

ISABELA DE CASTRO OLIVEIRA

**CONTROLE BIOLÓGICO DE NEMATOIDES GASTRINTESTINAIS DE BOVINOS
ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DO FUNGO NEMATÓFAGO *Arthrobotrys cladodes***

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

Oliveira, Isabela de Castro, 1989-
O48c Controle biológico de nematoides gastrintestinais de
2017 bovinos através da utilização do fungo nematófago *Arthrobotrys*
 cladodes / Isabela de Castro Oliveira. – Viçosa, MG, 2017.
 viii, 51f. : il. ; 29 cm.

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

1. Bovino - Doença. 2. *Arthrobotrys*. 3. Fungos
nematófagos. 4. Ruminantes. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Veterinária. Programa de Pós-graduação em
Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22 ed. 636.2089696

ISABELA DE CASTRO OLIVEIRA

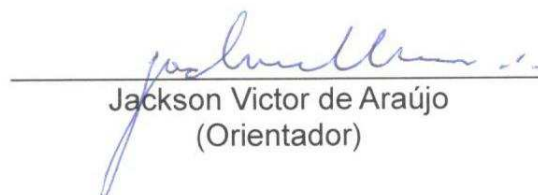
CONTROLE BIOLÓGICO DE NEMATOIDES GASTRINTESTINAIS DE
BOVINOS ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DO FUNGO NEMATÓFAGO
Arthrobotrys cladodes

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

APROVADA: 18 de julho de 2017.


Juliana Mitani de Araujo


Artur Kanadani Campos


Jackson Victor de Araújo
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo na vida!

A professora Mariana Fausto pelo incentivo de realizar a pós-graduação.

À Universidade Federal de Viçosa pela estrutura disponibilizada.

Ao Professor Jackson pela orientação e confiança.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos.

Ao meu pai pela disposição e tão boa vontade.

A minha mãe por todo carinho e esforço para tornar minha jornada tranquila.

A minha irmã por sempre querer me ajudar.

A minha avó pelas tantas orações e por me fazer acreditar que posso tudo. E a todos os outros familiares que estão sempre torcendo por mim.

Ao Professor Artur por todos os conselhos e atenção com meu trabalho.

A Bruna Torres pela amizade. A Lorem pela paciência e por estar sempre disposta a me ajudar. Ao Tuim por todo o auxílio que permitiu a realização do experimento e pelos bons momentos. Ao Samuel pela colaboração e credibilidade. Ao Cauzim e Ademir pela enorme atenção. Ao Ítalo pela disponibilidade e eficiência. A Cristiana pela companhia. Ao Guilherme pelas conversas. A Marisa, Guedes, Wendeo e Juliana pelas sugestões.

Aos estagiários do laboratório de parasitologia pela colaboração e por me divertirem tanto.

As funcionárias do departamento de Veterinária Rosi e Bel por todos os bons dias e por vibrarem com minhas conquistas.

SUMÁRIO

Resumo	v
Abstract	vii
1 Introdução	1
2 Revisão Bibliográfica	2
2.1 Bovinocultura	2
2.2 Sanidade do rebanho	2
2.3 Helmintoses gastrintestinais	3
2.4 Controle biológico	4
2.5 Fungos nematófagos	5
Referências	6
3 Objetivos	12
Capítulo 1: Fungo <i>Arthrobotrys cladodes</i> var. <i>macroides</i> como estratégia sustentável na redução de larvas infectantes de nematoides parasitas gastrintestinais de bovinos	13
Resumo	14
1 Introdução	15
2 Material e Métodos	16
2.1 Organismos	16
2.2 Avaliação da atividade do fungo <i>Arthrobotrys cladodes</i> sobre larvas infectantes de nematoides gastrintestinais	16
2.3 Avaliação da atividade do fungo <i>Arthrobotrys cladodes</i> após passagem pelo trato gastrintestinal de bovinos	18
2.4 Análises estatísticas	19
3 Resultados	19
4 Discussão	24
Agradecimentos	27
Referências	27
Capítulo 2: Efeito do fungo <i>Arthrobotrys cladodes</i> var. <i>macroides</i> na redução da infestação por larvas de nematoides gastrintestinais de bovinos na pastagem	31
Resumo	32

1 Introdução	33
2 Material e Métodos	34
2.1 Fungo	34
2.2 Ensaio experimental <i>in vivo</i>	34
2.3 Colheita e processamento do material fecal	35
2.4 Amostra de pasto	35
2.5 Ganho de peso dos animais	36
2.6 Dados climáticos	36
2.7 Isolamento e identificação de fungos nematófagos	36
2.8 Análise estatística	37
3 Resultados	37
4 Discussão	42
Agradecimentos	46
Referências	47
4 Conclusões gerais	51

RESUMO

OLIVEIRA, Isabela de Castro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Controle biológico de nematoides gastrintestinais de bovinos através da utilização do fungo nematófago *Arthrobotrys cladodes***. Orientador: Jackson Victor de Araújo.

A cada ano, a participação brasileira no comércio internacional vem crescendo, com destaque para a produção de carne bovina. As doenças parasitárias, principalmente as causadas por endoparasitas ocupam lugar de destaque dentre os fatores que interferem no desenvolvimento pleno da produção animal. Dentre as alternativas promissoras para o combate não químico de parasitos, pode-se destacar a utilização do controle biológico feito através de fungos nematófagos. O potencial antagônico do fungo *Arthrobotrys cladodes* var. *macroides* sobre larvas infectantes de nematoides parasitas gastrintestinais de bovinos foi avaliado por meio de microscopia eletrônica de varredura e foi realizado teste in vivo da resistência e viabilidade do fungo em uma formulação a base de alginato de sódio a passagem por via oral de bovinos. O fungo estudado apresentou alta produção de conídios e clamidósporos. Em teste de interação do fungo com os nematoides foi observada uma redução de 68,65% das larvas infectantes de nematóides nas placas de Petri do grupo tratado, em comparação com o controle. Sendo que a interação entre o fungo e os nematoides foi confirmada pela microscopia eletrônica de varredura. A observação das placas contendo as amostras de fezes coletadas após uma administração única por via oral de 100 gramas de péletes contendo o fungo *A. cladodes* mostrou que o mesmo foi capaz de sobreviver à passagem pelo trato gastrintestinal de ruminantes, crescer sobre o ágar, formar armadilhas e predação as larvas de terceiro estágio de parasitas gastrointestinais. Com o objetivo de avaliar a eficácia do fungo nematófago *Arthrobotrys cladodes* var. *macroides* no controle biológico de nematoides gastrintestinais de bovinos, doze bovinos mestiços holandês x zebu com sete a nove meses de idade, foram divididos aleatoriamente em dois grupos (grupo tratado e grupo controle) e distribuídos em piquetes de *Brachiaria decumbens*, naturalmente infestados com larvas de helmintos. Os animais do grupo tratado receberam 1g de pélete em matriz de alginato de sódio para cada 10 kg de peso vivo animal, contendo o fungo *Arthrobotrys cladodes* var. *macroides* administrados duas vezes por semana conjuntamente com ração

comercial. Já no grupo controle cada animal recebeu 1 g de pélete para cada 10 kg de peso vivo animal, sem micélio fúngico adicionado a ração. Amostras de fezes e pastagens foram coletadas quinzenalmente durante 12 meses. Os gêneros de nematoides mais prevalentes nas coproculturas foram *Haemonchus* sp., *Cooperia* sp. e *Oesophagostomum* sp. refletindo os resultados encontrados na forragem. A pastagem que continha os animais que receberam tratamento com o fungo apresentou redução de 59% e 52% de larvas recuperadas nas distâncias de 20cm e 40cm do bolo fecal, respectivamente . As médias mensais de ovos por grama de fezes e peso não diferiram significativamente ($p>0,05$) entre o grupo tratado e controle. Amostras de fezes e solo de ambos os grupos foram colonizadas pelo fungo *A. cladodes* e por outros fungos. A administração do micélio de *Arthrobotrys cladodes var macroides* por meio de matriz de alginato de sódio, duas vezes na semana, diminuiu a infestação de larvas na pastagem, indicando que esse fungo pode ser um controlador biológico promissor no combate das formas infectantes de nematoides presentes no meio ambiente.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Isabela de Castro, M.Sc., Federal University of Viçosa, July, 2017. **Biological control of gastrointestinal nematodes of cattle using the nematophagous fungi *Arthrobotrys cladodes***. Adviser: Jackson Victor de Araújo.

Every year, Brazilian participation in international trade has been increasing, with emphasis on beef production. The parasitic diseases, especially those caused by endoparasites occupy a prominent place among the factors that interfere in the full development of animal production. Among the promising alternatives for the non-chemical control of parasites, one can highlight the use of biological control made by nematophagous fungi. The antagonistic potential of the fungus *Arthrobotrys cladodes* var. *macroides* on infective larvae of bovine gastrointestinal parasitic nematodes was evaluated by scanning electron microscopy and an in vivo test of the resistance and viability of the fungus in a formulation based on sodium alginate was carried out orally by bovines. The fungus studied showed high production of conidia and chlamydozoospores. In a test of interaction of the fungus with the nematodes, a 68.65% reduction of the nematode infecting larvae in the Petri dishes of the treated group was observed, in comparison with the control. The interaction between the fungus and the nematodes was confirmed by scanning electron microscopy. Observation of plates containing feces collected after oral administration of 100 grams of pellets containing the *A. cladodes* fungus showed that it was able to survive passage through the gastrointestinal tract of ruminants, grow on the agar, form traps and predatory larvae of the third stage of gastrointestinal parasites. In order to evaluate the efficacy of the nematophagous fungus *A. cladodes* var. *macroides* of the bovine gastrointestinal nematodes, twelve crossbred Dutch - zebu cattle with seven to nine months of age were randomly divided into two groups (treated group and control group) and distributed in *Brachiaria decumbens* pickets, naturally infested with larvae of helminths. The animals in the treated group received 1g of sodium alginate matrix pellet for every 10 kg of animal live weight containing the fungus *A. cladodes* var. *macroides* administered twice a week in conjunction with commercial feed. In the control group, each animal received 1 g of pellet for every 10 kg of animal live weight, without fungal mycelium added to the feed. Samples of feces and pastures were collected biweekly for 12 months. The most prevalent nematode genera in the coprocultures were *Haemonchus* sp., *Cooperia* sp. and *Oesophagostomum* sp.

reflecting the results found in forage. The pasture that contained the animals that received treatment with the fungus presented reduction of 59% and 52% of larvae recovered at distances of 20cm and 40cm of the fecal mass, respectively. The mean monthly egg per gram stool and weight did not differ significantly ($p > 0.05$) between the treated and control groups. Feces and soil samples from both groups were colonized by the fungus *A. cladodes* and by other fungi. Administration of the mycelium of *Arthrobotrys cladodes* var *macroides* by means of a sodium alginate matrix twice weekly reduced the infestation of larvae in the pasture, indicating that this fungus may be a promising biological controller in the control of the nematode infecting forms present in the environment.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil se consolidou na última década como uma potência na exportação de carne bovina (ABIEC, 2015). Pastejo contínuo em grandes extensões de pastagens é o principal sistema de criação do rebanho (Charlie et al, 2014), o que causa constantes infecções pelos parasitos presentes nas pastagens (Dias et al., 2007).

O prejuízo causado por endoparasitismo é considerável e entre os fatores que interferem no desenvolvimento pleno da atividade pecuária, as helmintíases gastrintestinais ocupam lugar de destaque, na produtividade de bovinos, sendo a infecção por nematóides a principal causa de perdas econômicas em todo mundo. Tais perdas estão associadas a efeitos fisiopatológicos nos animais, com consequente diminuição no ganho de peso; alterações na condição corporal; redução na conversão alimentar; no desempenho reprodutivo dos animais e, ainda, no aumento da mortalidade, principalmente entre animais jovens (Stromberg et al., 2012).

