingtonia flagrans</i> (CG768) e <i>Monacrosporium thaumasium</i> (NF34A) e do controle sem fungos.....                                                 | 37     |
| Gráfico 3 Porcentagem de redução na média de larvas infectantes (L <sub>3</sub> ) de <i>Ancylostoma</i> spp. recuperadas de meio AA 2% pelo método de Baermann dos tratamentos no décimo dia experimental após interação com os isolados fúngicos de <i>Arthrobotrys robusta</i> (I31), <i>Duddingtonia flagrans</i> (CG768) e <i>Monacrosporium thaumasium</i> (NF34A) em relação ao controle sem fungos..... | 38     |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Gráfico 4 Média de larvas infectantes (L <sub>3</sub> ) de <i>Ancylostoma</i> spp. recuperadas pelo método de Baermann no décimo dia das coproculturas dos tratamentos após interação com os isolados fúngicos de <i>Arthrobotrys robusta</i> (I31), <i>Duddingtonia flagrans</i> (CG768) e <i>Monacrosporium thaumasium</i> (NF34A) e do controle sem fungos em relação a média de ovos em 10 g de fezes..... | 40 |
| Gráfico 5 Porcentagem de redução na média de larvas infectantes (L <sub>3</sub> ) de <i>Ancylostoma</i> spp. recuperadas pelo método de Baermann após 10 dias das coprocultura tratadas com os isolados fúngicos de <i>Arthrobotrys robusta</i> (I31), <i>Duddingtonia flagrans</i> (CG768) e <i>Monacrosporium thaumasium</i> (NF34A) em relação ao controle sem fungos....                                   | 41 |
| Gráfico 6 Médias da contagem de conídios dos isolados fúngicos de <i>Arthrobotrys robusta</i> (I31), <i>Duddingtonia flagrans</i> (CG768) e <i>Monacrosporium thaumasium</i> (NF34A) nos meios AA 2%, batata-dextrose-ágar 2% (BDA 2%), corn-meal-agar 2% (CMA 2%) e yeast-phosphate-sulphate-sacarose-agar (YPSSA).....                                                                                       | 46 |

## RESUMO

SPALENZA, Alessandro Maciel, M.S., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2005. **Atividade *in vitro* dos fungos *Arthrobotrys robusta*, *Duddingtonia flagrans* e *Monacrosporium thaumasium* sobre larvas infectantes de *Ancylostoma* spp. de cães e sua esporulação em meios de cultura.** Orientador: Jackson Victor de Araújo. Conselheiros: Joaquim Hernán Patarroyo Salcedo e José Antônio Viana.

A capacidade predatória dos isolados fúngicos de *Arthrobotrys robusta* (I31), *Duddingtonia flagrans* (CG768) e *Monacrosporium thaumasium* (NF34A) sobre larvas infectantes (L<sub>3</sub>) de *Ancylostoma* spp. foi avaliada em condições laboratoriais durante 10 dias em meio ágar-água 2% (AA 2%) e em culturas fecais de fezes de cães. Analisou-se a produção de conídios pelos isolados fúngicos nos meios ágar-água (AA 2%), batata-dextrose-ágar 2% (BDA 2%), corn-meal-agar 2% (CMA 2%) e yeast-phosphate-sulphate-sacarose-agar (YPSSA). Em relação ao controle sem fungos, houve redução significativa ( $P < 0,05$ ) de 89,89%, 97,75% e 88,76% na média de L<sub>3</sub> de *Ancylostoma* spp. recuperadas do meio AA 2% das placas de Petri nos tratamentos com os isolados fúngicos CG768, I31 e NF34A, respectivamente. O isolado fúngico I31 foi o mais eficiente na captura das L<sub>3</sub>. Nas culturas fecais, a redução nas médias de L<sub>3</sub> de *Ancylostoma* spp. nos tratamentos não foi significativa ( $P > 0,05$ ). O isolado fúngico I31 também foi o mais eficaz, reduzindo a média das L<sub>3</sub> recuperadas das coproculturas em 32,04%, enquanto que os isolados fúngicos NF34A e CG768 reduziram a média de L<sub>3</sub> em 15,36% e 7,30%, respectivamente, em relação ao controle sem fungos. Houve maior produção de conídios do isolado fúngico

CG768 no meio BDA 2% enquanto que os isolados fúngicos I31 e NF34A produziram maior número de conídios no meio YPSSA. Os resultados evidenciam que estes fungos predadores podem ser utilizados no controle de L<sub>3</sub> de *Ancylostoma* spp. de cães, no entanto, a dosagem e o tempo de interação fungo-nematóide nas coproculturas devem ser melhor estudadas.

## ABSTRACT

SPALENZA, Alessandro Maciel, M.S., Universidade Federal de Viçosa, April of 2005. **Activity *in vitro* of the nematode trapping fungus *Arthrobotrys robusta*, *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* on infective larvae of *Ancylostoma* spp. of dogs and your sporulation in cultures meals.** Adviser: Jackson Victor de Araújo. Committee Members: Joaquim Hernán Patarroyo Salcedo and José Antônio Viana.

The predatory capacity of isolates of the fungi *Arthrobotrys robusta* (I31), *Duddingtonia flagrans* (CG768) and *Monacrosporium thaumasium* (NF34A) on infective larvae (L<sub>3</sub>) of *Ancylostoma* spp. was evaluated in laboratorial conditions by 10 days in medium water-agar 2% (WA 2%) and in fecal cultures of feces of dogs. The conidia production for the isolates was analyzed in the means of WA 2%, potato-dextrose-agar 2% (PDA 2%), corn-meal-agar 2% (CMA 2%) and yeast-phosphate-sulphate-sucrose-agar (YPSSA). In relation to the control without fungi there was significant reduction ( $P < 0,05$ ) of 89,89%, 97,75% and 88,76% in the average of L<sub>3</sub> of *Ancylostoma* spp. recovered from medium WA 2% of the plates of Petri in the treatments with isolates CG768, I31 and NF34A, respectively. The isolate I31 was the most effective in the capture of the L<sub>3</sub>. In the fecal cultures, the reduction in average of L<sub>3</sub> of *Ancylostoma* spp. in the treatments was not significant ( $P > 0,05$ ). The isolated I31 was also the most effective, reducing the average of recovered L<sub>3</sub> in 32,04% while isolated NF34A and CG768 reduced in 15,36% and 7,30% the average of infective larvae, respectively in relation to the control without fungi. There was larger conidia production of the isolate CG768 in the medium PDA

2% while in isolates I31 and NF34A this production was larger in the medium YPSSA. The results evidence that these trapping fungi can be used in the control of the L<sub>3</sub> of *Ancylostoma* spp. of dogs, however, the doses and the time of interaction fungus-nematode should be studied better.

## **1. INTRODUÇÃO**

Os cães desempenham um importante papel como animais de companhia para o ser humano que, sentimentalmente envolvido com estes animais, estabelece laços profundamente afetivos (Robertson et al., 1990; Wong et al., 1999), mas apesar dos benefícios à sociedade, estes animais podem ser importante fonte de risco à saúde humana por serem considerados reservatórios potenciais de agentes infecciosos como parasitos, bactérias, fungos e vírus (Robertson et al., 2000). O crescente número de animais de estimação, associado à diminuição do espaço físico, principalmente nos grandes centros tem estreitado o contato destes com o ser humano aumentando a exposição aos agentes de zoonoses (Gennari et al., 1999; Dos Santos et al., 2002; Scaini et al., 2002). Os cães são hospedeiros definitivos de várias espécies de parasitos, que podem determinar doenças importantes para o ser humano sendo de extremo interesse em saúde pública (Lagaggio et al., 2002).

As doenças parasitárias têm distribuição cosmopolita, com as maiores prevalências ocorrendo em países em desenvolvimento, especialmente em áreas onde as condições de saneamento e de educação sanitária se mostram deficientes, evidenciando-se alto grau de infecção principalmente em crianças (Lagaggio et al., 2002). Estas figuram nas estatísticas de saúde pública dos países tropicais com elevadas taxas de morbidade como o Brasil que possui clima e situação sócio-econômica favoráveis à ocorrência de doenças parasitárias como as doenças intestinais por helmintos, cuja transmissão ocorre pela ingestão de ovos, larvas infectantes ( $L_3$ ), cistos ou oocistos (Pinheiro et al., 1997; Alves et al., 2002; Lagaggio et al., 2002). Muitas dessas infecções têm elevada prevalência

em animais, particularmente cães que convivem com o ser humano e com ele dividem o mesmo "nicho urbano" (Mantovani et al., 1978), desconhecendo-se muitas vezes a extensão desta ligação (Katcher e Friedman, 1980; Brown, 1990). Os animais jovens são mais susceptíveis às helmintoses que podem afetar o equilíbrio nutricional, por interferirem na absorção de nutrientes, induzirem sangramento intestinal, reduzirem a ingestão alimentar podendo haver complicações como vômito, depressão, gastroenterites, afecções respiratórias, obstrução intestinal, prolapso retal e abscessos, além de perda de peso, emagrecimento e retardo no desenvolvimento, podendo evoluir para caquexia e morte (Freitas, 1982; Cury e Lima, 2002; Lagaggio et al., 2002).

A presença de cães portadores de helmintos em locais públicos pode aumentar significativamente a contaminação do solo com ovos destes parasitas. Alguns helmintos intestinais como *Ancylostoma* spp. (Figura 1) têm requerido grande atenção pelo seu potencial zoonótico (Robertson et al., 2000). Os animais errantes ou mal cuidados são as principais fontes de contaminação, por não receberem tratamento anti-helmíntico adequado (Brenner et al., 2002; Lagaggio et al., 2002), o que compromete não somente a saúde humana, mas também a animal (Brenner et al., 2002). Dessa forma, a facilidade com que os excrementos desses animais podem ser misturados ao solo, permanecendo no ambiente por vários dias, facilita a transmissão destes helmintos (Muradian et al., 2002). Estima-se que mais de um bilhão de pessoas no mundo são infectadas por meio do solo, sugerindo, portanto que a contaminação ambiental representa importante indicador de risco da população humana em contrair essas infecções (Crompton, 1999).



Figura 1 – Larva infectante (L<sub>3</sub>) de *Ancylostoma* spp. em placa de Petri do controle contendo meio ágar-água 2% (Aumento 10 x 20).

Organismos como fungos, bactérias, vírus, protozoários, entre outros, são tidos como nematófagos (Mota et al., 2003), motivo pelo qual podem ser uma alternativa no controle de nematóides parasitas de pequenos animais. Dentre estes microorganismos, destacam-se os fungos predadores de nematóides dos gêneros *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* e *Monacrosporium*, já comprovados como potenciais agentes no controle de nematóides parasitas (Araújo et al., 1993, 1998, 1999; Mota et al., 2000; Alves et al., 2003; Dimander et al., 2003; Melo et al., 2003).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Nematóides

Os principais helmintos de interesse médico veterinário podem ser divididos em dois filos – o filo *Nemathelminthes*, que compreende os nematóides, e o filo *Aschelminthes*, formado pelos cestóides e trematóides (Freitas, 1982; Soulsby, 1982). Dentre eles estão os nematóides, que são um dos mais importantes grupos de organismos, muito abundantes no solo, com enorme diversidade e importante papel ambiental nos diferentes ecossistemas (Ettema, 1998). De acordo com a fonte de alimento estão classificados em: nematóides de vida livre que se alimentam de bactérias, fungos e protozoários, contribuindo na decomposição e reciclagem de matéria orgânica; e nematóides parasitas de plantas ou de animais (Ettema, 1998; Mendoza-De Gives, 1999).

Os nematóides que parasitam animais são invertebrados com corpo vermiforme, cilíndrico, não segmentado, de simetria bilateral e coberto por uma cutícula de cor acinzentada ou avermelhada, dependendo da presença de sangue no tubo digestivo (Freitas, 1982). A porção anterior é curvada dorsalmente e a abertura oral é dirigida antero-dorsalmente (Soulsby, 1982). Apresentam sexos separados e as espécies podem ser aquáticas e terrestres (Freitas, 1982). Dentre os nematóides que parasitam o intestino delgado de cães destacam-se as espécies *Ancylostoma caninum* e *A. braziliense*, que pertencem ao filo *Aschelminthes*,

classe *Nematoda*, superfamília *Strongyloidea*, família *Ancylostomatidae*, gênero *Ancylostoma* (Soulsby, 1982; Neves, 1998).

Estes vermes quando adultos vivem fixados à mucosa do intestino delgado nutrindo-se de sangue o que resulta em úlceras puntiformes hemorrágicas nos locais desta alimentação (Burrows et al., 1995). Normalmente não se alimentam de mucosa, utilizando somente sangue arterial, no entanto com o desenvolvimento de resistência pelos animais, pode haver utilização da mucosa como fonte de alimento (Kalkoflen, 1987). A severidade da doença clínica no animal está relacionada com a idade, intensidade de infecção, estado nutricional, reservas férricas e imunidade adquirida (Soulsby, 1982).

As fêmeas de *A. caninum* apresentam de 14-16 mm de comprimento e ovipõem diariamente em média 16.000 ovos enquanto que as de *A. braziliense*, com tamanho variando de 7-10 mm, ovipõem cerca de 4.000 ovos que são postos na luz do intestino delgado dos animais e transferidos para o meio exterior com as fezes (Freitas, 1982). No meio exterior, em condições adequadas, em 24 a 48 horas no interior do ovo, evolui uma larva de primeiro estágio – L<sub>1</sub>. Em condições favoráveis, em cinco dias, os ovos eclodem e esta larva evolui no meio externo para larva de segundo estágio – L<sub>2</sub> – e desta para larva de terceiro estágio infectante – L<sub>3</sub> (Ribeiro, 2004), sobrevivendo em solo úmido e aquecido por até 15 semanas (Freitas, 1982). A temperatura ótima para o desenvolvimento da L<sub>1</sub> está entre 23-30 °C para *A. caninum* enquanto que para *A. braziliense*, esta é ligeiramente mais elevada. Nesta faixa de temperatura dentro de uma semana a larva alcança o estágio infectivo, mas em temperaturas mais baixas o desenvolvimento é mais prolongado, gastando nove dias a 17 °C e 22 dias a 15 °C (Soulsby, 1982).

A patogenicidade do *A. caninum* está diretamente relacionada a sua atividade hematófaga, podendo causar perda sangüínea diária de 0,01-0,2 mL por verme adulto sendo a anemia a principal consequência da infecção (Soulsby, 1982). Já o verme adulto de *A. braziliense* espolia cerca de 0,001 mL de sangue diariamente, sendo considerado de baixa patogenicidade já que a perda é praticamente insignificante (Soulsby, 1982; Burrows et al., 1995).

### 2.1.1. *Ancylostoma* spp. em cães

As espécies *A. caninum* e *A. braziliense* são enteroparasitas muito comuns em cães, animais responsáveis pela contaminação ambiental na fase de eliminação de ovos nas fezes (Freitas, 1982; Brener et al., 2002; Gennari et al., 2001). A espécie *A. caninum* é mais comum em cães enquanto que a espécie *A. braziliense* é mais comum em gatos (Ribeiro, 2004). Estes animais infectam-se com espécies deste gênero pelas vias oral, mais freqüente, percutânea, transplacentária e lactogênica (Ribeiro, 2004).

Quando as L<sub>3</sub> presentes no solo ou em insetos são ingeridas, penetram as glândulas gástricas e intestinais, sofrem muda para larvas de quarto estágio – L<sub>4</sub> após alguns dias retornam à luz intestinal e terminam seu desenvolvimento atingindo a fase adulta, não apresentando ciclo sistêmico em alguns casos (Prociv e Croese, 1990). Quando a infecção é pela via percutânea, as L<sub>3</sub> penetram a pele e as mucosas produzindo lesões pruriginosas, sendo capazes de alcançar os pulmões via capilares sangüíneos subcutâneos de forma ativa, sofrendo muda para L<sub>4</sub>, as quais por expectoração e deglutição chegam ao intestino delgado, onde se tornam adultas (Mittra et al., 1984; Cury e Lima, 2002). A migração das L<sub>4</sub> nos pulmões pode resultar em pneumonia (Burrows et al., 1995).

As L<sub>3</sub> que penetraram a pele ou a mucosa e não chegaram ao intestino ficam em latência na musculatura de cães, com mais de seis meses de idade que foram sensibilizados por infecções anteriores. Nas cadelas no periparto, estas larvas, devido à ação de hormônios sexuais ou de substâncias protéicas, podem reativar-se, infectando os fetos por via transplacentária e os filhotes por via colostrar e lactogênica após atravessarem a barreira placentária e a glândula mamária, respectivamente (Freitas, 1982; Soulsby, 1982; Cury e Lima, 2002; Ribeiro, 2004).

Nos cães adultos a infecção por *Ancylostoma* spp. é geralmente inaparente (Burrows et al., 1995), ocorrendo com maior freqüência e severidade em animais com menos de um ano de idade, principalmente em raças pequenas (Soulsby, 1982; Gennari et al., 1999). Infecção pré-natal ou colostrar por *A.*

*caninum* pode causar severa anemia com coma e morte nas três primeiras semanas de nascimento (Soulsby, 1982).

### **2.1.2. *Ancylostoma* spp. em humanos**

Os nematóides *A. caninum* e *A. brasiliensis* têm requerido atenção devido ao potencial zoonótico já que são agentes etiológicos da Larva Migrans Cutânea (LMC) ou Dermatite Linear Serpiginosa (Figura 2), que é a migração das larvas destes ancilostomatídeos entre a epiderme e a derme, causando prurido, pápulas e rastros inflamatórios com espessamento da pele (Freitas, 1982; Soulsby, 1982; Robertson *et al.*, 2000; McCarthy e Moore, 2000). Outros ancilomatídeos agentes menos comuns da doença são: *A. duodenale*, *A. ceylanicum*, *Uncinaria stenocephala*, *Bunostomum phlebotomum*, *Necator americanus* e *Strongyloides stercoralis* (Soulsby, 1982; Sivberg *et al.*, 1998). Esta doença é mais freqüente em regiões tropicais e subtropicais, com pico de ocorrência no verão (Robertson e Thomson, 2002).

Praças públicas contaminadas podem ser um problema de saúde pública já que a infecção é uma consequência direta da presença no solo de fezes de cães ou gatos portadores do parasita em fase de eliminação de ovos (Freitas, 1982; Soulsby, 1982; Araújo *et al.*, 2000; Muradian *et al.*, 2002; Brenner e Patel, 2003).