A principal medida de controle dos nematoides gastrintestinais é o uso regular de anti-helmínticos (Molento et al., 2005; Mendoza-de-Gives e Torres-Acosta, 2012). Mas seu uso quase que exclusivo tem resultado em populações de nematoides resistentes a múltiplas classes de anti-helmínticos, e isto tem contribuído para que as pastagens estejam na maioria das vezes contaminadas por nematoides (Sangster, 1999; Coles et al., 2006).

A redução do número de larvas infectantes na pastagem é um dos objetivos do controle das verminoses dos bovinos. A resistência aos princípios ativos anti-helmínticos, a existência de resíduos na carne e a ecotoxicidade de alguns compostos despertaram o interesse em controlar as nematodioses gastrintestinais por meio de práticas que interfiram na infestação das pastagens e que contribuam para o menor uso de anti-helmínticos (Araújo, 1996).

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

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bovinocultura

A criação de gado para produção de carne é uma das atividades agrícolas mais importantes do Brasil. O rebanho brasileiro é o maior rebanho comercial do mundo. O clima tropical e a extensão territorial do país contribuem para esse resultado, uma vez que permitem a criação da maioria do gado em pastagens. São aproximadamente 211 milhões cabeças ocupando 170 milhões de hectares de pastagens (IBGE, 2015), levando a uma taxa de ocupação média de 1,24 cabeças / ha. Desde 2004 o Brasil, assumiu a liderança nas exportações, com um quinto da carne comercializada internacionalmente e vendas em mais de 180 países. As exportações brasileiras de carne bovina representarão cerca de 60% do comércio mundial em 2018/2019 (MAPA, 2015).

Em relação ao cenário mundial, Charlie e colaboradores (2014) citam a necessidade da expansão da produção de carne para atender às demandas da população, prevista de 7,2 bilhões atuais para 9,6 bilhões em 2050.

De acordo com a Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (2015) a carne bovina proveniente de animais criados a pasto tem sido cotada como uma das mais nutritivas. Várias pesquisas concluíram que o produto contém concentrações elevadas de betacaroteno e α -tocoferol, níveis maiores de ácidos graxos, proporção maior e mais desejável de Omega-3, Omega-6, e níveis altos de ácido linoleico conjugado, todas estas substâncias sabidamente de efeitos favoráveis à saúde humana.

2.2 Sanidade do rebanho

Uma contribuição importante para alcançar êxito na produção deve vir de uma melhor gestão da saúde animal, que tem um grande impacto na eficiência da pecuária (Charlie et al., 2014). Segundo dados da FAO (2015) 20% das perdas em produtividade animal são devidas às doenças infectocontagiosas e dentre elas as parasitoses ocupam lugar de destaque. Os parasitos internos e externos são considerados as principais causas de perdas econômicas na América Latina e em outras regiões tropicais e subtropicais do mundo (Molento et al., 2013).

A maioria dos ruminantes de pastagem está infectada por uma variedade de helmintos parasitas que impactam negativamente no consumo de ração, taxa de crescimento, peso de carcaça, composição da carcaça, fertilidade e produção de

leite (Charlie et al., 2014). Grisi et al. (2014) relataram que as perdas econômicas causadas pelos nematóides gastrintestinais de bovinos no Brasil são de \$7,11 bilhões.

2.3 Helmintoses gastrintestinais

Helmintoses gastrintestinais estão relacionadas com o número e espécies de larvas as quais o animal é exposto, e à quantidade de parasitos que se estabelecem em seu trato gastrintestinal (Campos, 2006). Esse problema é agravado à medida que pioram as condições das pastagens, principalmente na época da seca ou quando se verifica o aumento da concentração de animais em certas áreas, facilitando a infecção.

Cooperia, *Haemonchus* e *Oesophagostomum* são os gêneros de nematoides parasitos gastrintestinais mais prevalentes em bovinos, no sudeste brasileiro conforme verificado por Araújo (1998). O ciclo destes organismos inicia com a deposição dos ovos no meio ambiente através das fezes, onde desenvolvem as larvas infectantes, que depois passam para a forragem. As larvas são ingeridas pelo hospedeiro durante a pastagem e completam seu ciclo de vida.

O desenvolvimento, a sobrevivência e o comportamento dos estágios de vida livre e, portanto, a disponibilidade de estágios infectantes para a transmissão é altamente dependente das condições meteorológicas (Dijk et al., 2010; Cooper et al., 2015; Rose et al., 2015). No Brasil existem condições para a sobrevivência das larvas de nematoides nas pastagens, mesmo em áreas mais secas ou chuvosas, pois, durante todo o ano, o bolo fecal funciona como um reservatório de larvas. As larvas abandonam as massas fecais por meio de trajetórias horizontais e verticais, onde, por meio destas migrações, as mesmas podem alcançar a parte da vegetação que será ingerida pelo hospedeiro, e assim dar continuidade ao seu ciclo evolutivo (Santos et al., 2012).

Táticas tradicionais de controle baseiam-se principalmente na aplicação de anti-helmínticos, atualmente representado por três principais classes de medicamentos: as lactonas macrocíclicas, as pirimidinas e imidatiázóis e o grupo dos benzimidazóis (Kaplan e Vidyashankar, 2012; Cooper et al., 2015). O uso de compostos antiparasitários químicos é prático, tem ótima relação custo-benefício e é de fácil aquisição. Porém, estes produtos muitas vezes são utilizados erroneamente, de forma preventiva ou supressiva, de maneira indiscriminada e sem a associação

de estratégias de controle adequadas, deixando resíduos de produtos no animal tratado, afetando organismos não alvos e selecionando cepas resistentes dos parasitas (Braga e Araújo, 2014).

Nas últimas décadas, a pecuária tem sido associada com muitos problemas ambientais globais, como o desmatamento, mudanças climáticas, poluição da água e a perda de biodiversidade. O setor de carne bovina brasileira tem estado sob pressão constante da comunidade internacional para atender aos padrões internacionais de sustentabilidade (Cerri et al., 2015).

Um programa de controle e profilaxia deve basear-se sempre em conhecimentos sobre epidemiologia e ciclo de vida dos helmintos prevalentes na região e do impacto da doença e valorização dos custos e benefícios que advêm do seu combate (Fitzpatrick, 2013). Assim, algumas alternativas, não químicas, como a rotação de pastagem, definição de cruzamentos raciais, seleção de animais geneticamente resistentes às infecções por parasitos e o aumento da imunidade pela nutrição adequada são práticas de manejo importantes para programas integrados e sustentáveis de controle de parasitos (Kaplan e Vidyashankar, 2012; Leathwick et al., 2015). Medidas inovadoras de controle parasitário precisam ser instituídas para que a resistência anti-helmíntica seja desacelerada, e as drogas que ainda possuem eficácia sejam preservadas por um período prolongado, visando desta maneira, reduzir a dependência e o uso indiscriminado de anti-helmínticos (Fitzpatrick, 2013; Leathwick et al., 2015).

2.4 Controle biológico

O controle biológico é um método ecológico em que ocorre a diminuição de uma população parasitária para níveis subclínicos aceitáveis e para manutenção dos índices produtivos em limiar econômico, através da utilização de um antagonista natural. Na prática, o controle biológico não atua sobre estágios internos de parasitos, contudo concentra suas ações sobre os hospedeiros intermediários, paratênicos, de transporte, vetores e estágios larvais de vida livre, diminuindo a fonte de infecção para os hospedeiros finais. Os microorganismos selecionados como antagonistas naturais devem ser eficiente em reduzir populações do patógeno, ser de fácil manipulação em laboratório, não ser patogênico a seres humanos e animais, sobreviver no solo em condições adversas, ser fácil de produzir em massa e de baixo custo (Grønvold et al., 1996; Ferraz et al., 2010).

Antagonistas naturais de helmintos, incluindo protozoários, bactérias, vírus, ácaros, fungos e besouros, podem atuar no controle biológico (Grønbold et al., 1996), mas os fungos nematófagos, como um controle alternativo, tem sido constantemente testados, com resultados satisfatórios, tanto no campo e em condições de laboratório (Braga e Araújo, 2014).

2.5 Fungos nematófagos

Os fungos nematófagos são encontrados na maioria dos táxons fúngicos, incluindo Ascomycetes (Orbiliaceae assexuada e Clavicipitaceae), Basidiomycetes (Pleurotaceae), Zygomycetes (Zoopagales), Chytridiomycetes e Oomycetes. Eles são amplamente distribuídos no ambiente e podem se reproduzir em quase todos os tipos de solo devido aos poucos requisitos nutricionais e vitamínicos. Foi proposto que o fenótipo de captura de nematóides seja uma resposta evolutiva dos fungos às deficiências nutricionais em habitats limitantes de nitrogênio. Como o nitrogênio é essencial para o crescimento de fungos e não está disponível livremente no solo onde o carbono é abundante, a captura direta de compostos de nitrogênio de outras formas vivas é uma vantagem (Zhang e Hyde 2014).

Estes fungos atuam na fase de vida livre dos parasitos e uma maneira para que eles sejam dispersos no bolo fecal seria pela sua ingestão. Assim o fungo seria disseminado juntamente ao bolo e onde ocorre o desenvolvimento de ovos e larvas de nematoides. Para que o fungo chegue ao bolo fecal, ele também deve resistir ao estresse da passagem pelo trato gastrintestinal, e assim chegar viável às fezes para predação de nematoides (Larsen et al., 1992). Em relação ao impacto ambiental pelo uso de fungos nematófagos, experimentos com animais criados em pastagens demonstraram que não ocorre mudança na constituição da fauna natural de nematoides do solo (Yeates e King, 1997).

De acordo com seu modo de ação, esses fungos são divididos em três grupos: fungos endoparasitas, oportunistas (ou ovicidas) e predadores (Braga e Araújo, 2014).

Fungos predadores são os mais pesquisados no controle biológico de nematoides que parasitam o gado. Esses fungos produzem estruturas em forma de anéis constritores e não constritores, hifas, botões e redes tridimensionais adesivas ao longo do micélio com a função de capturar os nematoides. A formação dessas armadilhas ocorre em resposta à presença do nematóide ou suas excretas, de

compostos biológicos ou ainda, é induzida por condições de estresse fisiológico, como na escassez de nutrientes e água. Dessa forma, as hifas conseguem penetrar na cutícula do nematoide, se desenvolvem e digerem os conteúdos internos dos parasitos. Além disso, apresentam maior potencial para industrialização (Braga e Araújo, 2014).

O desenvolvimento de formulações fúngicas por meio de matriz de alginato de sódio tem se mostrado uma boa alternativa de veiculação e administração de fungos (Assis et al., 2012). No Brasil, bons resultados em condições laboratoriais e a campo (Assis et al., 2013) têm sido obtidos com esta formulação, onde foi observada a sobrevivência dos fungos nos péletes à temperatura de 4°C por até 40 meses, e à temperatura ambiente por aproximadamente 4 meses (Stirling e Mani, 1995), o que torna esta formulação bastante promissora.

A maioria das espécies do gênero *Arthrobotrys* produzem armadilhas do tipo redes tridimensionais que promovem a adesão, imobilização, penetração e consequentemente destruição das larvas (Nordbring-Hertz et al., 2006). As espécies pertencentes a este gênero possuem conidióforos eretos, podendo ter em sua extremidade até seis conídios de formato ovóide e com até três septos (Mota et al., 2003). Estudos realizados com isolados pertencentes a esse gênero demonstraram sua capacidade de destruição da população de larvas de diferentes parasitos. Araújo et al. (1998) em um trabalho com bovinos, em condições experimentais de campo, demonstraram que a administração oral de conídios do fungo nematófago, *Arthrobotrys robusta*, duas vezes por semana, durante quatro meses foi capaz de reduzir o OPG (ovos por grama de fezes) e a quantidade de vermes em animais traçadores infectados naturalmente com nematoides gastrintestinais. Carvalho et al. (2009), utilizando as espécies *A. robusta*, *A. cladodes* e *A. conoides*, observaram a capacidade destas espécies de sobreviver após a passagem pelo trato gastrointestinal de cães, mantendo sua capacidade de destruição de larvas de *Ancylostoma* spp., bem como redução da população de *Ancylostoma* spp. utilizando o fungo *A. robusta* em condições laboratoriais. Braga et al. (2010a; 2010b), utilizando o fungo *A. robusta*, observaram redução no número de larvas de *Strongyloides stercoralis* e *Ancylostoma ceylanicum*, também em condições laboratoriais.

3 Referências

ARAÚJO JV, GOMES APS, GUIMARÃES MP. Biological control of bovine gastrointestinal nematode parasites in southern Brazil by the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys robusta*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, n. 7, p.117–122, 1998.

ARAÚJO J.V.; NETO, A.P.; AZEVEDO, M.H.F. Screening parasitic nematode-trapping fungi *Arthrobotrys* for passage through the gastrointestinal tract of calves. **Arquivo Brasileiro Veterinária Zootecnia**, v.48, p.543-552, 1996.

ASSIS, R. C. L., LUNS, F. D., ARAÚJO, J. V. & BRAGA, F. R. Biological control of trichostrongyles in beef cattle by the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in tropical southeastern Brazil. **Experimental Parasitology**, n. 132, p. 373-377, 2012.

ASSIS, R. C. L., LUNS F. D., ARAÚJO, J. V., BRAGA, F. R., ASSIS, R. L., MARCELINO, J. L., FREITAS, P. C. & ANDRADE, M. A. S. Comparison between the action of nematode predatory fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* in the biological control of bovine gastrointestinal nematodiasis in tropical southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, n.193, p.134-140, 2013.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES – ABIEC. Disponível em: www.abiec.com.br acesso em: 2 de dezembro de 2015.

BRAGA & ARAUJO. Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 98, p.71–82, 2014.

BRAGA, F.R.; SILVA, A.R.; ARAÚJO, J.M.; CARVALHO, R.O.; ARAÚJO, J.V.; FRASSY, L.N. Atividade predatória dos fungos nematófagos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Arthrobotrys robusta* sobre larvas infectantes de *Strongyloides stercoralis*. **Revista da sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, p. 588-590, 2010a.

BRAGA, F.R.; SILVA, A.R.E.; CARVALHO, R.O. ARAÚJO, J.V.; GUIMARÃES, P. H. G.; FUJIWARA, R. T.; FRASSY, L. N. In vitro predatory activity of the fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium*, *Monacrosporium sinense* and *Arthrobotrys robusta* on *Ancylostoma ceylanicum* third-stage larvae. **Veterinary Microbiology**, v. 146, p.183-186, 2010b.

CAMPOS, A. K. **Fungos nematófagos no controle de nematoides gastrintestinais de ruminantes**. 2006. 138 f. Tese (Doutorado) Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CARVALHO, R.O.; ARAÚJO, J.V.; BRAGA, F.R.; ARAUJO, J.M.; SILVA, A.R.; TAVELA, A.O. Predatory activity of nematophagous fungi on infective larvae of *Ancylostoma* sp: evaluation in vitro and after passing through the gastrointestinal tract of dogs. **Journal of Helminthology**, v.83, p.231-239, 2009.

CERRI CC, MOREIRA CS, ALVES PA, RAUCCI GS, CASTIGIONI BA, MELLO FFC, CERRI DGP, CERRI CEP. Assessing the carbon footprint of beef cattle in Brazil: a case study with 22 farms in the State of Mato Grosso. **Journal of Cleaner Production**, article in press, 2015.

CHARLIER J, VAN DER VOORT M, KENYON F, SKUCE P, VERCRUYSSSE J. Chasing helminths and their economic impact on farmed ruminants. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 7, p. 361- 367, July 2014.

COLES, G.C., JACKSON, F., POMROY, W.E., PRICHARD, R.K., VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G., SILVESTRE, A., TAYLOR, M.A., VERCRUYSSSE, J. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**. n.136, p.167–185, 2006.

COOPER KM, MAHON CM, FAIRWEATHER I, ELLIOTTA CT. Potential impacts of climate change on veterinary medicinal residues in livestock produce: An island of Ireland perspective. **Trends in Food Science & Technology** v. 44, p.21-35, 2015.

DIAS, S. A. Relação entre larvas recuperadas da pastagem e contagem de ovos por gramas de fezes (opg) de nematóides gastrintestinais de bovinos na microrregião de Viçosa, **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Viçosa, v.16, n.1, p.33-36, 2007.

DIJK JV, SARGISON ND, KENYON F, SKUCE PJ. Climate change and infectious disease: helminthological challenges to farmed ruminants in temperate regions. **Animal**, v.4, n.3, p.377–392, 2010.

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

FERRAZ, S., FREITAS, L.G., LOPES E. A., DIAS-ARIEIRA, C.R.. (2010) **Manejo sustentável de fito nematoides**. Editora: UFV, Viçosa, MG, 306 p.

FITZPATRICK. Global food security: The impact of veterinary parasites and parasitologists. **Veterinary Parasitology**, n.195, p.233– 248, 2013.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO. Disponível em www.fao.org acesso em 2 de dezembro de 2015.

GOMES APS, ARAÚJO JV, GUIMARÃES MP. Biological control of bovine gastrointestinal nematode parasites in southern Brazil by nematode-trapping fungus *Arthrobotrys robusta*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.7, p.117– 122, 1998

GRISI L; LEITE RC; MARTINS JRS; BARROS ATM; ANDREOTTI R; CANÇADO PHD; LEÓN AAP; PEREIRA JB; VILLELA HS. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**., Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 150-156, abr.-jun. 2014.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Disponível em www.ibge.gov.br acesso em 2 de dezembro de 2015.

KAPLAN RM, VIDYASHANKAR AN. An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, n.186, p.70– 78, 2012.

LARSEN M, WOLSTRUP J, HENRIKSEN SA, GRONVOLD J, NANSEN P. In vivo passage through calves of nematophagous fungi selected for biocontrol of parasitic nematodes. **Journal of Helminthology**, v.66, n.2, p.137-141, 1992.

LEATHWICK DM, GANESH S, WAGHORN TS, 2015. Evidence for reversion towards anthelmintic susceptibility in *Teladorsagia circumcincta* in response to

resistance management programmes. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, n.5, p.9-15, 2015.

MENDOZA-DE-GIVES, P, TORRES-ACOSTA, J. F. J., , A. J. AGUILAR-CABALLERO, J. A. CUÉLLAR-ORDAZ. Anthelmintic resistance in sheep farms: update of the situation in the American continent. **Veterinary Parasitology**, v.189, p.89-96, 2012.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. Disponível em: www.agricultura.com.br acesso em: 2 de dezembro de 2015.

MOLENTO, M.B. Parasite resistance of helminths of equids and management proposal's. **Ciencia Rural**, v.35, p.1469-1477, 2005.

MOLENTO, M.B.; VERÍSSIMO, C.J.; AMARANTE, A.T.; VAN WYK, J.A.; CHAGAS, A.C.S.; ARAÚJO, J.V.; BORGES, F.A. Alternativas para o controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes. **Arquivos do Instituto Biológico**, n.80, p.253-263, 2013.

MOTA MA, CAMPOS AK, ARAÚJO JV. Influence of different storage methods on the predatory capacity of the fungi *Arthrobotrys robusta* and *Monacrosporium thaumasium* after passage through the bovine gastrointestinal tract. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, n.19, p.913-916, 2003.

NORDBRING-HERTZ, B.; JANSSON, H. B.; TUNLID. A. Nematophagous Fungi. In: **Encyclopedia of Life Science(c)**. Weinheim: Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing, p. 1-11, 2006.

ROSEA,H, WANG T, DIJK J, MORGAN ER. GLOWORM-FL: A simulation model of the effects of climate and climate change on the free-living stages of gastro-intestinal nematode parasites of ruminants. **Ecological Modelling**, v.297, p.232–245, 2015.

SANTOS, MC; SILVA BF; AMARANTE AFT. Environmental factors influencing the transmission of *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v.188, p. 277–284, 2012.

- SANGSTER, N.C., BEHM, C.A. Pathology, pathophysiology and clinical aspects. In: Dalton, J.P. (Ed.), **Fasciolosis**. CAB International, Wallingford, Oxon, pp. 185–224, 1999.
- STIRLING, G.R.; MANI, A. The activity of nematode-trapping fungi following their encapsulation in alginate. **Nematology**, v.41, p.240-250, 1995.
- STROMBERG, B.E.; GASBARRE, L.C.; WAITE, A.; BECHTOLD, D.T.; BROWN, M.S.; ROBINSON, N.A.; OLSON, E.J.; NEWCOMB, H. *Cooperia punctata*: effect on cattle productivity? **Veterinary Parasitology**, v.183, p.284- 291, 2012.
- VAN OOIJ, C. Fungal pathogenesis: Hungry fungus eats nematode. **Nature Reviews Microbiology**. v. 9, p. 766-767, 2011.
- ZHANG, K.Q.; HYDE, K.D. 2014. **Nematode trapping fungi**. Fungal Diversity Research Series, v. 23, 392p.
- YEATES, G W; KING, K L. Soil nematodes as indicators of the effect of management on grasslands in the New England Tablelands (NSW); Comparison of native and improved grasslands. **Pedobiologia**, v.41, p.526-536, 1997.

3 OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Avaliar a eficácia do fungo *Arthrobotrys cladodes* (isolado CG 719) em uma formulação peletizada de alginato de sódio administrada duas vezes por semana por via oral, como alternativa de controle biológico de nematoides em bovinos jovens criados a campo nas condições ambientais existentes no município de Viçosa, MG, Brasil, pelo período de doze meses.

Objetivos específicos

- Verificar a ação in vitro do isolado fúngico CG 719 sobre larvas infectantes de nematoides gastrintestinais de bovinos.
- Avaliar após a passagem pelo trato gastrintestinal de bovinos a viabilidade e ação do fungo quanto a sua atividade predatória sobre as larvas de nematóides de bovinos em distintos intervalos de tempo.
- Observar o processo de interação do fungo predador de nematóides *Arthrobotrys cladodes* e larvas infectantes de nematoides gastrintestinais de bovinos através da microscopia eletrônica de varredura.
- Avaliar a evolução da carga parasitária dos animais dos grupos tratado e controle e no campo (pastagem) após a administração do fungo *A. cladodes* em formulação peletizada, através de contagem de ovos nas fezes, coprocultura e contagem de larvas nas pastagens.

CAPÍTULO 1

Fungo *Arthrobotrys cladodes* var. *macroides* como estratégia sustentável na redução de larvas infectantes de nematoides parasitas gastrintestinais de bovinos

Resumo

A estratégia de controle de nematoides tende a evoluir para uma manipulação mais lógica do equilíbrio hospedeiro-parasita em sistemas de pastagens oferecendo uma opção sustentável. As pesquisas na área de sanidade na produção de ruminantes têm focado na detecção de agentes potenciais no controle biológico de helmintos através da utilização de fungos nematófagos em que mostrem as evidências favoráveis ao sucesso da utilização dessa alternativa na prática. O potencial antagônico do fungo *Arthrobotrys cladodes* var. *macroides* sobre larvas infectantes de nematoides parasitas gastrintestinais de bovinos foi avaliado por meio de microscopia eletrônica de varredura e foi realizado teste in vivo da resistência e viabilidade do fungo em uma formulação a base de alginato de sódio a passagem por via oral de bovinos. O fungo estudado apresentou alta produção de conídios e clamidósporos. Em teste de interação do fungo com os nematoides foi observada uma redução de 68,65% das larvas infectantes de nematóides nas placas de Petri do grupo tratado, em comparação com o controle. Sendo que a interação entre o fungo e os nematoides foi confirmada pela microscopia eletrônica de varredura. A observação das placas contendo as amostras de fezes coletadas após uma administração única por via oral de 100 gramas de péletes contendo o fungo *A. cladodes* mostrou que o mesmo foi capaz de sobreviver à passagem pelo trato gastrintestinal de ruminantes, crescer sobre o ágar, formar armadilhas e predação as larvas de terceiro estágio de parasitas gastrointestinais. Os resultados do presente trabalho abrem uma nova oportunidade de controle alternativo ambiental das nematodioses de ruminantes.