Inúmeros trabalhos evidenciam o alto grau de infecção de pessoas das mais variadas idades, principalmente crianças (Lagaggio *et al.*, 2002; Dos Santos *et al.*, 2002) que se infectam ao ingerir acidentalmente ovos larvados e larvas presentes no solo, principalmente areia de praias ou áreas de recreação, ou em as mãos contaminadas, (McCarthy e Moore, 2000; Muradian *et al.*, 2002; Santarém *et al.*, 1998), já que o solo arenoso favorece o desenvolvimento de ovos e larvas (Freitas, 1982).



Figura 2 – Dermatite Linear Serpiginosa causada larva infectante (L<sub>3</sub>) de *Ancylostoma* spp. em abdômen de adulto do sexo masculino infectado acidentalmente durante os ensaios experimentais.

No local da penetração na infecção percutânea, forma-se uma pápula eritematosa acompanhada de prurido e rastros salientes de trajetos irregulares devido a migração da L<sub>3</sub> no tecido subcutâneo, avançando de dois a cinco centímetros por dia. Ao redor das lesões surge um infiltrado de eosinófilos e células mononucleares podendo haver complicações por infecção bacteriana secundária e reação alérgica local ou geral (Freitas, 1982; Soulsby, 1982; Flores et al., 2004). A doença normalmente é auto limitante no ser humano que é um hospedeiro impróprio, entretanto a migração na epiderme pode persistir por alguns meses (Heukelbach et al., 2004). O número de L<sub>3</sub> e, portanto, o número de trajetos inflamatórios lineares varia de uma única larva a dezenas ou centenas delas, em qualquer região da superfície do corpo. O período de incubação varia de horas até meses para o aparecimento das lesões cutâneas típicas (Flores et al., 2004) que são encontradas principalmente nas partes que mais freqüentemente se põem em contato com o solo e por isso mais sujeitas: pés, pernas, coxas, mãos, antebraço e nádegas (Araújo et al., 2000).

A espécie *A. brasiliensis* é tida como o principal agente da LMC (Schantz, 1991), entretanto a espécie *A. caninum* é considerada mais patogênica (Freitas, 1982) e agente da enterite eosinofilia quando associada à infecção intestinal (Croese et al., 1994; Prociv e Croese, 1996; McCarthy e Moore, 2000), doença caracterizada histologicamente por uma inflamação transmural do trato gastrointestinal com edema e intenso infiltrado eosinofílico (Prociv e Croese, 1990) diferente da reação causada pela *A. duodenale* com infiltrado de menor intensidade (Prociv e Croese, 1990). O desenvolvimento desta doença está associado principalmente à infecção por via oral que resulta em anorexia, náuseas, diarreia e ocasionalmente um quadro de abdômen agudo, com súbita dor abdominal severa semelhante à apendicite aguda (Robertson et al., 2000).

Em raros casos a L<sub>3</sub> de *Ancylostoma* spp. pode invadir os pulmões resultando na síndrome de Loeffler's (Heukelbach et al., 2004), uma doença caracterizada por infiltrado pulmonar e eosinofilia periférica como consequência da reação de hipersensibilidade provocada pela migração destas larvas no interior do órgão ou por um processo imunológico sistêmico (Del Giudice et al., 2002). Esta mesma espécie ainda é um dos prováveis agentes da neuroretinite difusa subaguda unilateral – DUSN, uma doença causada pela presença de uma L<sub>3</sub> no espaço subretiniano e que afeta jovens e adultos, preferencialmente do sexo masculino, caracterizando-se por ser unilateral e poder causar cegueira em fase avançada da doença (Gass e Braunstein, 1983; Yuen et al., 1996; Casella et al., 2001).

## **2.2. Fungos nematófagos**

Diversos antagonistas naturais de nematóides, entre eles, bactérias, vírus, protozoários, besouros, ácaros e fungos, são descritos como controladores biológicos em potencial, entretanto os fungos nematófagos são os inimigos naturais cujas pesquisas apresentaram melhores resultados no controle de nematóides (Ribeiro, 2003).

A maioria dos fungos é imóvel e possui parede celular semelhante à das plantas quanto à composição química e estrutural, mas por não serem fotossintetizantes ficam restritos a uma existência saprófita ou parasitária (Carter, 1988). Os fungos nematófagos ocupam diferentes nichos no solo – rizosfera – onde se alimentam de uma variedade de nematóides de vida livre como fonte principal de alimento (parasitas obrigatórios) ou como complemento, usualmente vivendo como saprófitas sobre matéria orgânica morta (Larsen et al., 1997).

Esses microorganismos pertencem a um grupo heterogêneo de microfungos caracterizados pela sua habilidade de capturar e utilizar nematóides como fonte principal de nutrientes ou ainda apenas como suplementação para a sua existência saprófita (Waller e Faedo, 1996). Os fungos nematófagos estão catalogados com mais de 150 espécies (Barron 1977).

Os fungos nematófagos são inimigos naturais de nematóides capazes de capturá-los, matá-los e destruí-los (Nordbring-Hertz e Jansson, 1984; Larsen et al., 1997). São organismos de distribuição cosmopolita, passíveis de serem encontrados nos ambientes mais distintos, dos trópicos ao ártico (Kerry, 1984; Hashmi e Connan, 1989). A grande maioria destes fungos antigamente era classificada na classe *Fungi imperfecti* (reprodução assexuada ou “imperfeita”), divisão *Deuteromycetes*, classe *Hyphomycetes*, ordem *Hyphomycetales* e família *Moliniaceae*. Até 1964, a maioria dos fungos era classificada como pertencentes aos gêneros *Arthrobotrys*, *Dactylaria*, *Dactyella* e *Trichothecium*. Posteriormente, vários novos gêneros foram descritos, incluindo *Duddingtonia*, *Monacrosporium*, *Genicularia* e *Dactylariopsis* (Gray 1987). Recentemente, estádios de reprodução sexuada ou “perfeita” foram verificados em algumas espécies que estão sendo reconhecidas como pertencentes à classe *Ascomycota* (Griffin, 1994). Quanto à morfologia e características funcionais associadas à produção de estruturas especializadas para a captura de nematóides podem ser divididos nos seguintes grupos: endoparasitas, oportunistas e predadores (Jatala, 1986, Morgan-Jones e Rodrigues-Kabana, 1987; Nordbring-Hertz, 1988).

Os fungos endoparasitas de nematóides desenvolvem um mínimo sistema de hifas vegetativas fora do corpo dos nematóides infectados, esporulando neste e sobrevivendo no ambiente na forma de conídios (Waller e

Faedo, 1996; Araújo et al., 2004). Os nematóides são infectados quando os conídios são ingeridos ou se aderem à sua cutícula (Bird e Herd, 1994; Waller e Faedo, 1996). Muitos dos fungos endoparasitas são parasitas obrigatórios possuindo uma gama restrita de hospedeiros, o que dificulta seu crescimento *in vitro* por requererem meios complexos (Gray, 1987), existindo uma carência quanto às metodologias práticas para o seu cultivo em laboratório o que dificulta de forma significativa sua produção em escala industrial (Ribeiro, 2003).

Já os fungos oportunistas parasitam ovos de nematóides, mas também são saprófitas e, portanto, independem da presença destes no solo para a sua nutrição, podendo ser facilmente isolados e cultivados em laboratório (Araújo et al., 2004). Estes fungos são classificados com base no seu modo de ação em dois grupos: um que utiliza metabólitos próprios que atuam negativamente sobre o embrião, sem alterar o aspecto morfológico da casca do ovo, e outro que atua penetrando ativamente no ovo através de hifas, atingindo o embrião (Nordbring-Hertz, 1988; Lysek e Nigenda, 1989). A hifa penetra através dos pequenos poros existentes na camada vitelínica, causando alteração na permeabilidade da casca, expandindo seu volume e colonizando o conteúdo do ovo ou a larva em desenvolvimento (Morgan-Jones e Rodríguez-Kabana, 1988). Eles podem atuar significativamente no combate de nematóides parasitas de animais que tenham longo período de desenvolvimento dentro de ovos (Ribeiro, 2003), no entanto, sua plena eficácia no controle biológico não é alcançada, pelo fato dos ovos da maioria desses helmintos originarem larvas rapidamente, impossibilitando sua ação (Araújo et al., 2004).

A maioria das espécies de fungos nematófagos está incluída no grupo dos predadores (Bird e Herd, 1994). As espécies deste grupo desenvolvem amplo sistema de hifas vegetativas e estruturas de captura ao longo destas como resultado de estímulos externos enquanto outras, mais abundantes, desenvolvem-se espontaneamente (Padilha e Mendoza-De Gives, 1996; Araújo et al., 2004). A produção de armadilhas pelas espécies não-espontâneas é uma resposta à presença e número de nematóides, substâncias deles derivadas e compostos de origem biológica além de luminosidade, estresse hídrico e nutricional quando em cultivo (Balan e Gerber, 1972; Nansen et al., 1988b; Nordbring-Hertz, 1988;

Gronvold et al., 1993). Sobretudo, a formação é considerada um sintoma de deficiência nutricional do fungo (Scholler e Rubner, 1994). Quanto maior a motilidade dos nematóides, maior o estímulo para o fungo produzir as armadilhas (Nansen et al., 1986, 1988a; Gronvold et al., 1996a), podendo sua formação ser originada também de conídios (Dackman e Nordbring-Hertz, 1992). Entretanto, a formação da armadilha não é uma simples resposta a estímulos exógenos, mas uma resposta mais complexa às necessidades do fungo (Belder, 1994). Após a captura, independente da armadilha utilizada, o fungo atravessa a cutícula do nematóide, cresce no seu interior, digerindo o conteúdo e lançando para o meio externo suas hifas vegetativas e reprodutivas (Barron, 1977; Gray, 1987).

No solo, onde prevalecem condições nutricionais estressantes para o desenvolvimento dos fungos, a habilidade de predação de nematóides propicia vantagens adicionais de sobrevivência (Saxena et al., 1989; Araújo et al., 2004) havendo vantagem das espécies que formam armadilhas espontaneamente sobre as não-espontâneas em solo com microbiota rica (Gray, 1985), já que podem escapar da competição por matéria orgânica em decomposição disponível (Cooke, 1964). Este grupo de fungos nematófagos é o mais pesquisado e usado no controle biológico de nematóides parasitos de animais domésticos, pois são capazes de reduzir efetivamente a população de nematóides em condições laboratoriais e a campo (Waller e Larsen, 1993; Larsen, 1999). Além disto apresentam maior potencial de comercialização, visto serem facilmente isolados do solo e de bolos fecais de diversas espécies de animais e cultivados em laboratório (Santos et al., 1991; Naves e Campos, 1991; Gomes, 1998; Araújo et al., 1999; Larsen, 1999).

Geralmente os nematóides podem ser atraídos pelos fungos e esta atração é aumentada pela presença de armadilhas (Nordbring-Hertz, 1988) sendo conhecidos seis tipos de armadilhas: estruturas adesivas - hifas adesivas não modificadas ou não diferenciadas; ramificações hifais anastomosadas, formando redes adesivas tridimensionais; ramificações adesivas, que algumas vezes formam redes simples e na maioria das vezes redes bidimensionais; nódulos adesivos; estruturas não adesivas - anéis constritores e anéis não constritores (Gray 1988; Waller e Faedo, 1993; Saxena e Mittal, 1995; Mendoza-De Gives et

al., 1998). Os anéis constritores, de ação ativa, geralmente apresentam três células e quando o nematóide penetra no anel, estas se expandem promovendo seu estrangulamento. Já os anéis não constritores têm ação passiva e formam grandes labirintos, onde os nematóides penetram, ficando presos e sendo, posteriormente, colonizados (Barron, 1977; Gronvold et al., 1996a).

A diferenciação da hifa em armadilha pode ocorrer em 24 horas, e numerosas estruturas de captura podem ser produzidas (Pramer, 1964). Normalmente é produzido um número excessivo de armadilhas comparado ao de nematóides presentes (Gronvold et al., 1996b), sendo que as armadilhas mais comuns são as redes tridimensionais, formadas por espécies do gênero *Arthrobotrys* sp., *Duddingtonia* sp. e *Monacrosporium* sp. (Gray, 1987) e são originadas de um ramo lateral que dá voltas anastomosadas com a hifa de origem formando a rede pegajosa (Bird e Herd, 1994). Os fungos predadores podem ser agrupados também de acordo com a velocidade de crescimento micelial: aqueles que crescem mais rápido são os formadores de redes, seguidos dos produtores de nódulos adesivos, e os mais lentos, são os formadores de anéis constritores (Cooke, 1964).

Fungos nematófagos vêm sendo pesquisados como uma alternativa para controlar diversas espécies de nematóides (Castro et al., 2003) e dentre as espécies de fungo predador de nematóides que vem sendo utilizadas como agentes controladores biológicos de helmintos gastrintestinais de animais domésticos destacam-se as espécies *Arthrobotrys robusta*, *Duddingtonia flagrans* e *Monacrosporium thaumasium* (Araújo et al., 1993, 1998, 1999; Alves et al., 2003; Dimander et al., 2003).

### **2.2.1. *Arthrobotrys robusta***

Os fungos do gênero *Arthrobotrys* produzem um extenso sistema de hifas ao longo das quais são produzidas organelas capazes de capturar nematóides (Barron, 1977; Gray, 1987). A espécie *A. robusta* possui conidióforo ereto, algumas vezes ramificado, com cerca de 300 µm de comprimento,

carregando em sua extremidade normalmente seis conídios ovóides, hialinos, septados próximo à região mediana e medindo 18-27µm de comprimento por 8-12 µm de largura (Figura 7), sendo capaz de produzir clamidósporos e redes adesivas para predação de nematóides (Van Oorschot, 1985) em condições de crescimento desfavoráveis (Scholler e Rubner, 1994). Em cultivo esta espécie não forma armadilhas e vive como saprófita em substratos contendo suficientes concentrações de carbono e nitrogênio requerendo pouca quantidade de nutrientes, sugerindo que a captura de nematóides é uma fonte alternativa de nutrientes (Morgan-Jones et al., 1997).

Este fungo é eficiente na predação e redução de L<sub>3</sub> de ciatostomíneos de eqüinos *in vitro* (Castro, 2000) e *in vivo* (Castro et al., 2003) e no controle de L<sub>3</sub> dos nematóides *Haemonchus contortus* de caprinos e ovinos (Mendoza-De Gives et al., 1992; Mendoza-De Gives e Vazquez Prats, 1994; Peña et al., 2002), *H. placei* (Araújo et al., 1993) em fezes de bovinos sendo capaz de sobreviver à passagem pelo trato gastrintestinal destes animais (Araújo, 1996) e manter sua atividade predatória nas fezes. Além do efeito sobre L<sub>3</sub> de nematóides foi verificado efeito ovicida em ovos embrionados de *Toxocara canis* (Araújo et al., 1995).



Figura 3 – Conídios de *Arthrobotrys robusta* em placa de Petri contendo meio ágar-água 2% (Aumento 10 x 20).

### 2.2.2. *Duddingtonia flagrans*

As espécies do gênero *Duddingtonia*, segundo Van Oorschot (1985) são caracterizadas por produzirem vários conídios na extremidade dos conidióforos (Figura 5). Os conídios apresentam formato variando entre elíptico e ovóide com um septo mediano (Araújo et al., 2004). A espécie *D. flagrans* é a mais estudada no controle das helmintoses gastrintestinais de animais domésticos, sendo considerada por Larsen (1999) como a mais promissora, predando nematóides por meio de hifas adesivas simples e produzem conídios com 25-50  $\mu\text{m}$  de comprimento por 10-15  $\mu\text{m}$  de largura (Cooke e Godfrey, 1964; Van Oorschot, 1985). Este fungo produz dois tipos de conídios: conídios com paredes delgadas em conidióforos eretos, em número limitado e numerosos conídios resistentes com paredes grossas – clamidósporos, intercalados em hifas maduras (Gronvold et al., 1996b) em condições de crescimento desfavoráveis (Scholler e Rubner,

1994). Os conídios da espécie *D. flagrans* são persistentes no ambiente permitindo seu uso como agente de controle biológico (Faedo et al., 2000).

Este fungo cresce lentamente em temperaturas abaixo de 25 °C sendo o ótimo crescimento obtido a 30 °C (Larsen, 1991) e produz grande número de clamidósporos (Juarez e Mendoza-De Gives, 1998; Larsen, 1999) que são conídios altamente resistentes em condições adversas (Ulloa e Hanlin, 1992, Scholler e Rubner, 1994) formados geralmente em condições de crescimento desfavoráveis (Scholler e Rubner, 1994). Esses clamidósporos possuem paredes grossas o que permite resistir à passagem pelo trato gastrintestinal (Faedo et al., 1997), de ovelhas (Peloille, 1991; Larsen et al., 1994; Larsen et al., 1998) e de bovinos (Larsen et al., 1992; Wolstrup et al., 1994). Após a passagem pelo trato gastrintestinal, os clamidósporos de *D. flagrans* são capazes de germinar, colonizar o bolo fecal e destruir as larvas do nematóide que estão emergindo, quebrando assim o ciclo de vida do parasita (Fernandez et al., 1997; Faedo et al., 1998).