Palavras-chave: *Arthrobotrys*, fungos nematófagos, ruminantes

1 Introdução

O controle das nematodioses gastrintestinais de bovinos depende, em grande parte, do uso rotineiro de diversas bases químicas anti-helmínticas (Cooper et al., 2015; Geurden et al., 2015). No entanto, vários fatores como, o desenvolvimento de resistência anti-helmíntica, aumento de custos e mudanças na gestão agrícola e ambiental, comprometem a utilização desses produtos (Verschave et al., 2016). Com isso tem sido realizada a investigação de métodos alternativos de controle (Vieira et al., 2016).

Fungos nematófagos ou helmintóforos são uma alternativa para reduzir a necessidade do uso de produtos químicos no controle das helmintoses (Liu et al., 2009; Braga & Araújo 2014), pois atuam rompendo o ciclo de vida dos helmintos, capturando fases larvais infecciosas antes dessas migrarem do bolo fecal para a pastagem ou solo, onde seriam ingeridos pelos ruminantes Larsen (1999). Os fungos predadores são os mais estudados uma vez que capturam os nematóides utilizando hifas modificadas na forma de armadilhas. Os endoparasitos parasitam os nematóides utilizando pequenos conídios que penetram pelas aberturas naturais do corpo dos nematóides. Os oportunistas ou ovicidas parasitam ovos e cistos e, por último, aqueles que produzem metabólitos tóxicos aos nematóides (Braga & Araújo 2014).

A dispersão dos fungos nematófagos no ambiente é facilitada pela administração desses organismos através da alimentação dos animais. Contudo, para chegar ao bolo fecal em condições de colonizar o mesmo e preda as formas infectantes de nematóides ali presentes, é necessário que o fungo resista às adversas condições da passagem através do trato gastrintestinal dos animais (Braga & Araújo, 2014).

Formulações com fungos nematófagos podem tornar-se o recurso mais vantajoso para o manejo de nematoides. O encapsulamento de estruturas fúngicas em péletes de alginato de sódio (Assis et al., 2013; Luns 2013; Silva et al., 2013) e em péletes nutricionais (Arias et al., 2015) tem sido demonstrado em diversas pesquisas e com sucesso sobre o controle de nematoides de bovinos e de outras espécies, respectivamente. Contudo trabalhos demonstrando a eficácia do *Arthrobotrys cladodes* var. *macroides* são escassos.

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade predatória do fungo *Arthrobotrys cladodes* sobre larvas infectantes de parasitas gastrintestinais de bovinos em condições *in vitro* e *in vivo* após a passagem pelo trato gastrintestinal de bovinos, sua resistência e viabilidade como uma alternativa sustentável no controle de nematoides.

2 Material e Métodos

2.1 Organismos

O fungo nematófago *Arthrobotrys cladodes* var. *macroides* (isolado CG 719) foi cedido pelo Cenargem e mantido a 4°C, ao abrigo de luz em tubos de ensaio contendo corn-meal-ágar 2% (CMA 2%) na micoteca do Laboratório de Parasitologia do departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Parte deste foi repicada para placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo meio ágar-água 2% (AA 2%), onde o fungo cresceu por sete dias e no escuro. Para indução da formação de micélio fúngico, fragmentos de ágar de aproximadamente 5 mm contendo micélio e esporos do fungo, foram transferidos para frascos Erlenmeyer, contendo 150 mL de meio líquido GPL (glicose, peptona de soja e extrato de levedura). Nesses frascos o fungo cresceu em pH 6,5, sob agitação de 120 rpm, na ausência de luz e em temperatura de 26°C, por 21 dias. Após este período, o micélio foi retirado para a confecção de péletes, os quais foram produzidos em matriz de alginato de sódio, conforme a técnica descrita por Walker e Connick (1983) e modificada por Lackey et al., (1993).

Larvas infectantes (L₃) dos nematoides de *Haemonchus* sp., *Cooperia* sp. e *Oesophagostomum* sp. nas proporções de 63%, 26% e 11% respectivamente foram obtidas a partir de fezes de bovinos apresentando idade entre sete e nove meses, peso médio de 180 kg e naturalmente infectados por helmintos, através de cultura de fezes em vermiculita, durante 15 dias, e posteriormente foi usado funil de Baermann, com água a 42-45°C e tempo de decantação de 12 horas.

2.2 Avaliação da atividade do fungo *Arthrobotrys cladodes* sobre larvas infectantes de nematoides gastrintestinais

Foram utilizadas 20 placas de Petri, de 9 cm de diâmetro, contendo ágar-água 2% (AA 2%), divididas em dois grupos (tratado e controle). O grupo tratado foi constituído de 10 placas, com o isolado fúngico previamente crescido, em meio AA

2%. Em cada placa foram vertidas 500 larvas infectantes (L₃). O grupo controle foi composto das outras 10 placas, com meio AA 2% e 500 L₃. As placas foram mantidas em estufa incubadora, a 25 ° C e no escuro, durante um período de 15 dias. No 15º dia, L₃ foram recuperadas com o auxílio do funil de Baermann, com água a 42-45 ° C e durante 12 horas à espera de decantação. As larvas infectantes recuperadas foram contadas e identificadas em microscópio de luz (aumento 100X), obtendo a média das larvas não predadas por gênero no grupo controle, e as médias de larvas não predadas por gênero do grupo tratado. O percentual de redução de larvas do grupo tratado em relação ao controle foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Redução (\%)} = \frac{(\text{média de larvas do controle} - \text{médias de larvas do tratamento}) \times 100}{\text{média de larvas do controle}}$$

A interação também foi observada através de microscopia eletrônica de varredura aplicando a técnica proposta por Nordbring-Hertz, (1983) com modificações.

Discos de membrana de diálise (SIGMA®) com 6 cm de diâmetro foram cortados e colocados em frascos Erlenmeyer contendo água destilada. O material foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 min. Estes discos foram então retirados dos frascos Erlenmeyer com auxílio de uma pinça e colocados sobre a superfície de AA 2% contido em placas de Petri (6 cm de diâmetro) de forma que as margens da membrana cobrissem toda a superfície do ágar e as bordas ficassem elevadas e aderidas à margem de vidro das placas para evitar a passagem das larvas para a parte de baixo da membrana.

Fragmentos de CMA 2% (Corn Meal Agar, DIFCO®) contendo micélio e esporos do isolado fúngico de *Arthrobotrys cladodes* foram retirados de tubos de cultivo e repicados para três placas de Petri com 9 cm de diâmetro. As placas foram incubadas em câmara de germinação, a 25°C e em ausência de luz. Após sete dias, das bordas das colônias crescidas livres de contaminação, fragmentos de aproximadamente 4 mm de diâmetro, foram repicados para a superfície das membranas de diálise (Nordbring-Hertz, 1983). As placas de Petri foram incubadas em câmara de germinação a 25 °C e em ausência de luz.

Após sete dias de incubação, as placas foram retiradas da incubadora e, suspensões contendo aproximadamente 2000 larvas infectantes de parasitas

gastrintestinais de bovinos, foram gotejadas sobre as culturas de *A. cladodes* crescidas sobre a superfície das membranas de diálise.

Retalhos de membrana de diálise com amostras de L₃ expostas à captura foram cortados com uma lâmina de bisturi, coletados com pinça de ponta fina e fixados em glutaraldeído a 2,5% em 0,05 M de tampão fosfato, pH 7,4 por 24h, lavadas seis vezes no mesmo tampão e desidratadas através da passagem do material em série de etanol (30, 50, 60, 70, 95 e 100%). Os péletes recuperados foram desidratados em estufa. Posteriormente todos os materiais foram secos em secador de ponto crítico BALZERS® utilizando dióxido de carbono, recoberto com ouro em metalizador e elétrômicrografados em microscópio eletrônico de varredura LEO a 10-15 kV, no Núcleo de Microscopia Eletrônica e Microanálises, localizado na Universidade Federal de Viçosa.

2.3 Avaliação da atividade do fungo *Arthrobotrys cladodes* após passagem pelo trato gastrintestinal de bovinos

Doze bovinos, mestiços (holandês x zebu), apresentando idade entre sete e nove meses, peso médio de 180 kg e naturalmente infectados por helmintos, foram mantidos estabulados alimentados com ração comercial (15% proteína bruta; 78,8% milho; 20,7% farelo de soja; 0,17% fosfato bicálcio; 0,03% enxofre; 0,03% microminerais; 0,03% vitaminas; 0,15% sal comum; 0,01% calcário) e matéria seca de 88%. Estes animais foram tratados previamente com duas doses de ivermectina 1% intervaladas de duas semanas e com uma dose de 7,5 mg/kg de peso *vivo* de albendazole. Após 21 dias do tratamento e confirmação de resultados negativos da presença de ovos de helmintos, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos (tratado e controle) com seis animais cada. Os animais do grupo tratado receberam 100 gramas de peletes contendo o isolado de *Arthrobotrys cladodes* (isolado CG 719), em administração única por via oral. Os animais do grupo controle receberam 100 gramas de peletes de alginato de sódio sem fungo, também em administração única por via oral.

Amostras fecais foram coletadas dos animais a partir de 12, 24, 36, 48, e 72 horas após a administração de dose única da formulação peletizada com o isolado fúngico CG719 (grupo tratado) e sem o fungo (grupo controle). As amostras de cada grupo foram homogeneizadas, e 2g de fezes foram adicionadas em placas de Petri de 5 cm de diâmetro, com AA 2%. As placas foram armazenadas em estufa a 25 °C

e no escuro. Dez repetições foram realizadas por horário, para cada grupo. Nestas placas foram adicionadas 500 larvas infectantes (L₃) de nematoides nas proporções de 63% de *Haemonchus* sp., de 26% de *Cooperia* sp. e 11 % de *Oesophagostomum* sp. As placas foram observadas diariamente para a investigação de conídios e conidióforos característicos do isolado testado, analisadas pelas chaves de classificação propostas por Van Oorschot (1985). No 15º dia, as L₃ não predadas foram recuperadas a partir das placas de Petri pelo método de Baermann, obtendo-se a média de larvas não predadas por placa, as quais foram quantificadas em microscópio de luz (objetiva de 10x). O percentual de redução foi calculado pela mesma fórmula utilizada no teste anterior.

2.4 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos ao teste t de Student aos níveis de 1% e 5% de probabilidade utilizando o software IBM SPSS Statistics 2.0.

3 Resultados

Nas placas de Petri foi reisolado o fungo *Arthrobotrys cladodes* var. *macroides* que apresentou conidióforos eretos de até 300µm de comprimento, portador de arranjos contendo até 28 conídios. Os conídios eram alongados obovóides a alongados-elipsoidais com medidas variando de 20-25µm x 5-7,5µm e com septo no meio ou próximo do meio. Clamidósporos estavam presentes ao longo das hifas sobre a superfície das placas. A captura de nematoides foi realizada por meio de redes adesivas (Figura 1).

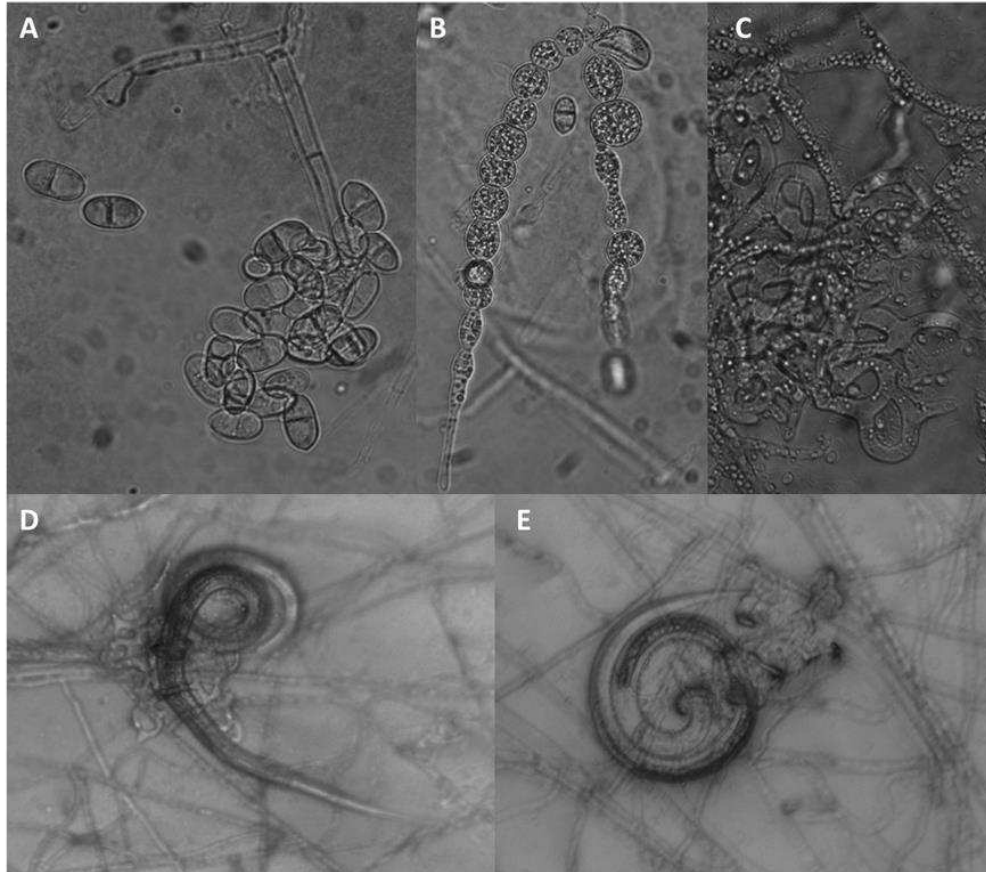


Figura 1: Imagens do fungo *Arthrobotrys cladodes* var *macroides* feitas em microscópio de luz. (A) arranjo de conídios em aumento 40X, (B) clamidósporos em aumento 40X, (C) armadilha do tipo redes adesivas em aumento de 40X, (D e E) larva de nematoide parasita gastrointestinal de bovino presa em armadilha em aumento de 10X.

A capacidade de predação do fungo *Arthrobotrys cladodes* foi demonstrada pelos números médios de larvas infectantes (L_3) de nematoides parasitos de bovinos recuperados ao final de 15 dias (Figura 2). O número médio de L_3 recuperadas do grupo tratado ($46,20 \pm 7,60$) foi menor do que a média de L_3 recuperadas do grupo controle ($147,40 \pm 15,15$) após 15 dias ($p < 0,01$). Uma redução de 68,65% das L_3 de nematoides foi encontrada nas placas do grupo tratado, em comparação com o controle.

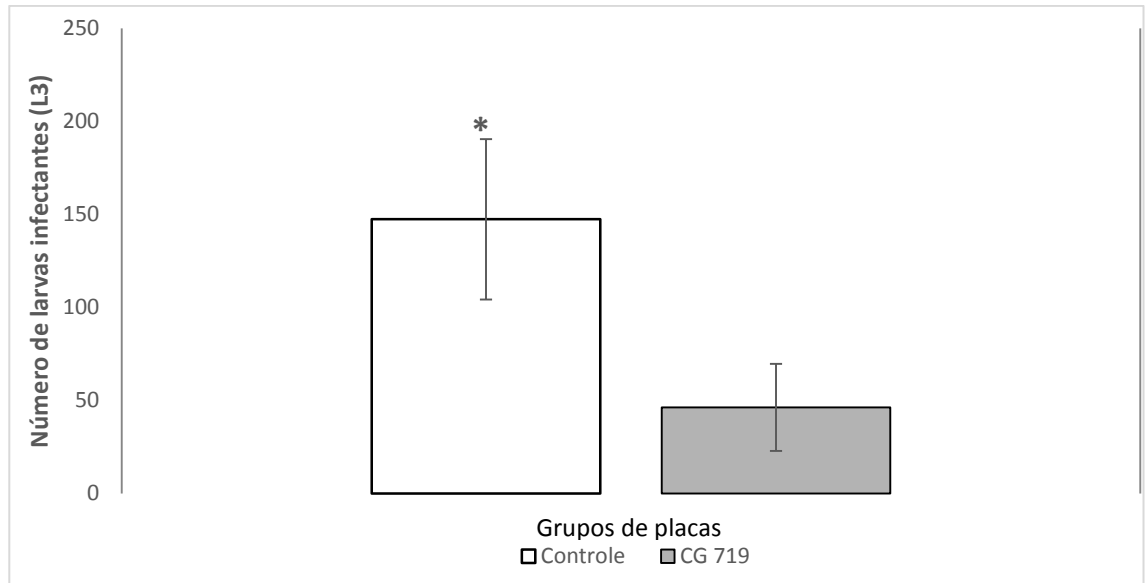


Figura 2: Número de larvas infectantes (L3) de nematoides gastrintestinais de bovinos (*Haemonchus* sp 63%; *Cooperia* sp 26%; *Oesophagostomum* sp 11%) recuperadas após 15 dias de incubação em placas de Petri contendo o isolado *Arthrotrrys cladodes* var *macroides* previamente crescido em ágar-agua 2% e em placas sem fungo (controle). *Diferença significativa ($p < 0,001$) entre os grupos tratados e controle.

Não houve variação significativa ($p > 0,01$) da proporção média inicialmente colocada em cada placa de *Haemonchus* sp (66%), *Cooperia* sp (26%) e *Oesophagostomum* sp (11%) (Figura 3).

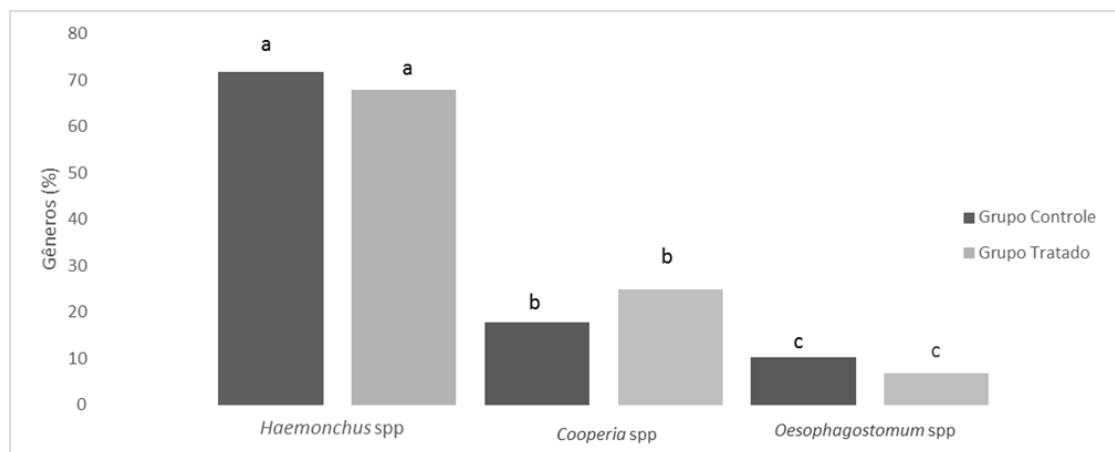


Figura 3: Valores médios de *Haemonchus* sp (71,76% e 67,98%), *Cooperia* sp (17,94% e 25,09%) e *Oesophagostomum* sp (10,29% e 6,92%) recuperados em cada placa do grupo controle e tratado respectivamente. Mesmas letras indicam a não diferença estatística ($p > 0,01$).

Os péletes foram recuperados das fezes até o período de 72 horas após a administração da dose única por via oral em bovinos.

A observação das placas contendo as amostras de fezes mostrou que o fungo nematófago *Arthrobotrys cladodes* var. *macroides* foi capaz de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal de ruminantes, crescendo sobre as placas, formando armadilhas e predando larvas de terceiro estágio de nematoides parasitas gastrointestinais de bovinos. Nas placas do grupo controle não foi observada a presença de fungo nematófago *A. cladodes*.

A cada tempo de coleta após a administração da dose única 12, 24, 36, 48, e 72 horas, o percentual de redução em relação ao grupo controle foi de 48,65%, 53,33%, 44,16%, 40%, e 31,71%, respectivamente (Tabela 1). No tempo de 24 horas, o fungo *Arthrobotrys cladodes* mostrou maior capacidade predatória com diferença estatística ($p < 0,01$) em relação ao controle.

Tabela 1: Médias (\pm desvio padrão) e percentuais de redução de larvas infectantes de nematoides gastrointestinais de bovinos após 15 dias de incubação em placas de Petri com ágar-água 2% contendo fezes recuperadas em diferentes horários de 12 a 72 horas após a administração dos péletes por via oral de bovinos contendo *Arthrobotrys cladodes* var. *macroides* (tratado) e sem o fungo (controle).

Tempo (h)	Tratado	Controle	Redução (%)
12	19 ^a \pm 10,28	37 ^a \pm 23,20	48,65
24	21 ^a \pm 10,53	45 ^b \pm 12,09	53,33
36	34 ^a \pm 21,63	62 ^a \pm 31,93	45,16
48	36 ^a \pm 14,99	60 ^a \pm 38,17	40,00
72	28 ^a \pm 11,81	41 ^a \pm 34,00	31,71

Diferentes letras em linha indica a existência de diferença estatística ($p < 0,01$).

No presente experimento não houve significativa perda de capacidade predatória após a passagem pelo trato gastrointestinal no tempo de 24 horas quando comparada ao teste *in vitro* (Figura 4).

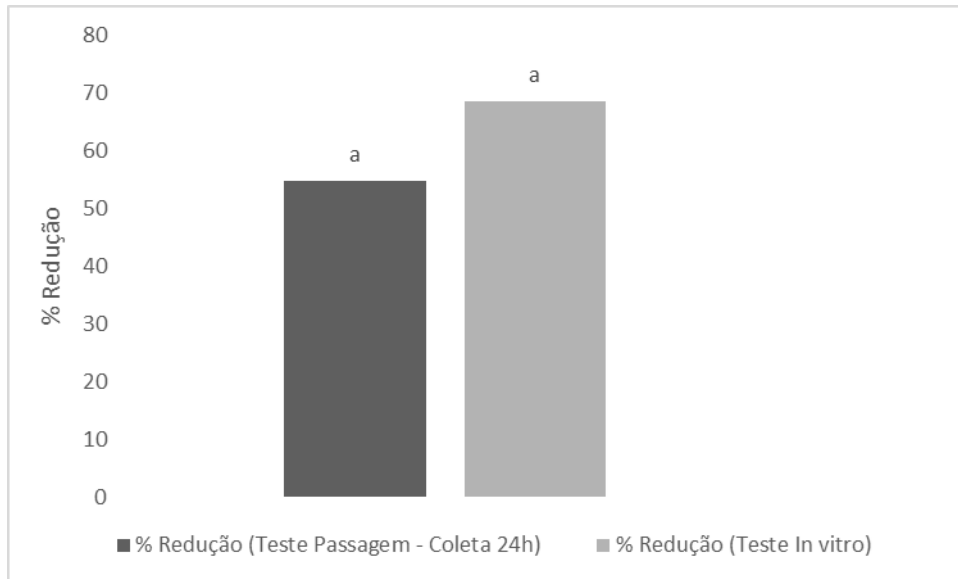


Figura 4: Comparação do percentual de redução (%) do tempo de 24 horas após passagem dos péletes contendo o fungo *Arthrobotrys cladodes var macroides* com o percentual de redução do teste in vitro. Letras iguais indicam a não diferença estatística ($p > 0,01$).