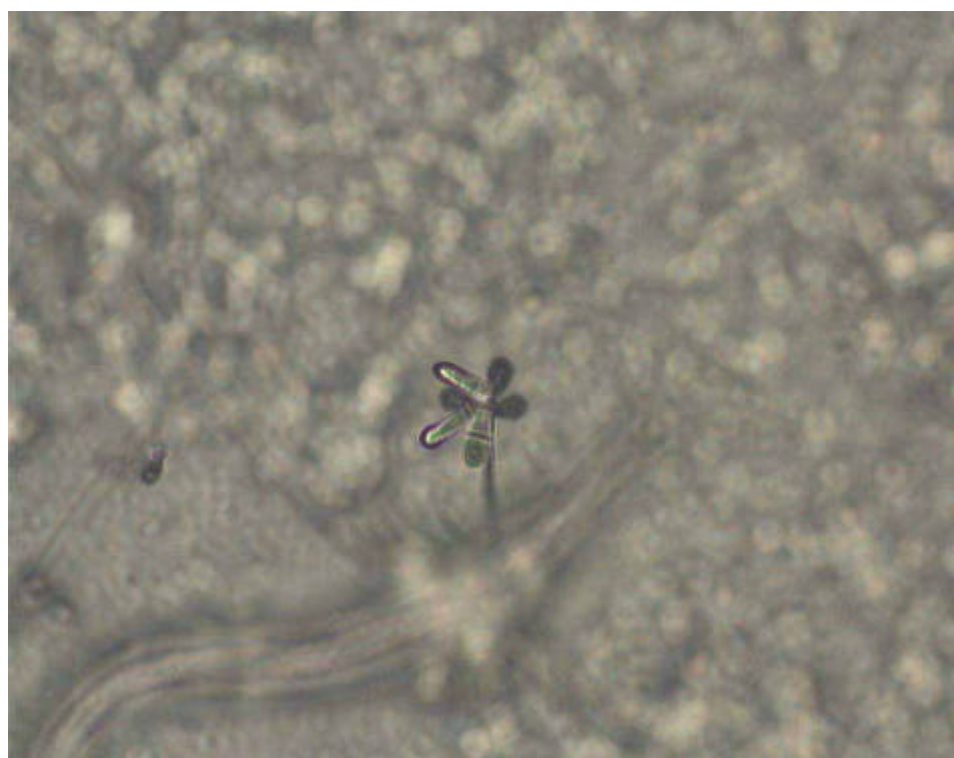


Figura 4 – Conídios de *Duddingtonia flagrans* em placa de Petri contendo meio ágar-água 2% (Aumento 10 x 20).

A espécie *D. flagrans* afeta predominantemente nematóides cujos ovos possuem curto estágio de desenvolvimento, mas podem sobreviver ocasionalmente por longos períodos afetando também nematóides cujos ovos chocam após 12-16 semanas, pois enquanto a larva reside no ovo, este fungo é incapaz de capturá-las e digeri-las (Faedo et al., 2000). Ele é eficiente na predação e controle de L<sub>3</sub> dos nematóides parasitas *Heligmosomoides polygyrus* (Morgan-Jones et al., 1997), *Dictyocaulus viviparus* (Henriksen et al., 1997), *Strongylus vulgaris*, *S. edentatus* (Larsen et al., 1996), *Oesophagostomum dentatum*, *Hyostrogylus rubidius* (Nansen et al., 1996) e *Teladorsagia circumcincta* (Peloille, 1991), ciatostomíneos de eqüinos (Santos et al. 1995; Fernandez et al., 1997), *Haemonchus contortus* (Juarez e Mendoza-De Gives, 1998; Mendoza-De Gives et al., 1998; Peña et al., 2002; Chandrawathani et al., 2003), *Trichostrongylus* sp., *Nematodirus* sp. (Larsen et al., 1995; Githigia et al., 1997), *Ostertagia circumcincta* e *Ostertagia ostertagi* (Gronvold et al., 1993).

No solo, a espécie *D. flagrans* pode ser encontrada a até 30 cm da superfície abaixo do ponto de sua deposição e este movimento vertical pode ser devido à percolação dos clamidósporos na terra pela água da chuva, possivelmente via artrópodes e covas de minhocas, sobrevivendo por 8-24 semanas (Knox et al., 2002), tempo que pode ser estendido para mais de 20 meses em ambientes secos (Gronvold et al., 1996a). Entretanto experiências indicaram que esta espécie de fungo apresenta um mínimo de crescimento no solo ao redor das fezes não se detectando um impacto de predação na população de nematóides de vida livre (Faedo et al., 2002). Conseqüentemente, é improvável que a aplicação destes fungo como agente de controle biológico terá efeito negativo em populações de nematóides benéficos ao solo (Faedo et al., 2002).

### 2.2.3. *Monacrosporium thaumasium*

As espécies do gênero *Monacrosporium*, segundo Subramanian (1963), são caracterizadas por produzirem apenas um único conídio na extremidade de cada conidióforo (Figura 9). Elas capturam nematóides por meio de nódulos e redes tridimensionais adesivas ou anéis constritores (Barron, 1977; Saxena e Mittal, 1995). As hifas vegetativas são septadas e ramificadas. A espécie *M. thaumasium* preda nematóides por meio de redes adesivas e produz conídios medindo entre 27-49  $\mu\text{m}$  de comprimento por 15-23  $\mu\text{m}$  de largura. O conidióforo é ramificado próximo à extremidade produzindo em cada extremidade apenas um conídio ereto, hialino, fusiforme, com dois ou mais septos transversais, sendo que a célula intermediária é maior que as das extremidades (Liu e Zhang, 1994; Zhang et al., 1996; Araújo et al., 2004). Normalmente são formados clamidósporos em culturas de placa com meio sólido pobre (Scholler e Rubner, 1994; Saxena e Mittal, 1995).



Figura 5 – Conídio de *Monacrosporium thaumasium* em placa de Petri contendo meio ágar-água 2% (Aumento 10 x 20).

Espécies do gênero *Monacrosporium* sp. têm eficácia comprovada sobre fitonematóides, nematóides de vida livre e nematóides parasitas de bovinos, caprinos e eqüinos (Araújo et al., 1992; Gomes et al., 1999; Castro, 2000; Oliveira et al. 2002; Melo et al., 2003). A espécie *Monacrosporium thaumasium* demonstra capacidade de redução das L<sub>3</sub> de ciatostomíneos de eqüinos (Castro, 2000; Oliveira et al., 2002; Castro et al., 2003) de *H. placei* de bezerros (Araújo et al., 1999; Alves et al., 2003) e de *H. contortus* de caprinos (Melo et al., 2003; Mota et al., 2000) sendo capaz de passar pelo trato gastrintestinal destes animais sem perder sua habilidade predatória.

Este fungo predador apresenta desempenho *in vitro* homogêneo nas temperaturas de 25, 28 e 30 °C que são muito comuns nos trópicos supondo-se que esta espécie se adapte facilmente às condições brasileiras (Castro et al., 2003).

### **2.3. Biocontrole de nematóides parasitas de animais**

O ciclo biológico dos nematóides gastrintestinais pode ser dividido em duas fases, uma na qual os nematóides estão parasitando animais e outra epidemiologicamente mais importante, na qual se encontram diversos estádios do parasita no ambiente (Gomes, 1998). A utilização de antagonistas de nematóides como agentes de biocontrole oferece um método sustentável de controle de nematóides com conseqüente redução no uso e dependência de produtos químicos o que reduz os efeitos nocivos ao ambiente (Campos, 2002).

O biocontrole com fungos nematófagos não substitui o controle químico que atua sobre nematóides adultos no trato gastrintestinal do animal, ele o integra atuando sobre as formas infectantes destes parasitas nas fezes liberadas pelo animal portador no ambiente (Waller e Larsen, 1993). Seus agentes raramente eliminam o organismo-alvo, mas reduzem sua população a níveis aceitáveis mantendo um balanço entre patógeno e antagonista, permitindo a sobrevivência de um pequeno número que possibilite aos animais desenvolver imunidade adquirida devido ao menor número de larvas ingeridas o que conseqüentemente

reduz a incidência de casos clínicos (Waller e Larsen, 1993; Gomes, 1998; Thamsborg et al, 1999). Este tipo de controle visa reduzir o número de ovos e estádios de vida livre no ambiente – larvas L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> e L<sub>3</sub> – interrompendo assim o processo no qual a infecção no ambiente torna-se uma infecção no hospedeiro final (Gomes, 1998; Hachmi e Connan, 1989). Mas para ser efetivo o fungo deve estar presente e ativo nas fezes, solo e ambiente no mesmo tempo que as formas pré-parasitárias (Faedo et al., 2000).

Estes microorganismos devem possuir especificidade de ação, alta capacidade reprodutiva e suportar as condições ambientais no local em que o controle é realizado (Mota et al., 2003), já que em certos ambientes a competição entre eles é tão intensa e severa que impossibilitaria a introdução de uma nova espécie fúngica. A quantidade e a atividade do fungo nematófago presente no solo são incertas e, por isso, o envolvimento desses fungos na cadeia alimentar é questionável, assim como sua fonte primária de alimentação, nematóides ou matéria orgânica rica em carbono (Jaffee et al., 1996). Por isso, o sucesso do estabelecimento de fungos nematófagos no solo depende de uma base alimentar que lhes garanta vantagens competitivas sobre a microbiota residente (Kerry et al., 1984) já que insucessos podem ser atribuídos a pouca competitividade do fungo predador com outros fungos saprófitas e ao fato de a formação de armadilhas ser facultativa (Gomes, 1998). Os fungos dispendo de uma fonte de energia prontamente disponível, provavelmente não teriam limitações para colonizar o solo e formar as estruturas de captura de nematóides (Dias e Ferraz, 1993). No entanto, fezes frescas são um ambiente muito menos competitivo para o fungo do que o solo fértil (Juniper, 1957), podendo exercer efeitos sobre os nematóides indiretamente, destruindo esse habitat, ou diretamente, utilizando os estádios de vida livre como fonte de nutrientes (Gomes, 1998).

Assim o emprego destes microorganismos no controle de nematóides parasitas envolve a seleção de espécies de fungos nematófagos capazes de atravessar o trato gastrointestinal mantendo suas características de crescimento e predação de ovos e larvas nas fezes, não causem efeitos indesejáveis quando associados a drogas anti-helmínticas, que seja seguro ao animal e ser humano, não prejudique o meio ambiente e que permita sua produção em escala

economicamente viável (Alves, 1986; Honer e Branchin, 1987; Waller, 1993; Santos e Charles, 1995; Gronvold et al., 1996; Campos, 2002).

O biocontrole apresenta as vantagens de especificidade num ecossistema, sem induzir profundas transformações; fácil multiplicação e dispersão no ambiente; efeito prolongado afetando até gerações subseqüentes; associação com drogas sem deixar resíduos ou toxicidade para animais e ambiente; menor custo; e diminuição do aparecimento de resistência (Alves, 1986), entretanto a preocupação com os possíveis efeitos adversos causados ao ecossistema sobre organismos benéficos ao solo pelo uso de drogas anti-helmínticas (Herd, 1993; McKellar, 1997; Thompson, 1999) também existe quando são usados fungos nematófagos (Knox et al., 2002), já que predam nematóides não-especificamente (Bird e Herd, 1994). Contudo alguns estudos não indicaram tais efeitos sobre nematóides de vida livre, microartrópodes e nem mesmo sobre outros fungos predadores de nematóides (Yeates et al., 1997; Gronvold et al., 2000; Knox et al., 2002), mas apesar de ter havido maior predação sobre larvas de *Panagrellus* sp. em um estudo *in vitro* sugerindo que fungos nematófagos têm preferência por nematóides de vida livre (Gomes et al., 2001a), conclusões favorecem a utilização destes fungos como controladores biológicos de nematóides de animais domésticos (Larsen, 1999). Por isso, mais informações sobre os efeitos de fatores ecológicos no crescimento e na atividade desses fungos podem vantajosamente melhorar sua eficiência no controle de nematóides.

## **2.4. Mecanismo de ação de fungos nematófagos**

Os nematóides não somente servem como presa, mas também ativam o desenvolvimento do fungo de tal modo que estruturas infectivas são formadas (Nordbring-Hertz e Jansson, 1984). A infecção ocorre em várias fases, dependentes de processos fisiológicos e bioquímicos que começam com o ataque da cutícula do nematóide, seguido por imobilização, penetração, crescimento, possível intoxicação, digestão do conteúdo e desintegração da larva – Figura 3 (Gray, 1988; Mendoza-De Gives, 1999).

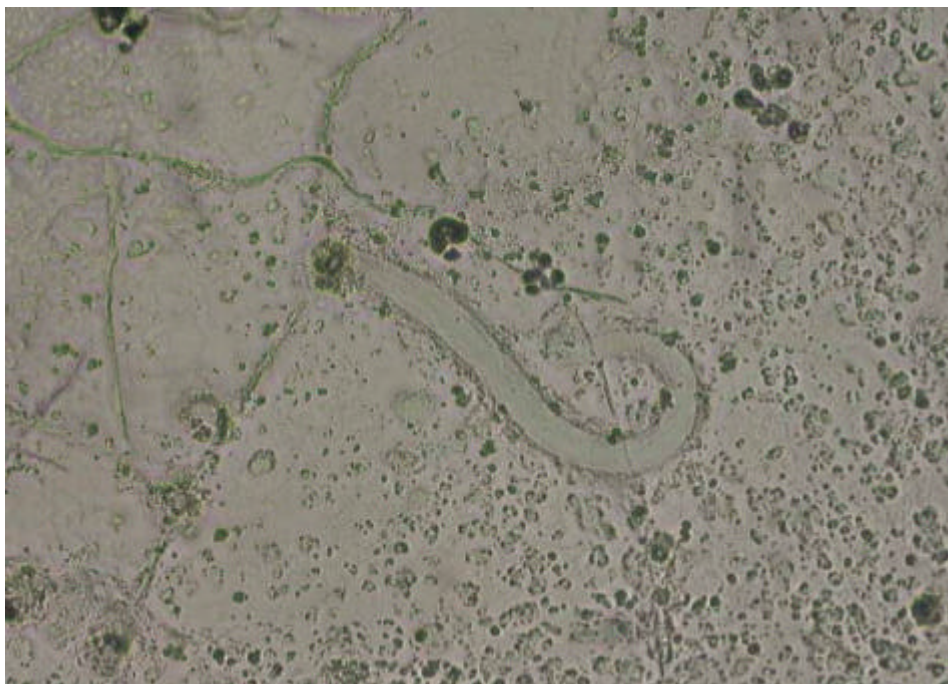


Figura 6 – Larva infectante (L<sub>3</sub>) de *Ancylostoma* spp. em desintegração após predação por *Arthrobotrys robusta* em placa de Petri contendo meio ágar-água 2% (Aumento 10 x 10).

O processo inicial de infecção de fungos predadores de nematóides é baseado numa interação complexa (Mendoza-De Gives, 1999), envolvendo polímeros de superfície, atividade enzimática e o reconhecimento de lectinas presentes na superfície das armadilhas do fungo e carboidratos presentes na cutícula dos nematóides (Tunlid et al., 1991; Dijksterhuis et al., 1994; Gomes, 1998; Balogh et al., 2003). Organelas eletrodensas localizadas nas imediações das armadilhas são responsáveis pela produção de substâncias adesivas e pelo transporte de enzimas líticas, associadas possivelmente ao processo de penetração e digestão do nematóide (Nordbring-Hertz e Stalhammar, 1978; Araújo e Patarroyo, 1995). Ações mecânicas estão aparentemente presentes nas etapas finais de penetração da cutícula (Veenhuis et al., 1985). A parede celular das armadilhas é envolvida por uma placa extracelular de polímeros fibrilares cujas fibrilas tornam-se orientadas em direção ao nematóide, durante as primeiras horas de captura, havendo intenso tráfico de componentes celulares no ponto de contato com o nematóide (Belder et al., 1996).

A penetração da cutícula, constituída por multicamadas, é essencial na infecção (Mendoza-De Gives, 1999). Ela é uma estrutura complexa composta de glicoproteínas mergulhadas em uma estrutura de lipídios (Kramer, 1997), tendo as funções de proteção, locomoção, manutenção da morfologia, nutrição e excreção do nematóide e estando também relacionada com o processo de reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro animal além de ser um local de fixação para fungos e bactérias (Spiegel e McClure, 1995; Kramer, 1997).

Dois fatores têm sido identificados como cruciais, os processos de reconhecimento envolvendo o ataque e as enzimas envolvidas na penetração e infecção (Mendoza-De Gives, 1999). As enzimas são utilizadas na degradação da cutícula do nematóide, rica em colágeno, durante a penetração (Segers et al., 1994) e dentre as que estão envolvidas na penetração e infecção encontram-se: collagenase (Thomas et al., 1988), quitinase (Sontirat, 1996), proteases (Tunlid e Janson, 1991), lípases, fosfatases, esterases e glicosidasases (Mendoza-De Gives, 1999).

Quando o fungo infecta L<sub>1</sub> e L<sub>2</sub>, elas morrem rapidamente, no entanto as L<sub>3</sub> permanecem móveis nas armadilhas por mais de 20 horas, provavelmente devido à dificuldade de penetração da cutícula da larva, que é dupla, em função da manutenção da cutícula do estágio larval anterior (Padilha, 1996; Gronvold et al., 1996a). Depois que o nematóide é capturado e imobilizado, um bulbo infectivo é produzido originado da parede interna da armadilha e a cutícula do nematóide é dissolvida e penetrada seguindo-se a produção de hifas tróficas que se desenvolvem de bulbos infectivos maduros (Barron, 1977; Gray, 1988; Dijksterhuis et al., 1994). Hifas assimilativas são produzidas ao longo do corpo do nematóide e finalmente o conteúdo é absorvido pelo fungo (Barron, 1977) causando a morte do nematóide (Veenhuis et al., 1985).

As espécies de fungo predador estudadas nesta dissertação têm sido relatadas como controladoras de nematóides de ruminantes, pequenos ruminantes e eqüinos (Gonzalez Cruz et al., 1998; Mendoza-De Gives et al., 1998; Larsen et al., 1998; Castro, 2000; Mota et al., 2000; Gomes et al., 2001a; Peña et al., 2002; Chandrawathani et al., 2003; Melo et al., 2003). Não há informações sobre a habilidade das espécies de fungo predador de nematóides *A. robusta*, *D. flagrans*

e *M. thaumasium* em predação de espécies do gênero *Ancylostoma* sp., por isto o presente trabalho verificou a capacidade destes fungos no controle *in vitro* de L<sub>3</sub> deste nematóide.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Utilizar os isolados fúngicos de *Arthrobotrys robusta* (CG768), *Duddingtonia flagrans* (I31) e *Monacrosporium thaumasium* (NF34A) no controle *in vitro* de larvas infectantes (L<sub>3</sub>) de *Ancylostoma* spp. de cães.

#### 3.2. Objetivos específicos

1. Verificar a eficiência de predação dos isolados fúngicos de *A. robusta* (CG768), *D. flagrans* (I31) e *M. thaumasium* (NF34A) sobre larvas infectantes (L<sub>3</sub>) de *Ancylostoma* spp. em meio ágar-água 2% e nas coproculturas identificando o isolado fúngico que é mais eficiente na redução *in vitro* de este nematóide no meio AA 2% e nas coproculturas;
2. Avaliar a produção de conídios pelos isolados fúngicos de *Arthrobotrys robusta* (CG768), *Duddingtonia flagrans* (I31) e *Monacrosporium thaumasium* (NF34A) nos meios de cultura AA 2%, BDA 2%, CMA 2% e YPSSA identificando em qual deles a produção é maior.

### 4. HIPÓTESE

As espécies fúngicas *A. robusta*, *D. flagrans*, e *M. thaumasium* são eficientes no controle *in vitro* de L<sub>3</sub> de *Ancylostoma* spp. de cães.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. Organismos

#### 5.1.1. Isolados Fúngicos

Os isolados fúngicos de *A. robusta* (isolado I31), *D. flagrans* (isolado CG768) e *M. thaumassium* (isolado NF34A) foram mantidos em tubos de ensaio contendo corn-meal-agar 2% (CMA 2%) no escuro à temperatura de 4 °C. Esses isolados brasileiros de fungos predadores foram previamente obtidos pelo método de espalhamento do solo de Duddington (1955), modificado por Santos et al. (1991) e estavam armazenados no laboratório de parasitologia do departamento de veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. Discos de cultura de 4 mm de diâmetro dos isolados fúngicos foram transferidos destes tubos de ensaio para placas de Petri de 8,5 cm de diâmetro, contendo 20 mL de meio ágar-água 2% (AA 2%) e mantidos no escuro em estufa a 25 °C por 7 dias. A manipulação dos fungos foi realizada em capela de fluxo laminar.

Após o crescimento micelial nestas placas, discos de cultura foram transferidos, em capela de fluxo laminar, para novas placas de Petri contendo 20 mL de meio batata dextrose ágar 2% (BDA 2%) e mantidas no escuro em estufa a 25 °C por 10 dias, para a formação de conídios. Utilizou-se um microscópio ótico invertido, em aumento 10 x 10, para pesquisa diária de estruturas reprodutivas – conídios. Quando se observou o completo desenvolvimento fúngico, 15 mL de água destilada esterilizada foram adicionados a cada placa de Petri, removendo os conídios e fragmentos de micélio da superfície do meio, com auxílio de um pincel, conforme Araújo et al. (1993). A suspensão obtida contendo as estruturas fúngicas foi homogeneizada por agitação em um tubo de ensaio com tampa rosqueável. Posteriormente, algumas alíquotas foram coletadas por meio de uma pipeta de Pasteur para se determinar a concentração de conídios

por meio da média de três contagens em hemacitômetro<sup>1</sup> que forneceu o número de conídios em 1 mm<sup>3</sup>, correspondente a 1 µL.

### 5.1.2. Larvas infectantes (L<sub>3</sub>) de *Ancylostoma* spp.

As L<sub>3</sub> de *Ancylostoma* spp. foram obtidas de fezes frescas de cães sem raça definida – SRD – naturalmente infectados por meio de coproculturas mantidas por 10 dias em estufa a 26 °C, já que a temperatura favorável ao desenvolvimento pré-parasitário para as espécies deste nematóide está entre 23-30 °C (Freitas, 1982). Posteriormente, estas L<sub>3</sub> foram coletadas em tubos de hemólise com o auxílio do método de Baermann (Hendrix, 1998; Ueno e Gonçalves, 1998) e lavadas com água destilada esterilizada 10 vezes em centrífuga a 1000 rpm, durante 5 minutos, desprezando ao final de cada centrifugação o sobrenadante por meio de uma pipeta de Pasteur acoplada a uma bomba de vácuo. As L<sub>3</sub> foram contadas em seis alíquotas de 10 µL, sob microscópio óptico com objetiva de 10x. A média do número de L<sub>3</sub> foi calculada extrapolando-se o número de larvas presentes para o volume final. Foram utilizados cães SRD do canil da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, para a coleta das fezes, sendo selecionados, por meio do método de Willis (1927), somente os animais infectados com *Ancylostoma* spp.

Na obtenção tanto dos conídios, quanto das L<sub>3</sub>, buscou-se um sincronismo a fim de que, no dia zero, ambos os organismos estivessem disponíveis para o início dos ensaios experimentais.

## 5.2. Ensaios experimentais

O trabalho constituiu-se de três ensaios experimentais *in vitro*, montados no desenho experimental inteiramente casualizados. Em dois ensaios testou-se o

---

<sup>1</sup> Câmara de Fuchs-Rosenthal (Herka<sup>®</sup>, Alemanha): 0,2mm e 0,0625mm<sup>2</sup>.

efeito predador dos isolados fúngicos sobre as L<sub>3</sub> de *Ancylostoma* spp., enquanto que num terceiro ensaio comparou-se a produção de conídios dos isolados fúngicos em quatro meios de cultura utilizados rotineiramente em laboratório.

#### **5.2.1. Predação de larvas infectantes (L<sub>3</sub>) de *Ancylostoma* spp. em meio de cultura AA 2%**

Três tratamentos (CG768, I31 e NF34A) e um controle sem fungos foram formados em placas de Petri de 5 cm de diâmetro contendo 10 mL de AA 2% mantidas em temperatura ambiente. Utilizaram-se 10 repetições para cada tratamento e para o controle sem fungos. Cada placa continha 1.000 L<sub>3</sub> de *Ancylostoma* spp. e 1.000 conídios de cada espécie fúngica por tratamento enquanto que o controle continha apenas 1.000 L<sub>3</sub>.

Durante 10 dias, a cada 24 horas, 10 campos aleatórios de 4 mm de diâmetro em cada placa de Petri dos quatro grupos foram observados em microscópio óptico, em objetiva de 10x, contando-se o número de L<sub>3</sub> não predadas em cada um. Concomitantemente, a formação de conídios foi analisada segundo as chaves de classificação propostas por Liu e Zhang (1994); Van Oorschot (1985), Haard (1968) e Cooke e Godfrey (1964) a fim de confirmar a colonização do isolado fúngico desejado no tratamento. No décimo dia, as L<sub>3</sub> foram recuperadas em tubos de hemólise por meio do aparelho de Baermann com água inicialmente a 42 °C por 24 horas (Ueno e Gonçalves, 1998).

Uma pipeta Pasteur acoplada a uma bomba de vácuo permitiu a drenagem do volume contido nos tubos de hemólise até um valor padrão de 3 mL. Deste volume, coletaram-se seis alíquotas de 10 µL que foram distribuídas em lâminas de vidro para contagem das L<sub>3</sub> de *Ancylostoma* spp. recuperadas, por meio de um microscópio ótico invertido, em aumento 10 x 10. Calculou-se a média do número de larvas presentes nestas seis alíquotas e extrapolou-se para um volume final que foi ajustado até se obter a quantidade de L<sub>3</sub> necessária para formação dos tratamentos e do controle deste ensaio.

### 5.2.2. Predação de larvas infectantes (L<sub>3</sub>) de *Ancylostoma* spp. em coproculturas de fezes de cães

Realizou-se um segundo teste *in vitro* em que os isolados fúngicos de *A. robusta* (I31), *D. flagrans* (CG768) e *M. thaumasium* (NF34A) foram testados em coproculturas de fezes de cães contendo ovos do gênero *Ancylostoma* spp. O volume total das fezes foi previamente homogenizado para que cada grama de fezes contivesse número semelhante de ovos. Antes de iniciar o ensaio foi feita a contagem de ovos por grama de fezes – OPG – pelo método de Gordon e Whithlock (1939), que é uma técnica de flutuação que utiliza 2 g de fezes trituradas e homogeneizadas num becker contendo 29 mL de solução hipersaturada de NaCl. Posteriormente, este conteúdo foi coado em outro becker através de um tamis lavando-se o conteúdo retido com 14,5 mL de solução hipersaturada de NaCl e 14,5 mL de água potável. Esta solução foi homogeneizada retirando-se posteriormente uma amostra com o auxílio de uma pipeta para preencher uma câmara de McMaster na qual foi feita a leitura em microscópio ótico invertido em aumento 10 x 10.

Foram feitas 10 repetições para cada tratamento e para o controle sem fungos. Cada repetição do controle continha 10 g de fezes + 10 g de vermiculita<sup>2</sup>, um material inerte e atóxico que permitiu o espaçamento e conseqüente aeração das fezes. Nos tratamentos, além deste substrato, foram adicionados 1000 conídios/g de fezes de cada uma das três espécies de fungo predador. Os conídios foram obtidos de forma idêntica à do ensaio experimental A e o ensaio foi mantido em estufa a 26 °C por 10 dias.

A recuperação das L3 livres em tubos de hemólise foi realizada por meio do aparelho de Baermann com água inicialmente a 42 °C por 24 horas (Ueno e Gonçalves, 1998) a fim de serem quantificadas posteriormente de forma idêntica ao ensaio experimental A.

---

<sup>2</sup> Isso-flok: vermiculita expandida pura. Isolantes Termo Acústicos Ltda.

### 5.3. Esporulação dos isolados fúngicos de *Arthrobotrys robusta* (I31), *Duddingtonia flagrans* (CG768) e *Monacrosporium thaumasium* (NF34A) em meios de cultura

Neste ensaio testou-se o crescimento dos três isolados fúngicos em quatro diferentes meios utilizados rotineiramente em laboratório: CMA<sup>3</sup> “corn-meal-agar” ou meio de milho ágar; BDA<sup>4</sup> “batata-dextrose-ágar” e AA<sup>5</sup> “agar-água”, YPSSA<sup>6</sup> “yeast-phosphate-sulphate-sacarose-agar”, segundo Stirling e Mankau (1978). Estes meios foram preparados, acondicionados em Erlenmeyers, esterilizados em autoclave por 15 minutos à temperatura de 120 °C e armazenados em geladeira a 4 °C até sua utilização, quando foram derretidos em forno de microondas e depositados em placas de Petri para depois de solidificar à temperatura ambiente repicar o fungo.

Em uma capela de fluxo laminar transferiram-se discos de cultura de 4 mm de diâmetro de colônias fúngicas crescidas em ágar-água em estufa a 25 °C, em escuro, por sete dias, para o centro destas placas de Petri com os meios à temperatura ambiente, mantendo-as no escuro em estufa a 25 °C durante 10 dias. Ao final deste tempo, quando cada fungo recobria toda a superfície do meio, em cada placa foram adicionados 15 mL de água destilada raspando-se levemente com um pincel a superfície da cultura para se retirar os conídios. Recolheu-se a suspensão de conídios em um béquer de 50 mL estimando-se sua concentração após a média de três contagens em hemacitômetro. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, já que as condições experimentais foram homogêneas, com seis repetições.

---

<sup>3</sup> 17 g = 2 g de extrato de farinha de milho e 15 g de ágar em 1000 mL de água destilada q.s.p.; pH 6,0 ; Oxoid Brasil Ltda.

<sup>4</sup> 40 g = 4 g infusão de batata desidratada, 20 g de dextrose e 15 g de ágar em 1000 mL de água destilada q.s.p.; pH 5,6; Acumedia Manufacturers.

<sup>5</sup> 20 g de ágar em 1000 mL de água destilada q.s.p., pH 6,5; Sigma Chemical C.O.

<sup>6</sup> 4 g de extrato de levedura, 1 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 20 g de ágar, 20g de amido solúvel, 1000 mL de água destilada q.s.p., pH 6,2.

#### 5.4. Análises estatísticas

Não foi necessária a transformação dos dados obtidos durante e ao final dos ensaios para a realização das análises estatísticas paramétricas já que eles atenderam aos pressupostos de aditividade, independência dos erros, normalidade dos erros e homogeneidade de variâncias dos erros, necessários para validação da análise de variância (Teste *F*) e posterior aplicação do teste de Tukey na comparação das médias dos grupos e do Teste *T* na análise de regressão das médias dos grupos em função do tempo (Ribeiro Júnior, 2001).

Estes dados foram interpretados estatisticamente pela análise de variância (Teste *F*) em níveis de 1 e 5% de probabilidade e de regressão linear (Teste *T*) em nível de 5% de probabilidade. A eficiência de predação de *L*<sub>3</sub> nos tratamentos em relação ao controle foi avaliada pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

O cálculo do percentual de redução do número de *L*<sub>3</sub> nos tratamentos foi feito pela equação:

$$\text{Redução (\%)} = \left( \frac{\text{Média de } L_3 \text{ recuperadas do controle} - \text{Média de } L_3 \text{ recuperadas do tratamento}}{\text{Média de } L_3 \text{ recuperadas do controle}} \right) \times 100$$

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software “Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas” – SAEG –, desenvolvido pela Universidade Federal de Viçosa – Minas Gerais (Euclides, 1997).

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. Predação de larvas infectantes (L<sub>3</sub>) de *Ancylostoma* spp. em meio de cultura AA 2%

Na Tabela 1 (Anexo) tem-se o resumo da análise de variância da regressão mostrando que houve diferença significativa entre os tratamentos ( $P < 0,01$ ), na interação tratamento x tempo ( $P < 0,05$ ) e nos dias do experimento ( $P < 0,01$ ).

As médias de L<sub>3</sub> não predadas por campo de 4 mm de diâmetro do controle sem fungos foram significativamente maiores ( $P < 0,05$ ) do que as dos tratamentos em todos os dias experimentais (Tabela 2). Entre os tratamentos, diferença significativa entre as médias ( $P < 0,05$ ) foi observada nos dias 4 e 5 quando a média de L<sub>3</sub> não predadas por campo de 4 mm de diâmetro do isolado fúngico NF34A diferiu dos demais tratamentos. Nos dias 2, 6 e 7 este isolado fúngico diferiu apenas do tratamento com o isolado fúngico I31. Nos demais dias não houve diferença entre as médias (Tabela 2).

Com base nestes valores estimaram-se as equações ajustadas da regressão para o controle sem fungos e os tratamentos sendo apresentadas no Gráfico 1. As equações com alto grau de associação entre a variável dependente e a variável explicativa  $D$  ( $R^2 > 0,90$ ) e com os coeficientes de regressão significativos ( $P < 0,01$ ) mostram que os dias influenciaram diretamente na predação de L<sub>3</sub> de *Ancylostoma* spp. por campo de 4 mm de diâmetro, ou seja, para cada dia acrescentado ao experimento a média destas larvas diminuiu de 0,35, 0,28, 0,24 e

0,23 L<sub>3</sub> para o controle sem fungos e os tratamentos com os isolados fúngicos CG768, I31 e NF34A, respectivamente.

O comportamento descendente da curva de regressão dos tratamentos, sob temperatura ambiente média de 28 °C, pôde ser evidenciado no Gráfico 1, originado a partir dos dados da Tabela 2, mostrando redução nas médias das L<sub>3</sub> não predadas por campo de 4 mm de diâmetro de *Ancylostoma* spp. ao longo do tempo sendo devida à captura das L<sub>3</sub> pelas armadilhas fúngicas.

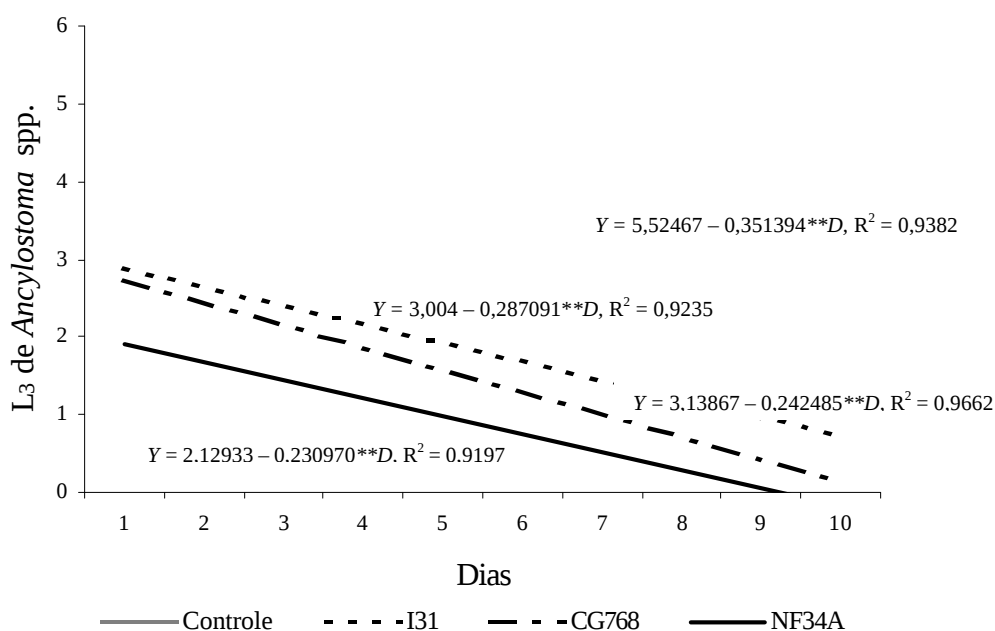
Tabela 2 – Média diária de larvas infectantes (L<sub>3</sub>) não predadas de *Ancylostoma* spp. por campo de 4 mm de diâmetro em meio ágar-água 2% no período de 10 dias nos tratamentos com os isolados fúngicos de *Arthrobotrys robusta* (I31), *Duddingtonia flagrans* (CG768) e *Monacrosporium thaumasium* (NF34A) e no controle sem fungos.

| Tempo<br>(Dias) | Tratamentos |       |        |                   |
|-----------------|-------------|-------|--------|-------------------|
|                 | I31         | CG768 | NF34A  | Controle          |
| 1               | 2,89b       | 2,98b | 2,13b  | 4,85 <sup>a</sup> |
| 2               | 2,87b       | 2,28b | 1,86bc | 4,68 <sup>a</sup> |
| 3               | 2,15b       | 2,11b | 1,45b  | 4,50 <sup>a</sup> |
| 4               | 2,14b       | 2,07b | 1,01c  | 4,29 <sup>a</sup> |
| 5               | 1,85b       | 1,66b | 0,73c  | 4,20a             |
| 6               | 1,82b       | 0,91b | 0,56bc | 3,60a             |
| 7               | 1,48b       | 0,66b | 0,28bc | 3,37a             |
| 8               | 1,16b       | 0,56b | 0,26b  | 2,32a             |
| 9               | 1,08b       | 0,52b | 0,20b  | 2,15a             |
| 10              | 0,61b       | 0,50b | 0,11b  | 1,96a             |

Médias seguidas de pela mesma letra nas linhas não diferem estatisticamente entre si em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey com diferença mínima significativa = 0,9276.