As elétron-micrografias de varredura do processo de interação do isolado *Arthrobotrys cladodes var macroides* com larvas infectantes de nematoides parasitas de bovinos e dos péletes recuperados após a passagem pelo trato gastrointestinal demonstraram o potencial de crescimento das hifas, conídios e armadilhas do fungo (figura 5 e 6).

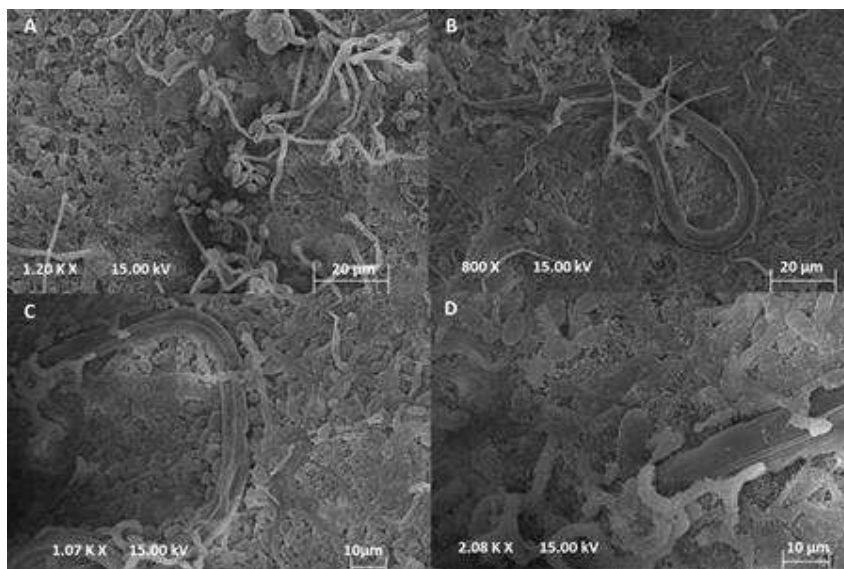


Figura 5: Élétron-micrografias de varredura do processo de interação do fungo *Arthrobotrys cladodes var macroides* com larvas infectantes (L_3) de nematoides parasitas de bovinos. (A) vasta quantidade de hifas e conídios do fungo, (B) hifa do fungo emergindo da cutícula da

larva evidenciando a penetração do fungo no corpo da L₃, (C) armadilhas aderidas a diferentes regiões da superfície da L₃ após a predação, (D) destaque da armadilha em redes adesivas aderindo à região anterior do nematoide.

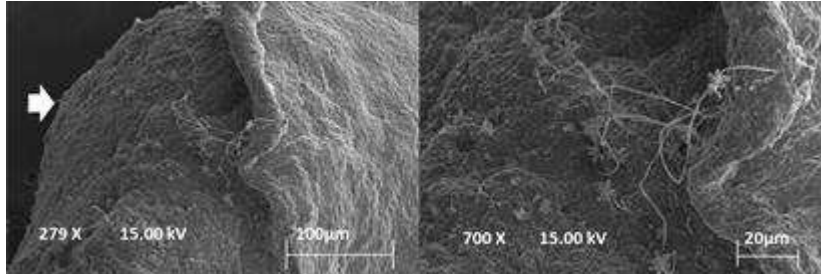


Figura 6: Életron- micrografias de varredura do pélete recuperado após a passagem pelo trato gastrintestinal de bovinos (indicado pela seta). Em destaque o crescimento de hifas e conídios do fungo *Arthrobotrys cladodes* var *macroides* emergindo na superfície do pélete.

4 Discussão

Este é o primeiro relato da eficácia *in vitro* e *in vivo* do fungo *Arthrobotrys cladodes* sobre larvas infectantes de nematoides gastrointestinais de bovinos. A espécie *A. cladodes* var. *macroides* além de apresentar alta produção de conídios produz clamidósporo sendo que esta última estrutura de resistência está presente apenas em alguns fungos nematófagos. De acordo com os autores Anan'ko & Teplyakova 2011 e Silva et al., (2015) estas características são desejáveis ao selecionar um fungo nematófago uma vez que, gêneros que possuem alta produção de conídios e clamidósporos levam vantagem na dispersão e colonização do ambiente, conseqüentemente terão maior sucesso como controlador de nematoides.

Os resultados do presente trabalho reforçam a importância do gênero *Arthrobotrys* e propõe mais uma espécie desse gênero como potencial controlador biológico de nematóides de bovinos demonstrando uma redução de 68,65%. A atividade predatória do fungo *Arthrobotrys cladodes* sobre larvas de diversos parasitos, em condições laboratoriais, já foi demonstrada em muitos trabalhos. Eslami (2005) avaliou a capacidade predatória do fungo *A. cladodes*, quando conídios foram adicionados diretamente em fezes de ovinos, e verificou uma redução de 63,27% no número de larvas recuperadas na concentração de 8000 conídios por gramas de fezes. A espécie *A. cladodes* também foi testada *in vitro* sobre larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma spp.*, sendo obtida uma redução de 71,3% no número das larvas (Carvalho et al., 2009), sendo que o mesmo isolado foi

testado sobre larvas de primeiro estágio de *Angyostrongylus cantonensis* e um percentual de redução de 84,7% foi observado no final de 7 dias de experimento (Paula et al., 2013). A primeira interação de *A. cladodes* sobre larvas de *Libyostrongylus douglassii* um parasito de avestruzes foi feita por Braga et al., (2013) que relatou uma diminuição de 89,2% na média de larvas predadas pelo fungo. Mendonza-de-Gives et al., (1999) sugerem que essas diferenças em resultados de predação por fungos nematófagos podem ser justificadas devido à composição da cutícula dos nematóides, a qual pode ser um fator determinante na habilidade de predação do fungo e devido a variações antigênicas existentes nas diferentes espécies de nematóides ou nos diferentes isolados da mesma espécie de fungos.

Os gêneros mais prevalentes encontrados nas coproculturas para obtenção de larvas infectantes foram *Haemonchus* sp, seguido por *Cooperia* sp e *Oesophagostomum* sp, e está de acordo com as observações realizadas por Assis et al., (2015). Assim como houve reduções das larvas infectantes de todos os gêneros quando comparadas as médias de larvas das placas contendo o fungo e das placas sem o fungo.

A resistência à passagem pelo trato gastrointestinal é uma característica importante em fungos a serem usados no controle biológico, já que formulações para uso oral poderão ser desenvolvidas. Isto porque a forma mais apropriada para a administração dos fungos é pela via oral, através de suplementos alimentares, *in natura* ou em outros componentes que propiciem a sua liberação para que no final ocorra um contato entre as larvas recém-eclodidas dos ovos de parasitas e o fungo (Braga & Araújo 2014).

Em um experimento realizado por Araújo et al., (2001) foi observada a passagem de dois isolados fúngicos de *A. robusta* e um isolado de *A. conoides* pelo trato gastrointestinal de bovinos, mas estes apresentaram a sua capacidade predatória reduzida. No presente experimento não houve significativa perda de capacidade predatória após a passagem pelo trato gastrointestinal no tempo de 24 horas quando comparada ao teste *in vitro* (Figura 4). De acordo com Campos (2009) essa pequena diferença nos percentuais entre os testes pode ser justificada pelo fato de que o experimento *in vitro* não expõe os fungos às condições adversas impostas pelo trato gastrointestinal dos animais e fatores bióticos e abióticos

ambientais tais como variação de temperatura, umidade, pH e competição com outros organismos da fauna e flora coprófila.

No presente trabalho verificamos que a máxima redução de larvas infectantes ocorreu 24h após a administração do fungo. Este período coincide com o ponto em que a maior parte do material fúngico é eliminada nas fezes e está de acordo com Larsen et al., 1998. Resultados similares foram observados por Mota et al., 2003 no qual a atividade predatória dos isolados de *A. robusta* e de *M. thaumasium* sobre larvas infectantes de bovinos também apresentou o pico no período de 24h após a administração oral de 20g de micélio aos animais corroborando com os nossos resultados. O isolamento dos fungos *Monacrosporium sinense* e *M. appendiculatum* nas fezes de caprinos ocorreu, principalmente, 24 horas após a administração de 100g dos péletes contendo os fungos por via oral (Assis et al., 2004).

O tempo médio necessário para a passagem de material fúngico pelo sistema digestivo de ruminantes é muito variável e depende do tipo de alimentação e dose fornecida durante o experimento (Parish J. 2011; Oliveira et al., 2013). Com relação ao período de eliminação, houve recuperação de péletes até o tempo de 72 horas após a administração da dose única. Esta observação corrobora com o sucesso de formulações à base de alginato de sódio com outros fungos nematófagos que proporcionaram bons resultados em condições laboratoriais e de campo (Silva et al., 2013; Assis et al., 2013; Assis et al., 2015).

A confirmação da capacidade do fungo nematófago *Arthrobotrys cladodes* de suportar as condições de passagem pelo trato digestivo de bovinos em uma formulação peletizada à base de alginato de sódio amplia o espectro de alternativas nas pesquisas sobre controle biológico de nematoides gastrintestinais através da utilização de fungos que possam diminuir o número de larvas infectantes nas pastagens. O Brasil possui uma grande extensão territorial, com características ambientais variáveis que pode demandar uma variedade de isolados com características adaptativas específicas.

Sendo assim o *Arthrobotrys cladodes* demonstrou atividade predatória sobre as larvas de nematoides parasitas gastrointestinais de bovinos, apresentando-se como um organismo promissor para uso no controle biológico, uma vez que foi capaz de passar pelo trato gastrintestinal de ruminantes sem perder sua viabilidade.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, Fapemig e a CAPES pelo suporte financeiro.

Referências

ANAN'KO, G. G, TEPLYAKOVA, T. V. Factors responsible for transition of the *Duddingtonia flagrans* carnivorous fungus from the saprotrophic to the zootrophic nutrition type. **Mikrobiologiya**, v. 80, n. 2, p. 200–206, 2011.

ARAÚJO J.V.; CAMPOS A.K.; PAIVA F.; BRESSAN M.C.R.V. Antagonist effect of nematode-trapping fungi *Arthrobotrys* on infective larvae of *Oesophagostomum radiatum*, *Cooperia punctata* and *Haemonchus placei*. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.8, n.2, p.81-84, 2001.

ASSIS, R. C. L.; ALVES, P. H.; CAMPOS, A. K. ; GANDRA, J. R.; Araújo, J.V. Controle biológico de trichostongilídeos (Nematoda: *Trichostrongyloidea*) gastrintestinais de bovinos pelo fungo *Monacrosporium sinense*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n.4, p. 467-471, 2004.