A formação destas armadilhas é uma resposta de fungos predadores a presença e migração de nematóides ou de substâncias deles derivadas sendo um sintoma de deficiência nutricional do fungo (Balan e Gerber, 1972; Scholler e Rubner, 1994; Gronvold et al., 1996b; Padilha e Mendoza-De Gives, 1996) e por

isto, a presença de L<sub>3</sub> de *Ancylostoma* spp. nas placas de Petri contendo AA 2% foi essencial para estimular a formação das armadilhas pelos isolados fúngicos e sua nutrição neste meio pobre em nutrientes. Os meios ricos em C e N previnem a passagem do saprofitismo para uma habilidade predatória, havendo formação de pouquíssima ou nenhuma armadilha (Bogum et al., 2005; Scholler e Rubner, 1994; Morgan et al., 1997) e segundo Eren e Pramer (1965), o fornecimento periódico de nematóides aos fungos predadores em meios de baixo nível nutricional reduziria o crescimento saprófita destes fungos. Neste ensaio tomou-se o cuidado de não usar meio ágar nutriente, mas apenas AA 2%, de forma que o fungo só poderia usar o nematóide como fonte de nutrição.



\*\* = F significativo em nível de 1% de probabilidade.

Gráfico 1 – Curvas de regressão linear de larvas infectantes (L<sub>3</sub>) não predadas de *Ancylostoma* spp. observadas em campos de 4 mm de diâmetro em meio AA 2% em função do tempo nos tratamentos com os isolados fúngicos de *Arthrobotrys robusta* (I31), *Duddingtonia flagrans* (CG768) e *Monacrosporium thaumasium* (NF34A) e no controle sem fungos.

Na Tabela 3 (Anexo) observa-se o resumo da análise de variância das médias de L<sub>3</sub> de *Ancylostoma* spp. recuperadas pelo método de Baermann aos 10 dias demonstrando que houve diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ ) no controle sem fungos e nos tratamentos.

As médias das L<sub>3</sub> de *Ancylostoma* spp. recuperadas do meio AA 2% do controle sem fungos e dos tratamentos no décimo dia experimental pelo método de Baermann foram representadas no Gráfico 2. A média do controle sem fungos diferenciou-se estatisticamente ( $P < 0,05$ ) da média dos tratamentos. Em relação ao controle sem fungos, o isolado fúngico I31 foi o mais eficiente na captura e destruição de L<sub>3</sub>, entretanto na comparação entre os tratamentos a média de larvas recuperadas não foi estatisticamente diferente ( $P > 0,05$ ) da média do isolado fúngico CG768, sendo estatisticamente diferente ( $P < 0,05$ ) do isolado fúngico NF34A. Também não houve diferença estatística ( $P > 0,05$ ) entre os isolados CG768 e I31.

De um total de 1.000 L<sub>3</sub>, foram recuperadas das placas do controle sem fungos uma média de 890 L<sub>3</sub> indicando que 11% delas morreram naturalmente com o tempo, provavelmente devido a desnutrição. Os resultados indicaram que as espécies de fungo estudadas reduziram significativamente a média de L<sub>3</sub> de *Ancylostoma* spp. em 88,76%, 97,75% e 89,89% nos tratamentos com os isolados fúngicos NF34A, I31 e CG768, respectivamente (Gráfico 3).

Os isolados fúngicos de *A. robusta* (isolado I 31), *D. flagrans* (isolado CG 768) e *M. thaumasium* (isolado NF 34A) foram capazes de predação as L<sub>3</sub> de *Ancylostoma* spp. nos ensaios realizados *in vitro* (Figuras 6, 8 e 10). Essa predação foi observada nos tratamentos já na primeira leitura dos campos, feita 24 horas após a interação das larvas com os isolados fúngicos (Tabela 2). Não foi detectada a presença de fungos nematófagos e conseqüente predação nas placas controle no decorrer dos dias do ensaio (Figura 1) sendo a comprovação desta predação observada pela redução na média das L<sub>3</sub> recuperadas ao final do ensaio (Gráfico 2).



Figura 7 – Larvas infectantes (L<sub>3</sub>) de *Ancylostoma* spp. em placa de Petri do controle sem fungos contendo meio ágar-água 2% (Aumento 10 x 4).



Figura 8 – Predação de larvas infectantes (L<sub>3</sub>) de *Ancylostoma* spp. por *Duddingtonia flagrans* em placa de Petri contendo meio ágar-água 2% (Aumento 10 x 4).

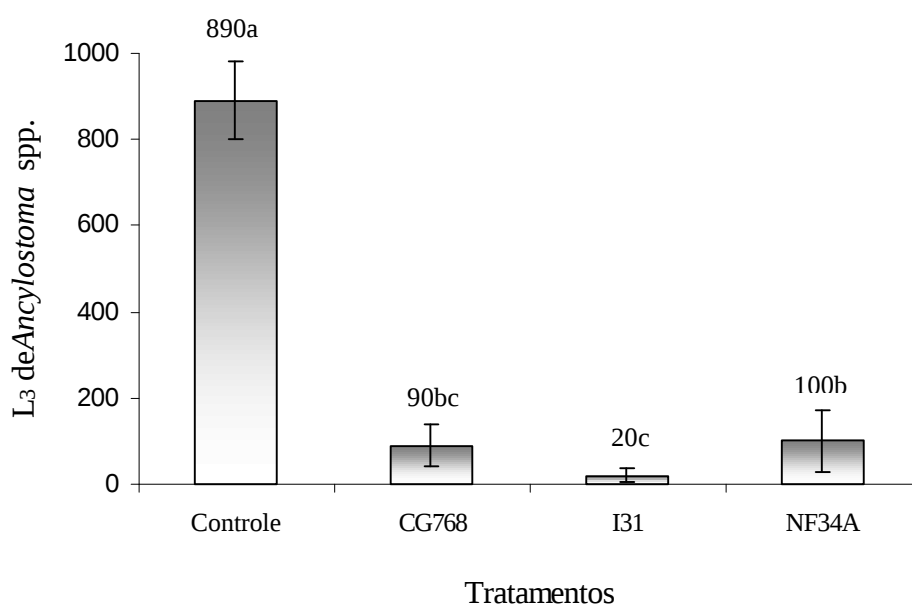


Figura 9 – Predação de larva infectante (L<sub>3</sub>) de *Ancylostoma* spp. por *Arthrobotrys robusta* em placa de Petri contendo meio ágar-água 2% (Aumento 10 x 20).



Figura 10 – Predação de larva infectante (L<sub>3</sub>) de *Ancylostoma* spp. por *Monacrosporium thaumasium* em placa de Petri contendo meio ágar-água 2% (Aumento 10 x 20).

Estudos *in vitro* podem superestimar o potencial dos fungos predadores, já que nas placas de Petri os nematóides não teriam condições de escapar da predação destes microrganismos, não havendo reprodução das interferências comumente encontradas no solo e mudanças no ambiente (Gomes et al., 2001b), sendo necessários estudos *in vivo* para obter maiores informações sobre a viabilidade da utilização destes microrganismos no controle de nematóides intestinais de cães.



Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey com diferença mínima significativa = 75,34.

Gráfico 2 – Média de larvas infectantes (L<sub>3</sub>) de *Ancylostoma* spp. recuperadas de meio AA 2% pelo método de Baermann no décimo dia dos tratamentos após interação com os isolados fúngicos de *Arthrobotrys robusta* (I31), *Duddingtonia flagrans* (CG768) e *Monacrosporium thaumasium* (NF34A) e do controle sem fungos.

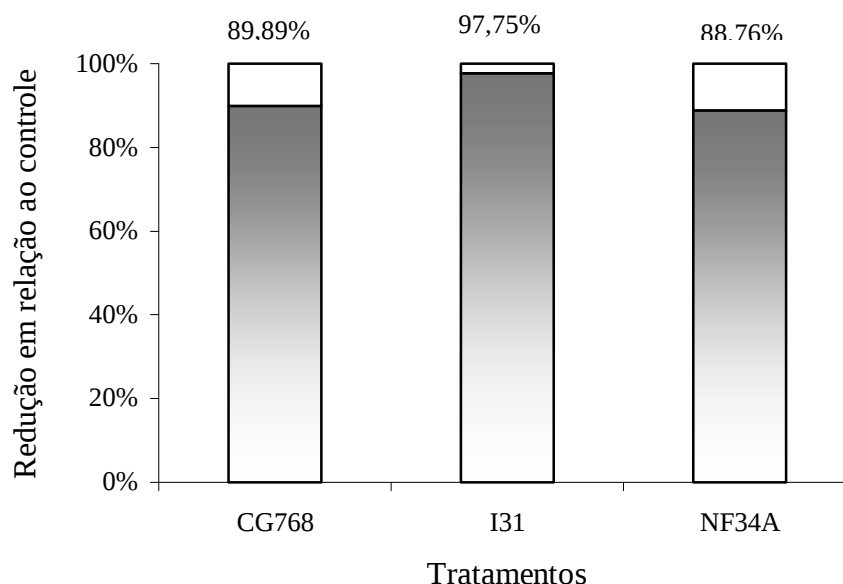


Gráfico 3 – Porcentagem de redução na média de larvas infectantes (L<sub>3</sub>) de *Ancylostoma* spp. recuperadas de meio AA 2% pelo método de Baermann dos tratamentos no décimo dia experimental após interação com os isolados fúngicos de *Arthrobotrys robusta* (I31), *Duddingtonia flagrans* (CG768) e *Monacrosporium thaumasium* (NF34A) em relação ao controle sem fungos.

Neste ensaio, mantido à temperatura ambiente, a temperatura média foi de 28 °C, o que favoreceu a atuação do fungo já que este fator é importante no crescimento e produção de armadilhas dos fungos nematófagos e varia de acordo com cada espécie, havendo influência nos percentuais de apreensão de larvas na faixa de 20 a 33 °C (Morgan-Jones et al., 1997). Isso foi comprovado em estudo *in vitro* com o fungo predador *D. flagrans* que produziu grande quantidade de armadilhas à temperatura de 20-30 °C em apenas dois dias e poucas armadilhas à temperatura de 10 °C em 10 dias (Gronvold et al., 1996b).

Em comparação a ensaios já realizados com outros nematóides e mesmas espécies de fungos predadores, a porcentagem de redução de L<sub>3</sub> de *Ancylostoma* spp. foi maior. Em ensaio *in vitro* dois isolados fúngicos de *A. robusta* – B e C – foram capazes de capturar num período de cinco dias uma média de 53% e 56% das L<sub>3</sub> de *Cooperia punctata* (Araújo et al., 1998). Esta mesma espécie predou 32,3% das L<sub>3</sub> de *Strongyloides papillosus* (Gonzalez Cruz et al., 1998) e 92,33%

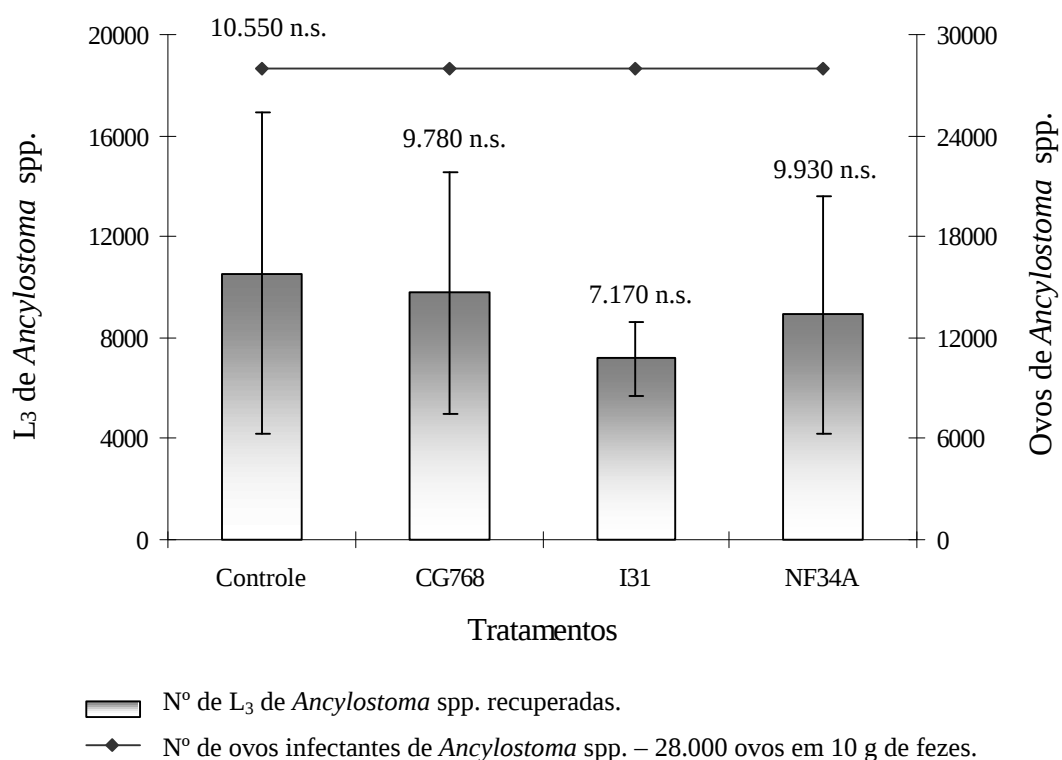
das L<sub>3</sub> de *H. contortus* (Mendoza-De Gives et al., 1992) após sete dias incubados a 25 °C em meio CMA. Foram recuperadas apenas 690 L<sub>3</sub> das 10.000 L<sub>3</sub> de *H. contortus* após 20 dias de incubação a 25 °C em meio AA 2% com 1.000 conídios de *M. thaumasium* (Mota et al., 2000).

A comparação dos resultados obtidos neste ensaio com os de outros estudos pode indicar que as L<sub>3</sub> do gênero *Ancylostoma* spp. são mais sensíveis a predação por estas espécies de fungos predadores do que outras L<sub>3</sub> de nematóides parasitas de animais domésticos.

## **6.2. Predação de larvas infectantes (L<sub>3</sub>) de *Ancylostoma* spp. em coproculturas de fezes de cães**

Não houve diferença significativa nos tratamentos ( $P > 0,05$ ) como é visualizado no resumo da análise de variância da Tabela 4 (Anexo). O Gráfico 4 apresenta as médias de L<sub>3</sub> de *Ancylostoma* spp. recuperadas das coproculturas no décimo dia experimental pelo método de Baermann não se evidenciando diferença estatística significativa ( $P > 0,01$ ) entre o controle sem fungos e os tratamentos. Este gráfico também permite comparar estas médias com o número de ovos de *Ancylostoma* spp. presentes nas 10 g de fezes das coproculturas, verificando-se que a média de L<sub>3</sub> de *Ancylostoma* spp. recuperadas do controle sem fungos foi pequena em relação aos 28.000 ovos presentes nas fezes das coproculturas o que pode ser devido a não eclosão dos ovos e morte natural das larvas.

Tal resultado pode ser devido ao fato da concentração de conídios/ovos de *Ancylostoma* spp. resultante da mistura nos tratamentos ter sido pequena em relação a concentração de 1 conídio/ovo preconizada em outros ensaios experimentais envolvendo fungos nematófagos e nematóides patogênicos aos animais (Bird e Herd, 1995). As fezes utilizadas neste ensaio apresentavam uma contagem de 2.800 ovos/g resultando numa concentração de 0,36 conídio/ovo de *Ancylostoma* spp. após adicionar 1.000 conídios/g de fezes nas coproculturas dos tratamentos.



Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Gráfico 4 – Média de larvas infectantes (L<sub>3</sub>) de *Ancylostoma* spp. recuperadas pelo método de Baermann no décimo dia das coproculturas dos tratamentos após interação com os isolados fúngicos de *Arthrobotrys robusta* (I31), *Duddingtonia flagrans* (CG768) e *Monacrosporium thaumasium* (NF34A) e do controle sem fungos em relação a média de ovos em 10 g de fezes.

Alguns fatores podem ter sido responsáveis pela não significância das médias deste ensaio como o tempo, a temperatura e a disponibilidade de matéria orgânica. O intervalo de 10 dias das coproculturas com os isolados fúngicos de *Arthrobotrys robusta* (I31), *Duddingtonia flagrans* (CG768) e *Monacrosporium thaumasium* (NF34A) parece ter sido insuficiente e provavelmente um aumento nesse intervalo resultaria em melhor atuação dos isolados fúngicos sobre as L<sub>3</sub> de *Ancylostoma* spp. Uma temperatura superior à temperatura de 25 °C em que foi

mantido o ensaio poderia ter influenciado positivamente na captura das L<sub>3</sub> de *Ancylostoma* spp. A disponibilidade de matéria orgânica rica em nutrientes nas fezes também pode ter reduzido a necessidade dos isolados fúngicos de capturar as L<sub>3</sub> de *Ancylostoma* spp. para se nutrir.

Ao analisar o Gráfico 5 observou-se que a redução na média de L<sub>3</sub> de *Ancylostoma* spp. nos tratamentos em relação ao controle sem fungos foi pequena comparada com outros resultados de estudos *in vitro*. Os isolados fúngicos CG768, I31 e NF34A reduziram em 7,30%, 32,04% e 15,36% a média de L<sub>3</sub> de *Ancylostoma* spp., respectivamente. O isolado fúngico I31 também apresentou maior atividade predatória neste ensaio e o isolado fúngico NF34A predou mais larvas do que o CG768. Esta redução foi menor do que a observada no ensaio em meio AA 2%, que foi superior a 80%.

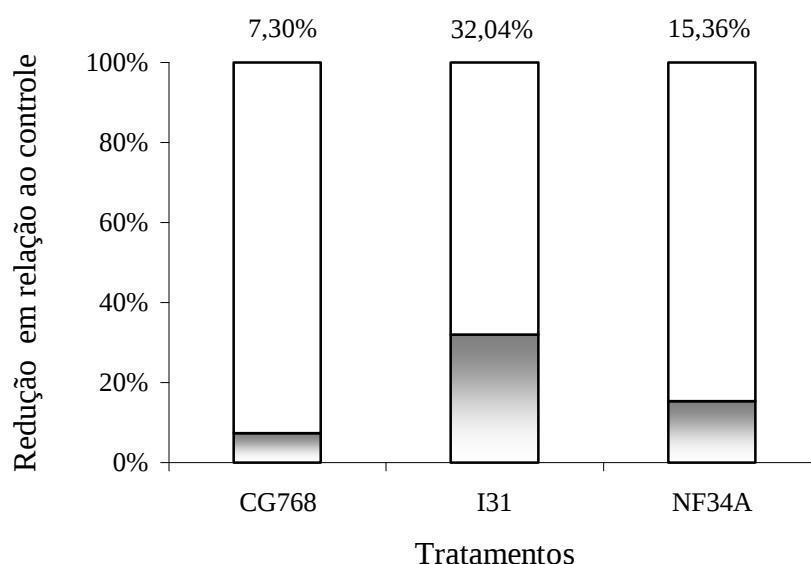


Gráfico 5 – Porcentagem de redução na média de larvas infectantes (L<sub>3</sub>) de *Ancylostoma* spp. recuperadas pelo método de Baermann após 10 dias das coproculturas tratadas com os isolados fúngicos de *Arthrobotrys robusta* (I31), *Duddingtonia flagrans* (CG768) e *Monacrosporium thaumasium* (NF34A) em relação ao controle sem fungos.

Resultados de estudos *in vitro* envolvendo o fungo predador *D. flagrans*

e L<sub>3</sub> de ciatostomíneos mostraram redução de 32,1% na média das L<sub>3</sub> destes nematóides em fezes de eqüinos quando na concentração de 1 conídio/ovo, 90,5% na concentração de 10 conídios/ovo e 93,9% na concentração de 100 conídios/ovo (Bird e Herd, 1995). Em outro ensaio *in vitro* este mesmo fungo predador na concentração de 250 clamidosporos/g de fezes reduziu 93% das L<sub>3</sub> de *Cooperia oncophora* em culturas fecais contendo 967 ovos/g de fezes de bovinos (Gronvold et al., 2004).

Redução de 10,1% na média de L<sub>3</sub> de *Haemonchus contortus* em relação ao controle ocorreu em culturas de fezes de ovinos *in vitro* semeadas com 20.000 conídios/g de fezes de *A. robusta* (Mendoza-De Gives e Vazquez-Prats, 1994). Houve uma redução de 70, 93, 87 e 82% na média de L<sub>3</sub> de *H. contortus* após a adição de 1 cm de ágar de cultura fúngica do fungo predador *M. thaumasium* em quatro grupos experimentais contendo 5, 10, 20 e 50 g de fezes de ovinos cultivadas à temperatura de 25°C por sete dias, respectivamente (Waller e Faedo, 1993).

### **6.3. Esporulação dos isolados fúngicos de *Arthrobotrys robusta* (CG768), *Duddingtonia flagrans* (I31) e *Monacrosporium thaumasium* (NF34A) em meios de cultura**

Neste ensaio comparou-se a produção de conídios dos isolados fúngicos CG768, I31 e NF34A em estudo em quatro meios rotineiramente utilizados em laboratório, a fim de conhecer o melhor meio para produção de conídios para cada um destes isolados fúngicos. Os fungos foram capazes de crescer e esporular em todos os meios testados.

Na Tabela 5 (Anexo) está o resumo da análise de variância onde se observa que houve diferença estatística significativa ( $P < 0,01$ ) nos isolados fúngicos, nos meios e na interação fungo x meio ( $P < 0,01$ ).

Na Tabela 6 estão descritas as médias de conídios produzidos pelos isolados fúngicos nos meios. Não houve diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ ) entre as médias dos isolados fúngicos CG768, I31 e NF34A quanto a

produção de conídios em meio AA 2%, que foi o pior meio para a produção de conídios em relação aos demais meios. No entanto, esperava-se que maior produção de conídios ocorresse nesse meio que é pobre em nutrientes, com pouca fonte de C e N, uma condição estressante para o fungo, e assim um estímulo a esporulação com supressão do crescimento vegetativo (Dhingra e Sinclair, 1995). Nos meios BDA 2%, CMA 2% e YPSSA a média de conídios produzida pelos três isolados fúngicos foi estatisticamente diferente ( $P < 0,05$ ) sendo que o isolado fúngico com maior produção de conídios nestes três meios foi o CG768 ao contrário do NF34A que foi o que menos produziu. Baseando-se nestes resultados observou-se que estes fungos necessitam de uma boa fonte de nutrientes para produzir uma maior quantidade de conídios.

Tabela 6 – Médias das contagens de conídios dos isolados fúngicos de *Arthrobotrys robusta* (I31), *Duddingtonia flagrans* (CG768) e *Monacrosporium thaumasium* (NF34A) nos meios AA 2%, batata-dextrose-ágar 2% (BDA 2%), corn-meal-agar 2% (CMA 2%) e yeast-phosphate-sulphate-sacarose-agar (YPSSA).

| Fungo | AA 2%      | BDA 2%        | CMA 2%       | YPSSA        |
|-------|------------|---------------|--------------|--------------|
| I31   | 235.833 Ab | 3.258.333 Ba  | 2.496.667 Ba | 3.427.500 Ba |
| CG768 | 31.667 Ac  | 11.030.000 Aa | 5.927.500 Ab | 5.638.333 Ab |
| NF34A | 60.834 Ab  | 1.008.333 Ca  | 86.667 Cb    | 1.478.333 Ca |

M/F (fixando-se o meio de cultura e comparando-se os fungos) = As médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas colunas não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey com diferença mínima significativa = 1.106.529,74.

F/M (fixando-se o fungo e comparando-se os meios de cultura) = As médias seguidas pela mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey com diferença mínima significativa = 1.005.936,13.

Quando se analisou o isolado fúngico CG768 nos diversos meios verificou-se que houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) do meio BDA 2% em relação aos demais meios, o que também foi observado com o meio AA 2%. As médias de conídios produzidas por este fungo não foram diferentes ( $P > 0,05$ ) entre os meios CMA 2% e YPSSA. No caso do isolado fúngico I31 verificou-se

que a média de conídios produzidos no meio AA 2% foi estatisticamente inferior ( $P < 0,05$ ) em relação aos demais meios, não havendo diferença ( $P > 0,05$ ) entre as médias dos meios BDA 2%, CMA 2% e YPSSA. A produção de conídios do isolado fúngico NF34A foi estatisticamente igual ( $P > 0,05$ ) entre os meios AA e CMA que diferiram estatisticamente ( $P < 0,05$ ) dos meios BDA e YPSSA, cujas médias não foram estatisticamente diferentes ( $P < 0,05$ ) entre si.

O meio BDA foi o melhor para a produção de conídios do isolado fúngico CG768 enquanto que para os isolados fúngicos I31 e NF34A o meio YPSSA foi o que permitiu maior produção destas estruturas reprodutivas, resultado este melhor representado no Gráfico 6. Em todos os meios o isolado fúngico *D. flagrans* (CG 768) produziu grande quantidade de clamidósporos (Anexo, Figura 4). O meio BDA leva vantagens em relação aos demais quanto ao custo por ser um meio de cultura mais barato.

Em um estudo realizado por Dias (1992), o meio YPSSA proporcionou maior crescimento e esporulação para o fungo *A. robusta* em relação aos meios BDA e CMA em estufa a 25 °C, assemelhando-se ao resultado obtido neste ensaio. Em outro estudo, grande produção de conídios foi observada em meio YPSSA pelos isolados fúngicos I31 e NF34A após sua preservação em diferentes métodos de conservação, sendo que o isolado fúngico I31 produziu maior número de conídios em relação ao isolado fúngico NF34A (Mota et al., 2003).

Os fungos requerem um conjunto de condições ambientais para o seu crescimento incluindo aeração, luz, umidade, temperatura etc, mas segundo Dhingra e Sinclair (1995), o meio de cultura é o fator de maior influência no cultivo fúngico sendo que a concentração de seus constituintes determina a qualidade e a quantidade de crescimento e se a esporulação ou o crescimento vegetativo serão dominantes. Um bom meio de cultura permite grande esporulação e pequeno crescimento micelial, sendo que, geralmente, a esporulação é favorecida por esgotamento nutricional, o que é uma condição adversa ao crescimento vegetativo (Dhingra e Sinclair, 1995).

Em muitos estudos com fungos nematófagos grandes quantidades de esporos são requisitadas (Araújo et al., 2001; Larsen et al., 1995; Waller et al., 2001) daí a necessidade de conhecer os meios que permitam maior esporulação

para determinado fungo nematófago. A esporulação abundante também é importante para a disseminação e sobrevivência de fungos em condições ambientais (Jansson, 1982), o que é desejável em programas de controle biológico.

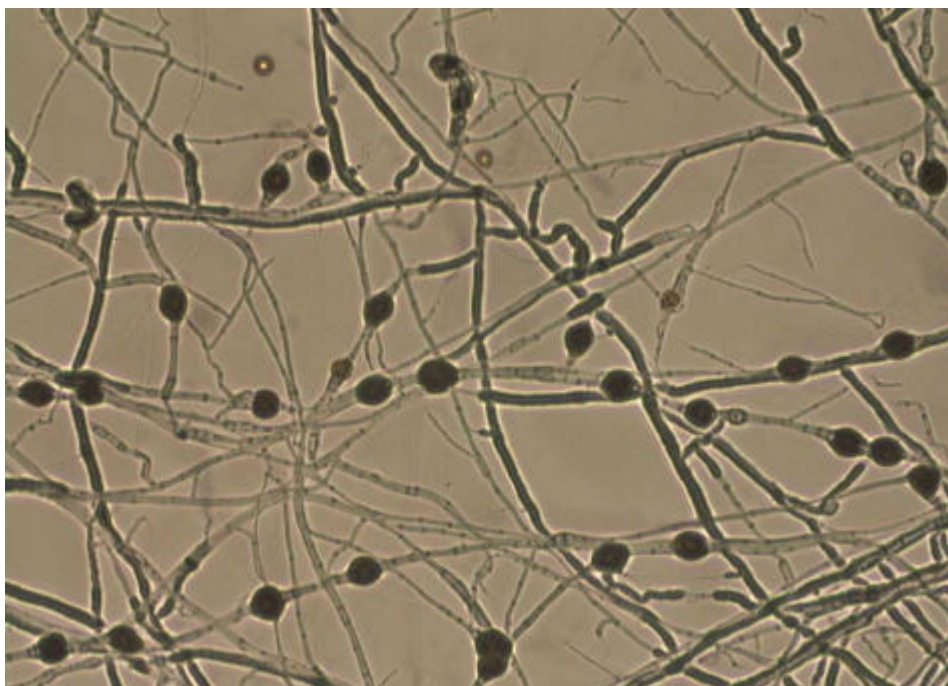
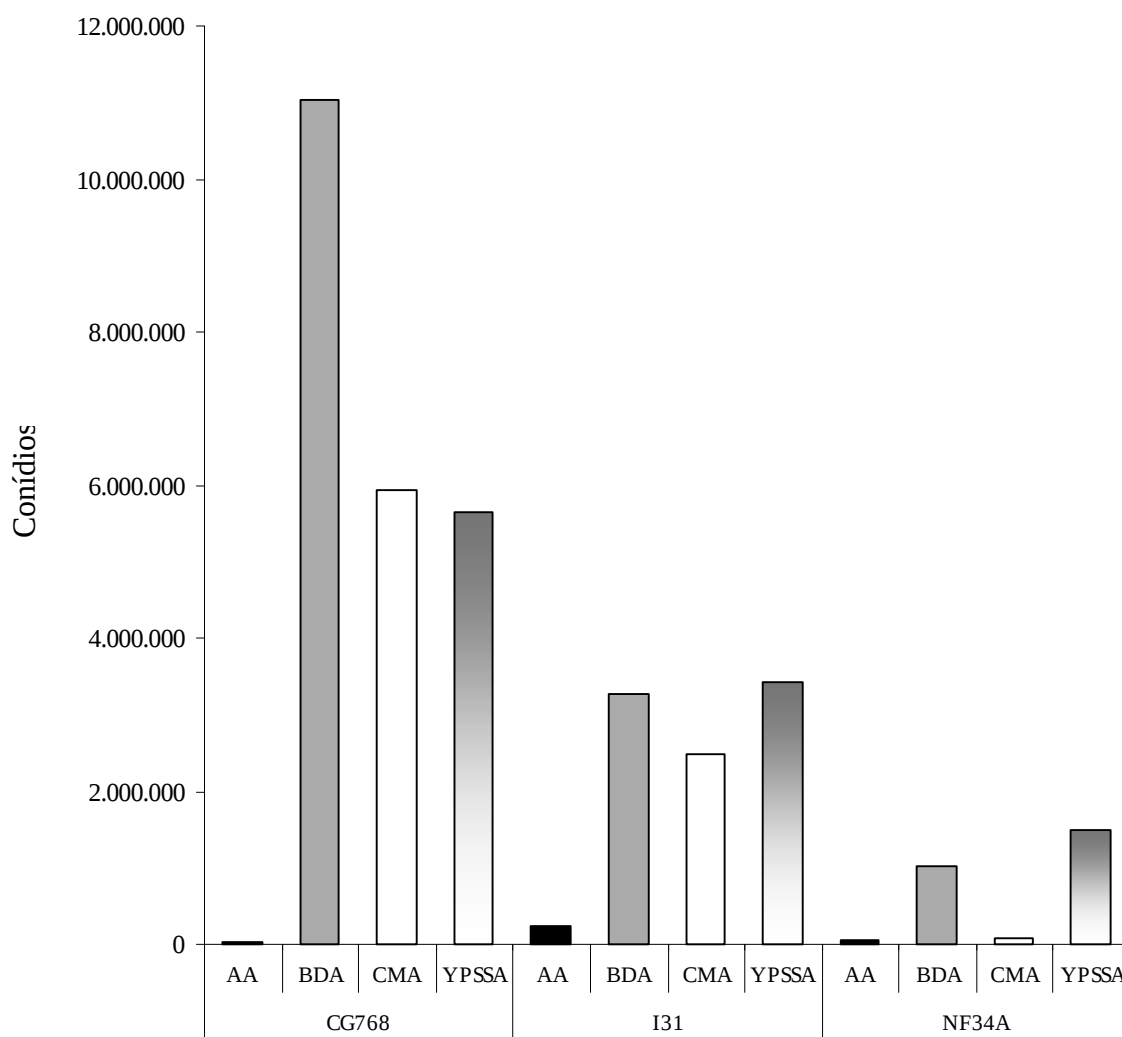


Figura 11 – Clamidósporos de *Duddingtonia flagrans* em placa de Petri contendo meio ágar-água 2% (Aumento 10 x 10).

Em sua fase saprofítica os fungos predadores de nematóide são capazes de utilizar diversas fontes de C e N em sua nutrição (Saxena et al., 1989). Estes fungos não são exigentes em sua nutrição não necessitando de meios complexos para seu crescimento (Blackburn e Hayes, 1966; Araújo et al., 2004). Normalmente a produção de conídios para ensaios experimentais é feita em meio AA 2% adicionando-se nematóides de vida livre como o *Panagrellus* sp. (Araújo et al., 1993; Araújo et al., 1994), entretanto a produção de conídios por meio desta técnica é demorada.



Isolados de fungos predadores x Meios de cultura

Gráfico 6 – Médias da produção de conídios dos isolados fúngicos de *Arthrobotrys robusta* (I31), *Duddingtonia flagrans* (CG768) e *Monacrosporium thaumasium* (NF34A) nos meios AA 2%, batata-dextrose-ágar 2% (BDA 2%), corn-meal-agar 2% (CMA 2%) e yeast-phosphate-sulphate-sacarose-agar (YPSSA).

## 7. CONCLUSÕES

- 1 – Os isolados fúngicos de *Arthrobotrys robusta* (I31), *Duddingtonia flagrans* (CG768) e *Monacrosporium thaumasium* (NF34A) foram eficientes na captura *in vitro* dos nematóides *Ancylostoma* spp. em placas de Petri sobre superfície de meio de crescimento AA 2%;
- 2 – Os resultados evidenciaram que há uma maior atividade predatória *in vitro* em meio AA 2% do isolado fúngico de *Arthrobotrys robusta* (I31) sobre L<sub>3</sub> de *Ancylostoma* spp. em relação aos isolados fúngicos de *Duddingtonia flagrans* (CG768) e *Monacrosporium thaumasium* (NF34A);
- 3 – Nas coproculturas o isolado fúngico de *Arthrobotrys robusta* (I31) também apresentou maior atividade em relação aos isolados fúngicos de *Duddingtonia flagrans* (CG768) e *Monacrosporium thaumasium* (NF34A);
- 4 – O intervalo de 10 dias das coproculturas com os isolados fúngicos de *Arthrobotrys robusta* (I31), *Duddingtonia flagrans* (CG768) e *Monacrosporium thaumasium* (NF34A) parece ter sido insuficiente e por isso a dosagem e o tempo de interação fungo-nematóide devem ser melhor estudados;

- 5 – Existe um meio de cultura mais apropriado para cada um dos isolados fúngicos estudados. O isolado fúngico de *Duddingtonia flagrans* (CG768) produz maior número de conídios no meio BDA 2%. Os isolados fúngicos de *Arthrobotrys robusta* (I31) e de *Monacrosporium thaumasium* (NF34A) produzem maior número de conídios no meio YPSSA.
- 6 – O meio AA 2% não é um bom meio para esporulação dos isolados fúngicos de *Arthrobotrys robusta* (I31), *Duddingtonia flagrans* (CG768) e *Monacrosporium thaumasium* (NF34A).

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, E.G.L.; GUIMARÃES, A.M.; FIGUEIREDO, H.C.P., *et al.* Parasitos intestinais em hortaliças comercializadas em Lavras, Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, XII, 2002, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro – RJ, 01-05 de setembro de 2002, Cd-Rom.

ALVES, P. H.; ARAÚJO, J. V.; GUIMARÃES, M. P.; ASSIS, R. C. L.; SARTI, P.; CAMPOS, A. K. Aplicação de formulação do fungo predador de nematóides *Monacrosporium thaumasium* (Drechsler, 1937) no controle de nematóides de bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.6, p.568-573, 2003.

ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Manole, 1986. 407p.

ARAÚJO, J.V. **Interação entre larvas infectantes de *Cooperia punctata* e fungos predadores do gênero *Arthrobotrys*, caracterização de isolados de *Arthrobotrys* e seu uso no controle biológico de nematóides gastrintestinais de bovinos**. Belo Horizonte: UFMG, 1996. 110 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, 1996.

ARAÚJO, J.V.; CAMPOS, A. K.; PAIVA, F.; VIEIRA-BRESSAN, M. C. R. Efeito antagonista de fungos predadores do gênero *Arthrobotrys* sobre larvas infectantes de *Oesophagostomum radiatum*, *Cooperia punctata* e *Haemonchus*

placei. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.8, n.2, p.81-84, 2001.