ASSIS, R.C.L; LUNS, F.D.; ARAÚJO, J.V.; BRAGA F.R.; ASSIS, R.L.; MARCELINO, J.L.; FREITAS, P.C.; ANDRADE, M.A.S. Comparison between the action of nematode predatory fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* in the biological control of bovine gastrointestinal nematodiasis in tropical southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 193, p.134–140, 2013.

ASSIS, R.C.L.; LUNS, F.D.; ARAÚJO, J.V.; BRAGA, F.R.; ASSIS, R.L.; MARCELINO, J.; FREITAS, P.C.; ANDRADE, M.A.. An isolate of the nematophagous fungus *Monacrosporium thaumasium* for the control of cattle trichostrongyles in south-eastern Brazil. **Journal of Helminthology**, v.89, p. 244-249, 2015.

BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V. Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p.71-82, 2014.

Braga, F.R.; Araujo, J.M.; Araújo, J.V. ; SOARES, F. E. F. ; Tavela, A. O. ; Frassy, L.N.; LIMA, W. S. ; MOZZER, L. R. . In vitro predatory activity of conidia of fungal isolates of the *Duddingtonia flagrans* on *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (Impresso)**, v. 46, p. 108-110, 2013.

CAMPOS, A.K.; ARAÚJO, J.V.; GUIMARÃES, M.P.; DIAS, A.S. Resistance of different fungal structures of *Duddingtonia flagrans* to the digestive process and predatory ability on larvae of *Haemonchus contortus* and *Strongyloides papillosus* in goat feces. **Parasitology Research**, v.105, p.913-919, 2009.

Carvalho, R.O.; Araújo, J. V. ; BRAGA, F. R. ; Araujo, J.M.; SILVA, A. R. E. ; Tavela, A. O. . Predatory activity of nematophagous fungi on infective larvae of *Ancylostoma* sp.: evaluation in vitro and after passing through the gastrointestinal tract of dogs. **Journal of Helminthology**, v. 83, p. 231-236, 2009.

COOPER KM, MAHON CM, FAIRWEATHER I, ELLIOTTA CT. Potential impacts of climate change on veterinary medicinal residues in livestock produce: An island of Ireland perspective. **Trends in Food Science & Technology**, v. 44, p.21-35, 2015.

Eslami, A.; Ranjbar-Bahadori, S.; Zare, R.; Razzaghi-Abyaneh, M. The predatory capability of *Arthrobotrys cladodes* var. *macroides* in the control of *Haemonchus contortus* infective larvae. **Veterinary Parasitology**, v.130, p.263-266, 2005.

GEURDEN T., CHARTIER C., FANKE J., DI REGALBONO A.F., TRAVERSA D., VON SAMSON-HIMMELSTJERNA G., DEMELER J., VANIMISETTI H.B, BARTRAM D.J., DENWOOD M.J. Anthelmintic resistance to ivermectin and moxidectin in gastrointestinal nematodes of cattle in Europe **International Journal for Parasitology – Drugs and Drug Resistance**, v.5, p.163-171, 2015.

LACKEY, B.A.; MULDOON, A.E.; JAFFE, B.A. Alginate pellet formulation of *Hirsutella rossiliensis* for biological control of plant-parasitic nematodes. **Biological Control**, v.3, p.155-160, 1993.

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

LARSEN M.; FAEDO M.; WALLER P.J.; HENNESSY D.R. The potencial 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.

LIU, X.Z.; XIANG, M.C.; CHE, Y.S. The living strategy of nematophagous fungi. **Mycoscience**, v. 50, p.20-25, 2009.

LUNS, F. D. ; ASSIS, R.C.L. ARAÚJO, J.V. ; BRAGA, F.R. Comparison between the action of nematode predatory fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* in the biological control of bovine gastrointestinal nematodiasis in tropical southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology (Print)**, v. 193, p. 134-140, 2013.

MENDOZA-de-GIVES, P.; DAVIES, K.G.; CLARK, S.J.; BEHNKE, J.M. Predatory behavior of trapping fungi against srf mutants of *Caenorhabditis elegans* and different plant and animal parasitic nematodes. **Parasitology**, v.119, p. 95-104, 1999.

MOTA M.A.; CAMPOS A.K.; ARAÚJO J.V. Influence of different storage methods on the predatory capacity of the fungi *Arthrobotrys robusta* and *Monacrosporium thaumasium* after passage through the bovine gastrointestinal tract. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.19, p.913–916, 2003.

NORDBRING-HERTZ, B. Dialysis membrane techniques for studying microbial interaction. **Applied Environmental Microbiology**, v.45, p.399-407, 1983.

OLIVEIRA, V.S.; SANTANA NETO, J.A.; VALENÇA, R.L.. Chemical and physiological characteristics of rumen fermentation in grazing cattle – review. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.20, n.1, 2013.

PAULA, A. T.; BRAGA, F. R.; CARVALHO, L. M.; LELIS, R. T.; MELLO, I. N. K.; TAVELA, A. O.; SOARES, F. E. F.; JUNIOR, A. M.; GARCIA, J. S.; ARAÚJO, J.V. First report of the activity of predatory fungi on *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Angiostrongylidae) first-stage larvae. **Acta Tropica**, v.127, p.187-190, 2013.

PARISH, J. **Ruminant Digestive Anatomy and Function**. Cattle Business in Mississippi. 2011. Disponível em: http://msucare.com/livestock/beef/mca_feb2011.pdf. Acesso em: 30 de nov. de 2016.

SILVA, M. E. ; Braga, F.R.; Araújo, J.V. ; SOARES, F. E. F. . Control of infective larvae of gastrointestinal nematodes in heifers using different isolates of nematophagous fungi. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (Online)**, v. 22, p. 78-83, 2013.

SILVA, M.E.; BRAGA, F.R.; BORGES, L.A.; OLIVEIRA, P.; LIMA, W.S.; ARAÚJO, J.V. Produção de conídios y clamidosporas de los hongos *Duddingtonia flagrans* y *Monacrosporium thaumasium* en diferentes medios sólidos. **Arquivos do Instituto Biológico (Online)**, v. 82, p. 1-5, 2015.

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

VERSCHAVE, S.H; CHARLIER, J.; ROSE, H.; CLAEREBOUT, E.; MORGAN, E.R. Cattle and Nematodes Under Global Change: Transmission Models as an Ally. **Trends in Parasitology**, v.32, n.9, 2016.

VIEIRA, J.N.; MAIA FILHO, F.S.; FERREIRA, G.F.; MENDES, J.F.; GONÇALVES, C.L.; VILLELA, M.M.; PEREIRA, D.I.B.; NASCENTE, P.S. In vitro susceptibility of nematophagous fungi to antiparasitic drugs: interactions and implications for biological control. **Brazilian Journal of Biology**, ahead of print Epub Oct 03, 2016.

WALKER, H.L.; CONNICK, W.J. Sodium alginate for production and formulation of mycoherbicides. **Weed Science Journal**, v.31, p.333-338, 1983.

CAPÍTULO 2

Efeito do fungo *Arthrobotrys cladodes* var *macroides* na redução da infestação por larvas de nematoides gastrintestinais de bovinos na pastagem

Resumo

O controle biológico através do uso de fungos helmintófagos é uma alternativa sustentável de combate às helmintoses de animais domésticos e que possibilita redução no uso de anti-helmínticos. O experimento foi conduzido em uma fazenda localizada no município de Viçosa, MG, onde 12 bovinos, mestiços holandês x zebu com sete a nove meses de idade, foram divididos aleatoriamente em dois grupos (grupo tratado e grupo controle) e distribuídos em piquetes de *Brachiaria decumbens*, naturalmente infestados com larvas de helmintos. Os animais do grupo tratado receberam 1g de pélete em matriz de alginato de sódio para cada 10 kg de peso vivo animal, contendo o fungo *Arthrobotrys cladodes var macroides* administrados duas vezes por semana conjuntamente com ração comercial. Já no grupo controle cada animal recebeu 1 g de pélete para cada 10 kg de peso vivo animal, sem micélio fúngico adicionado a ração. Amostras de fezes e pastagens foram coletadas quinzenalmente durante 12 meses. Os gêneros de nematoides mais prevalentes nas coproculturas foram *Haemonchus* sp., *Cooperia* sp. e *Oesophagostomum* sp. refletindo os resultados encontrados na forragem. A pastagem que continha os animais que receberam tratamento com o fungo apresentou redução de 59% e 52% de larvas recuperadas nas distâncias de 20cm e 40cm do bolo fecal, respectivamente. As médias mensais de ovos por grama de fezes e peso não diferiram significativamente ($p>0,05$) entre o grupo tratado e controle. Amostras de fezes e solo de ambos os grupos foram colonizadas pelo fungo *A. cladodes* e por outros fungos. A administração do micélio de *Arthrobotrys cladodes var macroides* por meio de matriz de alginato de sódio, duas vezes na semana, diminuiu a infestação de larvas na pastagem, indicando que esse fungo pode ser um controlador biológico promissor no combate das formas infectantes de nematoides presentes no meio ambiente.

Palavras-chave: fungo nematófago, fungo helmintófago, controle biológico

1 Introdução

Para atender a demanda de uma população em crescimento e devido as atuais exigências feitas pelo consumidor sobre a cadeia produtiva animal (Charlie et al. 2014), o principal desafio dos próximos anos para a indústria e para a produção pecuária em geral será a produção de alimentos de alta qualidade de forma ética, ambientalmente aceitável e que mantenha a viabilidade econômica.(Verschave et al. 2016).

Essa crescente demanda por uma exploração mais extensiva da pecuária bovina ocasiona aumento na lotação das pastagens (Claudino, 2014) o que acarreta no aumento dos problemas sanitários. (Venturini & Menezes, 2016).

As infecções por helmintos compreendem um importante grupo de doenças nos ruminantes em pastejo (Charlie et al. 2014 e Grisi et al. 2014) e a rentabilidade das atividades pecuárias pode ser diminuída significativamente pelos efeitos desses parasitas. (Grisi et al. 2014).

O futuro do controle desses parasitas, no entanto, é desafiado por vários fatores, como o desenvolvimento de resistência anti-helmíntica, mudanças no clima e gestão agropecuária (Verschave et al. 2016, Silva et al. 2016).

O uso combinado de métodos de controle químico e biológico pode ser uma estratégia viável para a saúde do gado, na redução de custos, baixa resistência e toxicidade, além de reduzir os resíduos de produtos de origem animal para o meio ambiente (Soares & Monteiro, 2011). Nesse sentido o controle biológico feito através do uso de fungos nematofagos tem sido testado a campo com resultados bastante interessantes Assis et al. (2013) (2015). Estes fungos rompem o ciclo de vida capturando fases larvais infectantes antes de migrarem do bolo fecal para pastagem, onde de outra forma seriam adquiridos por animais de pastagem (Braga & Araújo 2014).

Arthrobotrys cladodes var. *macroides* apresenta alta produção de conídios e produz clamidósporo. De acordo com Anan'ko & Teplyakova (2011) e Silva et al. (2015) estas características são desejáveis ao selecionar um fungo nematófago uma vez que, gêneros que possuem alta produção de conídios e clamidósporos levam vantagem na dispersão e colonização do ambiente, conseqüentemente terão maior sucesso como controlador de nematoides.

Diante destes pressupostos este trabalho avaliou a eficácia do fungo *Arthrobotrys cladodes* var *macroides* em uma formulação peletizada a base de alginato de sódio administrada duas vezes por semana por via oral, como alternativa de controle biológico de nematoides em bovinos jovens criados a campo.