ARAÚJO, J.V.; GOMES, A.P.S.; GUIMARÃES, M.P. Biological control of bovine gastrointestinal nematode parasites in southern Brazil by the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys robusta*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.7, n.2, p.117-122, 1998.

ARAÚJO, J.V.; MOTA, M.A.; CAMPOS, A.K. Controle biológico de helmintos parasitos de animais por fungos nematófagos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, n.1, p.165-170, 2004.

ARAÚJO, J.V.; PATARROYO, J.H. Initial interaction between *Haemonchus placei* infective larvae and different *Arthrobotrys* isolates. **Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia**, v.48, p.733-738, 1995.

ARAÚJO, J.V.; SANTOS, M.A.; FERRAZ, S. Efeito ovicida de fungos nematófagos sobre ovos embrionados de *Toxocara canis*. **Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia**, v.47, p.37-42, 1995.

ARAÚJO, J.V.; SANTOS, M.A.; FERRAZ, S.; MAGALHÃES, A.C.M. Controle de larvas infectantes de *Haemonchus placei* por fungos predadores da espécie *Monacrosporium ellypsosporum* em condições de laboratório. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.44, n.6, p.521-526, 1992.

ARAÚJO, J.V.; SANTOS, M.A.; FERRAZ, S.; MAIA, A.S. Antagonistic effect of predacious *Arthrobotrys* fungi on infective *Haemonchus placei* larvae. **Journal of Helminthology**, v.67, n.3, p.136-138, 1993.

ARAÚJO, J.V.; SANTOS, M.A.; FERRAZ, S.; MAIA, A.S. Biological control “in vitro” of infective *Haemonchus placei* larvae by predacious fungi *Arthrobotrys musiformis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.46, n.3, p.197-204, 1994.

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

ARAÚJO, R.F.; ARAÚJO, P.C.; WERNECK, R.M.; GÓRSKI, A. Larva migrans cutânea em crianças de uma escola em áreas do Centro-Oeste do Brasil. **Ver. Saúde Pública**, v.34, n.1, p.84-85, 2000.

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

BALOGH, J.; TUNLID, A.; ROSEN, S. Deletion of a lectin gene does not affect the phenotype of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 39, p.128–135, 2003

BARRON G.L. **The Nematode-destroying Fungi. Topics in Mycobiology.** Guelph, Canada: Canadian Biological Publications, 1977. 140 p.

BELDER, E. **Trapping of root-knot nematodes by the adesive hyphae-forming fungus *Arthrobotrys oligospora*.** Wageningen: Agricultural University Wageningen, 1994. 147p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Agricultural University Wageningen, 1994.

BELDER, E.; JANSEN, E.; DONKERS, J. Adhesive hyphae of *Arthrobotrys oligospora*: an ultrastructural study. **European Journal Plant Pathology**, v.102, p.471-478, 1996.

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

BIRD, J.; HERD, R.P. Nematophagous fungi for the control of equine cyathostomes. **Continuing Education**, v.16, n.5, p.658-665, 1994.

BLACKBURN, F.; HAYES, W.A. Studies on the nutrition of *Arthrobotrys oligospora* Fres. And *A. robusta* Dudd. **Annals Applied Biology**, v.58, p.43-50, 1966.

BOGUM, M.I.; CZYGIER, M.; KDDRA, 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. **Experimental Parasitology**, v.109, p.115-123, 2005.

BRENER, B.; MARTINS, A. V.; MATTOS, D.P.B.G.; PINNA, A.E.; QUEIROZ, A.P.A.; ARASHIRO, E.K.N.; MILLAR, P.R.; SUDRÉ, A.P. Estudo da contaminação de praças públicas de três municípios do Rio de Janeiro, Brasil, por ovos de *Toxocara* sp e *Ancylostoma* sp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2002. Cd-Rom.

BRENNER, M.A.; PATEL, M.B. Cutaneous larva migrans: the creeping eruption. **Cutis**, v.72, n.2, p.111-115, 2003.

BROWN, L. Affection for people as a function of affection for dog. **Psychological Reports**, v.31, p.957, 1990.

BURROWS, C.F.; BATT, R.M.; SHERDING, R.G. Disease of the small intestine. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Textbook of veterinary internal medicine. Disease of the dog and cat.** 4<sup>a</sup> ed., v.2. W. B. Saunders Company, 1995.

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

CARTER, G.R. **Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária.** São Paulo: Roca, 1988. p.225-237.

CASELLA, A.M.B.; MACHADO, R.A.; TSURO, A.; HATO, M.; COSTA, R.; FARAH, M.E. Seria o *Ancylostoma caninum* um dos agentes da neurorretinite sub-aguda difusa unilateral (DUSN) no Brasil? **Arquivo Brasileiro Oftalmologia**, v.64, n.5, 2001.

CASTRO, A.A. **Avaliação de fungos Deuteromycetos sobre as fases pré-parasíticas de *Cyathostominae* (Nematoda – *Strongylidae*).** Seropédica: UFRRJ, 2000. 115p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2000.

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

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

COOKE, R.C. Ecological characteristics of nematode-trapping *Hyphomycetes*. Germination of conidia in soil. **Annals of Applied Biology**, v.54, p.375-379,

1964.

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

CROESE, J.; LOUKAS, A.; OPDEBEECK, J. FAIRLEY, S. Human enteric infection with canine hookworms. **Annals of Internal Medicine**, v.120, p.369-374, 1994.

CROMPTON, D.W.T. How much human helminthiasis is there in the world? **Journal of Parasitology**, v.85, p.397-403, 1999.

CURY, M.C.; LIMA, W.S. Helmintos de cães e gatos. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, n.39, p.12-35, 2002.

DACKMAN, C.; NORDBRING-HERTZ, B. Conidial traps – a new survival structure of nematode trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. **Mycology Research**, v.96, p.194-198, 1992.

DEL GIUDICE, P.; DESALVADO, F.; BERNARD, E.; CAUMES, E.; VANDENBOS, F.; MARTY, P.; LE FICHOUX, Y.; DELLAMONICA, P. Loeffler's syndrome and cutaneous larva migrans: a rare association. **British Journal of Dermatology**, v.147, n.2, p.386-388, 2002.

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. **Basic plant pathology methods**. 2<sup>nd</sup> edition. CRC Press, 1995. 434p.

DIAS, W.P. **Controle de *Meloidogyne incógnita*, raça 3, com *Arthrobotrys* spp.** Viçosa: UFV, 1992. 71 p. Tese (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, 1992.

DIAS, W.P.; FERRAZ, S. Crescimento e esporulação de *Arthrobotrys* spp. em

diferentes substratos, meios de cultura, pH e níveis de temperatura. **Nematologia Brasileira**, v.17, n.2, p.168-181. 1993.

DIJKSTERHUIS, J.; VEENHUIS, M.; HARDER, W.; NORDBRING-HERTZ, B. Nematophagous fungi: physiological aspects and structure-function relationships. **Advances in Microbial Physiology**, v.36, p.111-143, 1994.

DIMANDER, S.O.; HÖGLUND, J.; UGGLA, A.; SPÖRNDLY, E.; WALLER, P.J. Evaluation of gastro-intestinal nematode parasite control strategies for first-season grazing cattle in Sweden. **Veterinary Parasitology**, v.111, n.2, p.192-209, 2003.

DOS SANTOS, H.A.; BARÇANTE, J.M.P.; RIBEIRO, V.M.; DIAS, S.R.C.; OLIVEIRA JÚNIOR, S.D.; BARÇANTE, T.A.; LIMA, W.S. **Frequência de parasitos intestinais em cães filhotes do município de Belo Horizonte – Minas Gerais**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12, Rio de Janeiro. Anais... Rio de Janeiro: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2002. Cd-Rom.

DUDDINGTON, C.L. Notes on the technique of handling predaceous fungi. **Transactions of British Mycology Society**, v.38, n.2, p.97-103, 1955.

EREN, J.; PRAMER, D. The most probable number of nematode-trapping fungi in soil. **Soil Science**, v.99, p.285, 1965.

ETTEMA, H.C. Soil nematode diversity: species coexistence and ecosystem function. **Journal of Nematology**, v.30, p.159-169, 1998.

EUCLIDES, R.F. **SAEG - Sistema de análises estatísticas e genéticas**. Versão 7.1. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa – UFV, 1997. 150p.

FAEDO, M.; BARNES, E.H.; DOBSON, R.J.; WALLER, P.J. The potential of

nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: pasture plot study with *Duddingtonia flagrans*. **Veterinary Parasitology**, v.76, p.129-135, 1998.

FAEDO, M.; LARSEN, M.; DIMANDER, S.O.; YEATES, G.W.; HÖGLUND, J.; WALLER, P.J. Growth of the fungus *Duddingtonia flagrans* in soil surrounding feces deposited by cattle or sheep fed the fungus to control nematode parasites. **Biological Control**, v.23, p.64-70, 2002.

FAEDO, M.; LARSEN, M.; THAMSBORG, S. Effect of different times of administration of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on the transmission of ovine parasitic nematodes on pasture - a plot study. **Veterinary Parasitology**, v.94, p.55-65, 2000.

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

FERNANDEZ, A.S.; LARSEN, M.; NANSEN, P.; GRONVOLD, J.; HENRICKSEN, S.A.; WOLSTRUP, J. Effect of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* on the free-living stages of horse parasitic nematodes: a plot study. **Veterinary Parasitology**, v.73, p.257-266, 1997.

FERNANDEZ, A.S.; LARSEN, M.; WOLSTRUP, J.; GRONVOLD, J.; NANSEN, P.; BJORN, H. Growth rate and trapping efficacy of nematode trapping fungi under constant and fluctuating temperatures. **Parasitology Research**, v.85, p.661-668, 1999.

FLORES, C.R.; DIAS, M.A.M.; CALLE, M.C.; SANCHEZ, D.A.; ARCAYA, C.V.D. Cutaneous larva migrans. **Annals of Pediatría**, n.61, p.270-271, 2004.

FREITAS, M.G. **Helmintologia veterinária**. 6 Ed. Belo Horizonte: Precisa Editora Gráfica Ltda, 1982. 396p.

GASS, J.D.M.; BRAUNSTEIN, R.A. Further observations concerning the diffuse unilateral subacute neuroretinitis syndrome. **Archives of Ophthalmology**, v.101, p.1689-1697, 1983.

GENNARI, S.M.; KASAI, N.; PENA, H.F.J.; CORTEZ, A. Ocorrência de protozoários e helmintos em amostras de fezes de cães e gatos da cidade de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.36, n.2, 1999.

GENNARI, S.M.; PENA, H.F.J.; BLASQUES, L.S. **Veterinary News**, v.8, n.52, p.10-12, 2001.

GITHIGIA, S.M.; THAMSBORG, S.M.; LARSEN, M. The preventive effect of the fungus *Duddingtonia flagrans* on trichostrongyle infections of lambs on pasture. **International Journal Parasitology**, v.27, n.8, p.931-939, 1997.

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

GOMES, A.P.S.; ARAÚJO, J.V.; RIBEIRO, R.C.F. Differential in vitro pathogenicity of the genus *Monacrosporium* for phytonematodes, free-living nematodes and parasitic nematodes of cattle. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.32, n.1, p.79-83, 1999.

GOMES, A.P.S.; RAMOS, M.L.; VASCONCELLOS, R.S.; JENSEN, J.R.; VIEIRA-BRESSAN, M.C.R.; ARAÚJO, J.V. *In vitro* activity of brazilian strains

of the predatory fungi *Arthrobotrys* spp. on free-living nematodes and infective larvae of *Haemonchus placei*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, n.6, p.873-876, 2001a.

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

GONZALEZ CRUZ, M.E.; MENDOZA-DE GIVES P.; QUIROZ ROMERO, H. Comparison of the trapping ability of *Arthrobotrys robusta* and *Monacrosporium geophyropagum* on infective larvae of *Strongyloides papillosus*. **Journal of Helminthology**, v.72, n.3, p.209-13. 1998

GORDON, H. M.; AND WHITLOCK, H. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal Council Science of Industry and Research**, v.12, n.1, p.50-52, 1939.

GRAY, N.F. Ecology of nematode trapping fungi: effect on soil moisture, organic matter, distribution. **Soil Biology and Biochemistry**, v.17, p.499-507, 1985.

GRAY, N.F. Fungi attacking vermiform nematodes. *In*: POINAR, O.G.; BORNE, J.H. (Eds.). **Diseases of nematodes**. Boca Raton: CRC Press, 1988. p.3-38.

GRAY, N.F. Nematophagous fungi with particular reference to their ecology. **Biological Reviews**, v.62, p.245-304, 1987.

GRIFFIN, D.H. **Fungal Physiology**. Wiley-Liss, New York, 1994. 458 p.

GRONVOLD, J.; HENRIKSEN, S.A.; LARSEN, M.; NANSEN, P.; WOLSTRUP, J. Biological control – aspects of biological control – with special reference to arthropods, protozoa and helminthes of domesticated animals. **Veterinary Parasitology**, v.64, n.1-2, p.47-64, 1996a.

GRONVOLD, J.; NANSEN, P.; HENRIKSEN, S.A.; LARSEN, M.; WOLSTRUP, J.; BRESCIANI, J.; RAWAT, H.; FRIBERT, L. Induction of traps by *Ostertagia ostertagi* larvae, chlamydospore production and growth rate in the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*. **Journal of Helminthology**, v.70, p.291-297, 1996b.

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

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

GRONVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; NANSEN, P.; LARSEN, M.; BJORN, H. Absence of obvious short term impact of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* on survival and growth of the earthworm *Aporrectodea longa*. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.41, p.147-151, 2000.

HAARD, K. Taxonomic studies on the genus *Arthrobotrys* Corda. **Mycologia**, v.60, p. 1140-1159, 1968.

HASHMI, H.A.; CONNAN, R.M. Biological control of ruminant trichostrongylidae by *Arthrobotrys oligospora*, a predacious fungus.

**Parasitology Today**, v.5, p.28-30, 1989.

HENDRIX, C.M. **Diagnostic veterinary parasitology**. 2<sup>nd</sup> ed. Mosby Inc., St. Lois, M.O., 1998.

HENRIKSEN, SV.AA.; LARSEN, M.; GRONVOLD, J.; NANSEN, P.; WOLSTRUP, J. Nematode-trapping fungi in biological control of *Dictyocaulus viviparus*. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.38, p.175-179, 1997.

HERD, R.; STRONG, L.; WARDAUGH, K. Environmental impact of avermectin usage in livestock. **Veterinary Parasitology**, v.48, p.1344, 1993.

HEUKELBACH, J.; WILCKE, T.; FELDMEIER, H. Cutaneous larva migrans (creeping eruption) in an urban slum in Brazil. **International Journal of Dermatology**, v.43, p.511-515, 2004.

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

JAFFEE, B.A.; STRONG, D.R.; MULDOON, A.E. Nematode-trapping fungi of a natural shrubland: tests for food chain involvement. **Mycologia**, v.88, n.4, p.554-564, 1996.

JANSSON, H.B. Predacity by nematophagous fungi and its relation to the attractions of nematodes. **Microbial Ecology**, v.8, p.233-240, 1982.

JATALA, P. Biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, v.24, p.453-489, 1986.

JUAREZ, R.D.L.; MENDOZA-DE GIVES, P. Resistance of nematophagous

fungi chlamydospores to the digestive processes of sheep in Mexico. **Journal of Helminthology**, v.72, p.155-158, 1998.

JUNIPER, A.J. Dung as a source of predacious fungi. **Transaction British Mycological Society**, v.40, p.346-348, 1957.

KALKOFLEN, U.P. Hookworms of dogs and cats. **Veterinary Clinical North American Small Animal Practice**, v.17, n.6, p.1341-1354, 1987.

KATCHER A, FRIEDMAN E. Potential health value of pet ownership. **Veterinary Practices**, v.2, p.117, 1980.

KERRY, B.R. Nematophagus fungi and the regulation of nematode populations in soil. **Helminthological Abstracts**, v.53, p.1-10, 1984.

KERRY, B.R.; SIMON, A.; ROVIRA, A.D. Observations on the introduction of *Verticillium chlamydosporium* and other parasitic fungi into soil for control of the cereal cyst nematode *Heterodera avenae*. **Annals of Applied Biology**, v.105, p.509-516, 1984.

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

KRAMER, J.M. Extracellular matrix. In: RIDDLE, D.L.; BLUMENTHAL, T.; MEYER, B.; PREISS, R. (Eds). **C. elegans II**. Cold Spring Harbor Press, 1997. p.471-500.

LAGAGGIO, V.R.A.; JORGE, L.L.; OLIVEIRA, V.; FLORES, M.L.; DA SILVA, J.H. Avaliação da presença de formas parasitárias em praias do município de Guaíba – RS/Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE

PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2002. Cd-Rom.

LARSEN, M. Biological control of helminths. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.139-146, 1999.

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, 1991.

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

LARSEN, M.; FAEDO, M.; WALLER, P.J. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: survey for the presence of fungi in fresh faeces of grazing livestock in Australia. **Veterinary Parasitology**, v.53, p.275-281, 1994.

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

LARSEN, M.; NANSEN, P.; GRONDAHL, C.; THAMSBORG, S.M.; GRONVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; HENRIKSEN, S.A.; MONRAD, J. The capacity of fungus *Duddingtonia flagrans* to prevent strongyle infections in foals foals on pasture fed to animals under natural grazing conditions. **Parasitology**, v.113, p.1-6, 1996.

LARSEN, M.; NANSEN, P.; GRONVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; HENRIKSEN,

S.A. Biological control of gastro-intestinal nematodes – facts, future, or fiction? **Veterinary Parasitology**, v.72, p.470-492, 1997.

LARSEN, M.; WOLSTRUP, J.; HENRIKSEN, S.A.; GRONVOLD, J.Y.; NANSEN, P. *In vivo* passage of nematophagous fungi selected for biocontrol of parasitic nematodes in ruminants. **Journal of Helminthology**, v.66, p.137-141, 1992.

LIU, X.Z; ZHANG, K.Q. Nematode-trapping species of *Monacrosporium* with special reference to two new species. **Mycological Research**, v.98, n.7, p.862-868, 1994.

LYSEK, H.; NIGENDA, G. Capacidad de autodeshormintización del suelo. **Salud Pública de México**, v.31, p.763-771, 1989.

MANTOVANI A, BATELLI G, ZANETTI R. Problems associated with the coexistence of man and animals in urban areas. **Annali Dell'Instuto Superiori di Sanita**, v.14, p.265-272, 1978.

MCCARTHY, J.; MOORE, T.A. Emerging helminth zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v.30, p.1351-1360, 2000.

MCKELLAR, Q.A. Ecotoxicology and residues of antihelmintic compounds. **Veterinary Parasitology**, v.72, p.413-435, 1997.

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

MENDOZA-DE GIVES, P. **Interaction between nematodes and biocontrol agents with potential for use in biomanagement systems**. United Kingdom:

University of Nottingham, 1999. 219p. Thesis (Doctor of Philosophy) – University of Nottingham, 1999.

MENDOZA-DE GIVES, P.; MEJIA, E.Z.; ROMERO, H.Q.; RODRIGUES, D.H.; PERDOMO, R.F. Interaction between the nematode destroying fungus *Arthrobotrys robusta* (Hyphomycetales) and *Haemonchus contortus* infective larvae *in vitro*. **Veterinary parasitology**, v.41, p.101-107, 1992.

MENDOZA-DE GIVES, P.; VAZQUEZ, P.V.M. Reduction of *Haemonchus contortus* infective larvae by three nematophagous fungi in sheep faecal cultures. **Veterinary Parasitology**, v.55, p.197-203, 1994.

MENDOZA-DE GIVES, P.M.; CRESPO, J.F.; RODRIGUEZ, D.H.; PRATS, V.V.; HERNANDEZ, E.L.; FERNANDEZ, G.E. Biological control of *Haemonchus contortus* infective larvae in ovine faeces by administering an oral suspension of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to sheep. **Journal of Helminthology**, v.72, p.343-347, 1998.

MITTRA, S.; SASMAL, N.K.; SINHA, P.K. Infectivity of *Ancylostoma caninum* in dogs by different routes of inoculation. **Veterinary Parasitology**, n.16, p.289-293, 1984.

MORGAN, M.; BEHNKE, J.M.; LUCAS, J.A.; PEBERDY, J.F. *In vitro* assessment of the influence of nutrition, temperature and larval density on trapping of the infective larvae of *Heligmosomoides polygyrus* by *Arthrobotrys oligospora*, *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium megalosporum*. **Parasitology**, v.115, p.303-310, 1997.

MORGAN-JONES, G.; BEHNKE, J.M.; LUCAS, J.A.; PEBERDY, J.F. *In vitro* assessment of the influence of nutrition, temperature and larval density on trapping of the infective larvae of *Heligmosomoides polygyrus* by *Arthrobotrys oligospora*, *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium megalosporum*.

**Parasitology**, v.115, n.3, p.303-310, 1997.

MORGAN-JONES, G.; RODRIGUES-KABANA, R. Infections events in the fungus nematode system. In: POINAR O.G.; BORNE J.H. (Eds.) **Diseases of Nematodes**. Florida: CRC Press, Boca Raton, 1988. p.59-62.

MORGAN-JONES, G.; RODRIGUEZ-KABANA, R. Fungal biocontrol for the management of nematodes. In: VEECH, J.A.; DICKSON, D.W. (Eds.). **Vistas on Nematology**. Maryland, 1987. p. 94-99.

MOTA, M.A., CAMPOS, A.K.; ARAÚJO, J.V. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.23, n.3, p.93-100, 2003.

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

MOTTA, M.A.; CAMPOS, A.K.; ARAÚJO, J.V. Sporulation, radial growth and biomass production of *A. robusta* and *M. thaumasium* submitted to different methods of preservation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n.2, p. 157-160, 2003.

MURADIAN, V.; PINHEIRO, S.R.; GENNARI, S.M.; YAI, L.E.O.; DAMACENO, J.T.; CORTEZ, I.; GLICKMAN, L.T. Frequência de agentes etiológicos da larva migrans em amostras de solo de áreas da comunidade São Remo, São Paulo (SP), Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2002. CD-ROM.

NANSEN, P.; FOLDAGER, J.; HANSEN, J.W.; HENRIKSEN, S.A.;

JORGENSEN, R.J. Grazing and acquisition of *Ostertagia ostertagi* in calves. **International Journal for Parasitology**, v.27, p.325-335, 1988a.

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

NANSEN, P.; GRONVOLD, J.; HENRIKSEN, S.A.; WOLSTRUP, J. Predaceous activity of the nematode-destroying fungus *Arthrobotrys oligospora* on preparasitic larvae of *Cooperia oncophora* and on soil nematodes. **Proceedings on Nematology**, v.53, p.237-243, 1986.

NANSEN, P.; LARSEN, M.; ROEPSTORFF, A.; GRONVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; HENRIKSEN, S.A. Control of *Oesophagostomum dentatum* and *Hyostromylus rubidus* in outdoor-reared pigs by daily feeding with the microfungus *Duddingtonia flagrans*. **Parasitology Research**, v.82, p.580-584, 1996.

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

NEVES, D.P. **Parasitologia humana**. 9 ed. São Paulo: Atheneu, 1998. 524 p.

NORDBRING-HERTZ, B. Nematophagus fungi: strategies for nematode exploitation and for survival. **Microbiology Science**, v.5, p.108-168, 1988.

NORDBRING-HERTZ, B.; JANSSON, H.B. Fungal development, predacity, and recognition of prey in nematode-destroying fungi. In: KLUG, M.J.; REDDY, C.A. **Current perspectives in microbial ecology**. Washington: American Society for Microbiology, 1984. p.327-333.

NORDBRING-HERTZ, B.; STALHAMMAR, C.M. Capture of nematode by *Arthrobotrys oligospora* an electron microscope study. **Canadian Journal of Botanic**, v.56, p.1297-1307, 1978.

OLIVEIRA, C.R.; SICILIANO, S.; ARAÚJO, J.V.; MUJICA, F.; RODRIGUES, M.L.A. Avaliação da passagem do fungo *Monacrosporium thaumasium* pelo trato gastrointestinal de eqüinos. **Ciência Animal**, v.12, n.2, p.133-137, 2002.

PADILHA, T. Atividade de fungos nematófagos nos estádios pré-parasitários de nematóides trichostrongilídeos. **Ciência Rural**, v.26, n.2, p.333-341, 1996.

PADILHA, T.; MENDOZA-DE GIVES, P. Controle microbiano das formas de vida livre dos nematóides trichostrongilídeos: uma alternativa para higienização das pastagens. In: PADILHA, T. **Controle dos nematódeos gastrintestinais em ruminantes**. EMBRAPA/CNPGL, 1996. 258p.

PELOILLE, M. Selection of nematode-trapping for use in biological control. In: KERRY, B.R.; CRUMP, D.H. (Eds.). **Methods for studying nematophagus fungi**. Bulletin of the Organisation Internationale de Lute Biologique et Integree Contre Les Animaux et les Plantes Nuisibles. London: IOBC/WPRS, 1991. p.13-17.

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

PINHEIRO, A.Q.; MOREIRA, J.L.B.; SIDRIM, J.J.C. Dermatofitoses no meio urbano e a coexistência do ser humano com cães e gatos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.30, n.4, p.287-294, 1997.

PRAMER, D. Nematode-trapping fungi. An intriguing group of carnivorous

plants inhabit the microbial world. **Science**, v.144, p.382-388, 1964.

PROCIV, P.; CROESE, J. Human enteric infection with *Ancylostoma caninum*: hookworms reappraised in the light of a “new” zoonosis. **Acta Tropica**, v.62, p.23-44, 1996.

PROCIV, P.; CROESE, J. Human eosinophilic enteritis caused by dog hookworm *Ancylostoma caninum*. **The Lancet**, v.335, n.2, p.1299-1302, 1990.

RIBEIRO JÚNIOR, J.I. **Análises estatísticas no SAEG**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa – UFV, 2001. 301p.

RIBEIRO, R.R. **Atividade predatória sobre larvas de trichostrongilídeos de isolados fúngicos do gênero *Monacrosporium* após a passagem pelo trato gastrointestinal de bovinos**. Viçosa: UFV, 2003. 46p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, 2003.

RIBEIRO, V.M. Controle de helmintos de cães e gatos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, n.1, p.88-95. 2004.

ROBERTSON, I.D.; EDWARDS, J.R.; SHAW, S.E.; CLARK, W.T. A survey of pet ownership in Perth. **Australian Veterinary Practitioner**, v.20, p.210-213, 1990.

ROBERTSON, I.D.; IRWIN, P.J.; LYMBERY, A.J.; THOMPSON, R.C.A. The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v.30, p.1369-1377, 2000.

ROBERTSON, I.D.; THOMSON, R.C. Enteric parasitic zoonoses of domesticated dogs and cats. **Microbes and Infection**, v.4, p.867-873, 2002.

SANTARÉM, V.A.; SARTOR, I.F.; BERGAMO, F.M.M. Contaminação por ovos de *Toxocara* sp. de parques e praças públicas de Botucatu, São Paulo,

Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.31, n.6, p.529-532, 1998.

SANTOS, C.P.; CHARLES, T.P. Seleção de fungos resistentes à passagem pelo trato digestivo de ruminantes. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, IX, Campo Grande. **Resumo...** Campo Grande: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1995.

SANTOS, C.P.; CHARLES, T.P.; RODRIGUES, M.L.A. Atividade predatória de *Arthrobotrys oligospora* e *Duddingtonia flagrans* em estádios pré-parasitários de ciatostomíneos em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.4, p.113-117, 1995.

SANTOS, M.A.; FERRAZ, S.; MUCHOVEJ, J. Detection and ecology of nematophagous fungi from Brazilian soils. **Nematologia Brasileira**, v.15, n.2, p.121-134, 1991.

SAXENA, G.; DAYAL, R.; MUKERJI, K.G. Nutritional studies on nematode-trapping fungi. **Folia Microbiologica**, v.34, p.42-48, 1989.

SAXENA, G.; MITTAL, N. Trap formation by conidia of nematode-trapping *Monacrosporium* spp. **Mycology Research**, v.7, p.839-840, 1995.

SCAINI, C.J.; DIONELLO, M.A; GATTI, F.A *et al.* Contaminação ambiental por fezes de cães na área central do balneário do Cassino, cidade de Rio Grande, RS. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, XII, 2002, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro – RJ, 01-05 de setembro de 2002, Cd-Rom.

SCHANTZ, P.M. Parasitic zoonoses in perspective. **International Journal for Parasitology**, v.21, p.161-170, 1991.

SCHOLLER, M.; RUBNER, A. Predacious activity of the nematode-destroying fungus *Arthrobotrys oligospora* in dependence of the medium composition. **Microbiological Research**, v.149, p.145-149, 1994.

SEGBERS, R.; BUTT, M.T.; KERRY, R.B.; BECKETT, A.; PEBERDY, J.F. The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* produces a chymoelastase-like protease which hydrolyses host nematode proteins *in situ*. **Microbiology**, v.140, p.2715-2723, 1994.

SIVBERG, N.B.; JACKSON, R.M.; LAUDE T.A.; TUNNESSEN, W.W. Picture of the Month. **Archives of Family Medicine**, v.7, p.403-406, 1998.

SONTIRAT, S. Relationship between infection efficiency and enzymatic activity of *Paecilomyces lilacinus*. **Kasetsart Journal Natural Sciences**, v.30, p.175-184, 1996.

SOULSBY, E.J.L. **Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals**. 7<sup>th</sup> ed. Baillière Tindall, London, 1982. 806p.

SPIEGEL, Y.; MCCLURE, A.M. The surface coat of plant-parasitic nematodes: chemical composition, origin, and biological role – a review. **Journal of Nematology**, v.27, p.127-134, 1995.

STIRLING, G.R.; MANKAU, R. Parasitism of *Meloidogyne* eggs by a new fungal parasite. **Journal of Nematology**, v.10, p.236-240, 1978.

SUBRAMANIAN, C.V. *Dactylella*, *Monacrosporium* and *Dactylina*. **Journal of the Indian Botanical Society**, v.42, p.291-300, 1963.

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

THOMAS, S.H.; SENGUPTA, G.C.; ALVAREZ, M.E.; KUEHN, G.D.; KEMP, J.D. Effects of collagenase from a nematode-trapping fungus on *Pratylenchus scribneri*. **Journal of Nematology**, v.20, p.661, 1988.

THOMPSON, R.C.A. Veterinary Parasitology: Looking to the next millennium. **Parasitology Today**, v.15, p.320-325, 1999.

TUNLID, A.; JANSON, S. Proteases and their involvement in the infection and immobilization of nematodes by the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.2868-2872, 1991.

TUNLID, A.; JOHANSSON, T.; NORBRING, H.B. Surface polymers of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. **Journal of General Microbiology**, v.137, p.1231-1240, 1991.

UENO, H.; GONÇALVES, P.C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. Salvador: Japan International Cooperation Agency, 1998. 143 p.

ULLOA, M.; HANLIN, R. **Atlas de micología básica**. 1 ed. México: Editorial PAX, 1992. 158p.

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

VEENHUIS, M.; NORDBRING, H.B.; HARDER, W. An electron microscopical analysis of capture and initial stages of penetration of nematodes by *Arthrobotrys oligospora*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.51, p.385-398, 1985.

WALLER, P.J. Towards sustainable nematode parasite control of livestock. **Veterinary Parasitology**, v.48, n.1-4, p.295-309, 1993.

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

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

WALLER, P.J.; KNOX, N.R.; FAEDO, M. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematodes parasites of sheep: feed and block studies with *Duddingtonia flagrans*. **Veterinary Parasitology**, v.102, p.321-330, 2001.

WALLER, P.J.; LARSEN, M. The role of nematophagous fungi in the biological control of nematode parasites of livestock. **International Journal for Parasitology**, v.23, n.8, p.539-546, 1993.

WILLIS, H.H., A simple levitorion method for the detection of hookworm ova. **The Medical Journal of Austrália**, v.8, p.375-376, 1927.

WOLSTRUP, J.; GRONVOLD, J.; HENRIKSEN, S.A.; NANSEN, P.; LARSEN, M.; BOGH, O.; ILOE, B. An attempt to implement the nematode-destroying fungus *Duddingtonia flagrans* in biological control of trichostrongyle infections of first grazing calves. **Journal of Helminthology**, v.68, p.175-180, 1994.

WONG, S.K.; FEINSTEIN, L.H.; HEIDMANN, P. **Journal American of Veterinary Medical Association**, v.215, p.335-338, 1999.

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

548, 1997.

YUEN, V.H.; CHANG, T.S.; HOOPER, P.L. Diffuse unilateral subacute neuroretinitis syndrome in Canada. **Archives of Ophthalmology**, v.114, p.1279-1282, 1996.

ZHANG, K.; LIU, X.; CAO, L.; REN-HEN, G. A new species of *Arthrobotrys* from China. **Mycology Research**, v.100, p.527-530, 1996.

## ANEXOS

Tabela 1 – Análise de variância da média de larvas infectantes (L<sub>3</sub>) não predadas de *Ancylostoma* spp. por campo de 4 mm de diâmetro em meio AA 2% observados nos grupos durante um período de 10 dias.

| Fonte de Variação        | Graus de Liberdade | Quadrados Médios |
|--------------------------|--------------------|------------------|
| <b>Tratamentos (T)</b>   | 3                  | 417,95**         |
| <b>Resíduo (a)</b>       | 36                 | 49,74            |
| <b>Dias (D)</b>          | 9                  | 257,29**         |
| <b>T x D</b>             | 27                 | 22,95*           |
| <b>Resíduo (b)</b>       | 324                | 179,03           |
| <b>CV (%) Parcela</b>    |                    | 145,29           |
| <b>CV (%) Subparcela</b> |                    | 38,71            |

\*\* = F significativo em nível de 1% de probabilidade.

\* = F significativo em nível de 5% de probabilidade

Tabela 3 – Análise de variância da média de larvas infectantes (L<sub>3</sub>) de *Ancylostoma* spp. recuperadas do meio AA 2% pelo método de Baermann no décimo dia dos tratamentos após interação com os isolados fúngicos de *Arthrobotrys robusta* (I31), *Duddingtonia flagrans* (CG768) e *Monacrosporium thaumasium* (NF34A) e do controle sem fungos.

| Fonte de variação                   | Graus de liberdade | Quadrados médios |
|-------------------------------------|--------------------|------------------|
| <b>Tratamentos</b>                  | 3                  | 1.693.667*       |
| <b>Resíduo</b>                      | 36                 | 3910,49          |
| <b>Coefficiente de Variação (%)</b> |                    | 22,74            |

\* = F significativo em nível de 5% de probabilidade

Tabela 4 – Análise de variância da média de larvas infectantes (L<sub>3</sub>) de *Ancylostoma* spp. recuperadas pelo método de Baermann no décimo dia das coproculturas dos tratamentos após interação com os isolados fúngicos de *Arthrobotrys robusta* (I31), *Duddingtonia flagrans* (CG768) e *Monacrosporium thaumasium* (NF34A) e do controle sem fungos.

| Fonte de variação | Graus de Liberdade | Quadrados médios          |
|-------------------|--------------------|---------------------------|
| Tratamentos       | 3                  | 0,2106158 <sup>n.s.</sup> |
| Resíduo           | 36                 | 0,2192397                 |
| CV (%)            |                    | 51,41                     |

n.s. = F não significativo em nível de 5% de probabilidade

Tabela 5 – Análise de variância da média de conídios produzidos pelos isolados fúngicos de *Arthrobotrys robusta* (I31), *Duddingtonia flagrans* (CG768) e *Monacrosporium thaumasium* (NF34A) nos meios AA 2%, batata-dextrose-ágar 2% (BDA 2%), corn-meal-agar 2% (CMA 2%) e yeast-phosphate-sulphate-sacarose-agar (YPSSA).

| Fonte de Variação | Graus de Liberdade | Quadrados Médios                |
|-------------------|--------------------|---------------------------------|
| Fungo (F)         | 2                  | 0,1550601 x 10 <sup>15**</sup>  |
| Meio (M)          | 3                  | 0,07802263 x 10 <sup>15**</sup> |
| F x M             | 6                  | 0,02953162 x 10 <sup>15**</sup> |
| Resíduo           | 60                 | 0,5252115 x 10 <sup>15**</sup>  |
| CV (%)            |                    | 25,07                           |

\*\* = F significativo em nível de 1% de probabilidade