2 Material e métodos

2.1 Fungo

O fungo nematófago *Arthrobotrys cladodes* var *macroides* (isolado CG 719) foi proveniente da micoteca do Laboratório de Parasitologia do departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, onde foi mantido a 4°C, ao abrigo de luz em tubos de ensaio contendo corn-meal-ágar 2% (CMA 2%). Uma parte deste foi repicada para placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio ágar-água 2% (AA 2%) onde o fungo cresceu por sete dias. Para indução da formação de micélio fúngico, fragmentos de ágar de aproximadamente 5 mm contendo micélio e esporos do fungo foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 250mL, contendo 150mL de meio líquido GPL (glicose, peptona de soja e extrato de levedura), pH 6,5 sob agitação de 120 rpm, no escuro na temperatura de 26°C por 21 dias. Após este período, o micélio foi retirado para a confecção dos péletes, que foram feitos em matriz de alginato de sódio de acordo com a técnica descrita por Walker e Connick (1983) modificada por Lackey et al (1993). Os péletes utilizados no experimento foram secos em estufas e mantidos um teor de umidade de 30%.

2.2 Ensaio experimental in vivo

O experimento foi conduzido em uma fazenda localizada no município de Viçosa, estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil latitude 20° 45' 20" S, longitude 42° 52' 40" W.

Doze bovinos, mestiços holandês x zebu com sete a nove meses de idade, com peso médio de 180 kg foram tratados previamente com anti-helmíntico ivermectina 1% na dose de 1mL/50 kg peso vivo animal e albendazol suspensão na dose de 1mL/20kg peso vivo. Vinte e um dias após o tratamento com o anti-helmíntico e confirmado a ausência de ovos de nematóides nas fezes, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos com seis animais cada e distribuídos em dois piquetes com dois hectares cada de *Brachiaria decumbens*, naturalmente

infestados com larvas de helmintos, pelo prévio histórico de pastejo de animais jovens e adultos.

No primeiro grupo cada animal foi tratado com 1g de pélete para cada 10 kg de peso vivo animal, contendo o fungo *Arthrobotrys cladodes* administrados duas vezes por semana conjuntamente com ração comercial. Já no grupo controle cada animal recebeu 1 g de pélete para cada 10 kg de peso vivo animal, sem micélio fúngico adicionado a ração.

O experimento teve uma duração de doze meses, no qual só foram utilizadas amostras do material fecal dos animais e amostras de pastagens. Toda a metodologia proposta estava de acordo com os guidelines da World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) seguindo as orientações para avaliar a eficácia de anti-helmínticos em ruminantes: bovinos e ovino descrita por Powers et al. (1982) e segunda edição de diretrizes para avaliar a eficácia de anti-helmínticos em ruminantes: bovinos, ovinos e caprinos citada por Wood et al. (1995). Esse ensaio experimental seguiu rigorosamente todos os procedimentos recomendados pelas normas de conduta para o uso de animais e certificado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFV) pelo processo nº 21/2016.

2.3 Colheita e processamento do material fecal

A cada 15 dias, após a introdução dos animais nos pastos, amostras de fezes de todos os animais de cada grupo foram coletadas diretamente da ampola retal. Nessas amostras foram determinadas as contagens de ovos por grama de fezes (OPG) pelo método de Gordon e Whithlock (1939) modificada por Lima (1989).

A cada 15 dias, coproculturas foram produzidas com 20 g de fezes misturadas com vermiculita e levadas à câmara incubadora a 26°C durante quinze dias para obtenção de larvas infectantes, que posteriormente foram identificadas conforme Keith (1953).

2.4 Amostras de pasto

A cada 15 dias, duas amostras de pastagem (0 – 20 e 20 – 40 cm de distância do bolo fecal) foram coletadas dos piquetes dos grupos tratado e controle em (W) a partir de seis pontos alternados, de acordo com Raynaud & Gruner (1982). Amostras de 500 g de pastagem foram utilizadas para recuperar as larvas

infectantes (L3) seguindo a metodologia descrita por Lima (1989). Posteriormente, o sedimento foi examinado em microscópio óptico e as larvas foram contadas e identificadas segundo os critérios estabelecidos por Keith (1953).

As amostras de 500 g de pastagem que serviram para este método foram colocadas em estufa a 100°C para obtenção de matéria seca. Os dados obtidos foram transformados no número de larvas por quilograma de matéria seca.

2.5 Ganho de peso dos animais

O peso dos animais foi estimado mensalmente utilizando fita barimétrica, sendo que no início e no final do experimento foi estimado por balança.

2.6 Dados climáticos

Os dados climáticos referentes às médias de temperaturas mínimas e máximas mensais e precipitações pluviiais mensais foram registrados diariamente em uma estação meteorológica especializada no Campus da Universidade Federal de Viçosa / MG, Brasil.

2.7 Isolamento e identificação de fungos nematófagos

Amostras de solo e fezes de ambos os grupos foram coletadas no período de julho de 2016 e janeiro de 2017. Cada piquete foi dividido em quatro quadrantes e as amostras coletadas aleatoriamente. As amostras de solo foram homogeneizadas e processadas em triplicata pela técnica de espalhamento do solo de Duddington (1950) modificada por Santos (1991) que consiste em semear dois gramas da amostra de solo no centro da placa de Petri contendo meio de cultura ágar-água 2%. Para as amostras de fezes foi realizado o mesmo procedimento. Para estimular o desenvolvimento das estruturas predatórias pelos fungos nematófagos foram utilizados nematoides de vida livre *Panagrellus* sp. As placas semeadas foram incubadas em estufa BOD a 25°C. Semanalmente estas placas foram visualizadas por um período de dois meses. Ao identificar o aprisionamento de nematoides na placa de Petri, repiques do fungo foi coletado com uma alça de platina e transferido para uma placa de Petri contendo meio de cultura CMA (corn meal agar) 2% e colocados *Panagrellus* sp. e incubada em estufa BOD a 25°C para desenvolvimento e purificação das colônias fúngicas. A identificação dos fungos isolados foi realizada

por exame direto em que foram coletados fragmentos das colônias fúngicas com uma alça de platina e dispostos entre lâmina e lamínula. A visualização das estruturas fúngicas foi realizada através de microscópio óptico tendo como base as chaves classificatórias de Cooke & Godfrey (1964), Van Oorschot (1985) e Liu & Zhang (1994).

2.8 Análise estatística

As médias das contagens de ovos por gramas de fezes (OPG), dos nematoides que foram recuperados nas coproculturas e das L3 das pastagens, do peso dos grupos de animais e dos dados climáticos, durante os 12 meses de experimento, foram convertidos para médias mensais. Posteriormente os dados foram transformados para $\log(x+1)$ e em seguida os resultados foram analisados por teste t Student a 1% e 5 % de probabilidade. Os dados de OPG, coproculturas e o número de larvas recuperadas nas pastagens também foram submetidos à análise de regressão linear e correlação. Todas as análises foram realizadas utilizando o software IBM SPSS Statistics 2.0.

3 Resultados

A figura 1 mostra que os valores médios dos OPG dos animais do grupo controle nos meses de março, maio, julho, setembro, outubro e dezembro de 2016 e janeiro de 2017 foram numericamente maiores do que os valores médios dos OPG do grupo tratado, mas em nenhum dos meses houve diferença estatística entre as médias de OPG dos grupos tratados e controle ($p>0,05$).

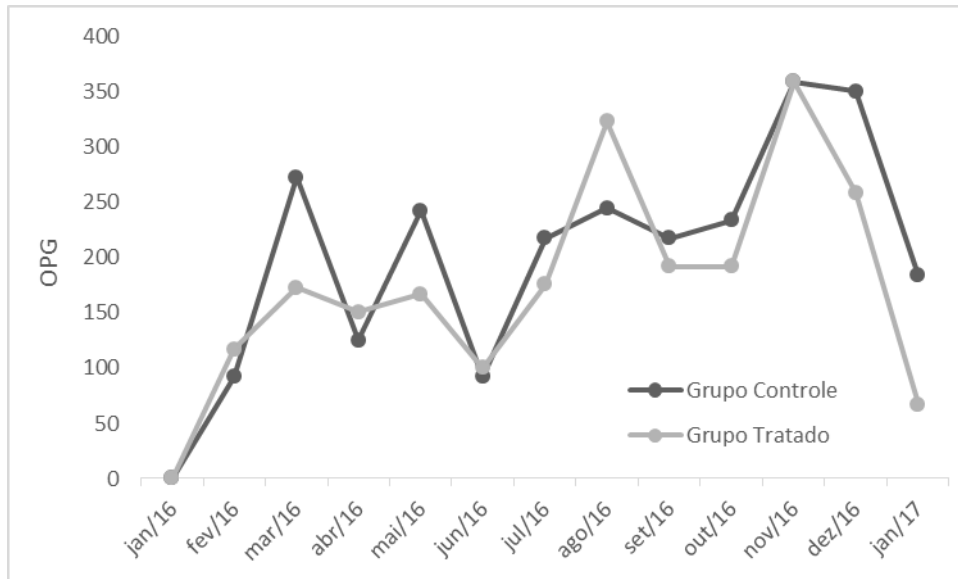


Figura 1: Médias mensais do número de ovos por grama de fezes do grupo tratado com fungo *Arthrobotrys cladodes* var *macroides* (linha cinza) e do grupo controle (linha preta) coletados de janeiro de 2016 a janeiro de 2017, em Viçosa, MG.

Durante todo o período experimental não foram detectadas diferenças ($p > 0,05$) no peso dos animais do grupo tratado com o fungo em relação ao grupo controle (figura 2). O ganho de peso médio do grupo tratado durante o período experimental foi de 189,17kg e do grupo controle de 180kg.

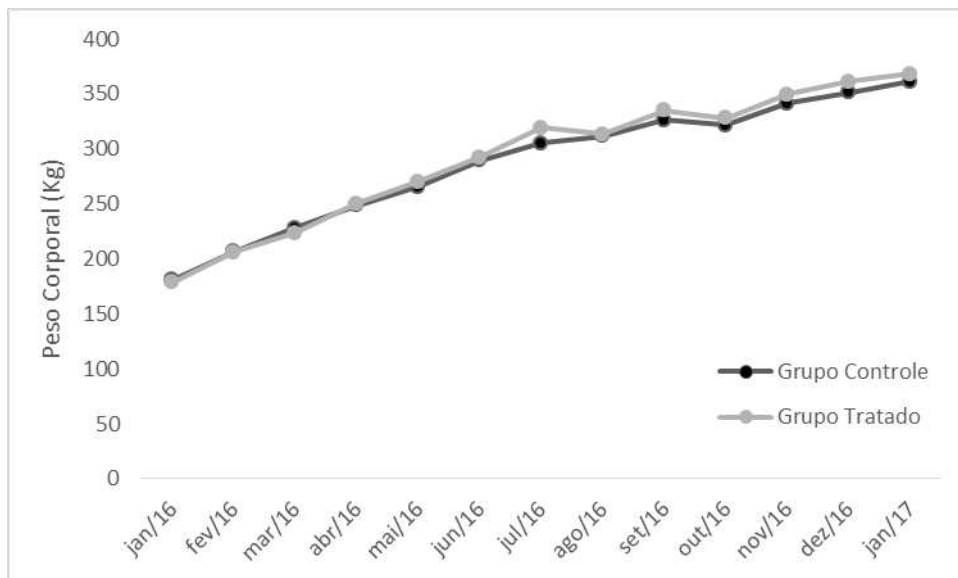


Figura 2: Médias mensais do peso corporal dos animais do grupo tratado com o fungo (linha cinza) e do grupo controle (linha preta) registrados durante o período de janeiro de 2016 a janeiro de 2017.

A figura 3 demonstra que as temperaturas médias mensais oscilaram entre 17,2°C em julho de 2016 e 23,8°C em fevereiro de 2016. A precipitação pluvial mensal oscilou entre zero no mês de julho de 2016 e 355,7mm em janeiro de 2016. A menor umidade relativa foi de 69,5% registrada em agosto de 2016 e a máxima foi de 97,1 % em maio de 2016.

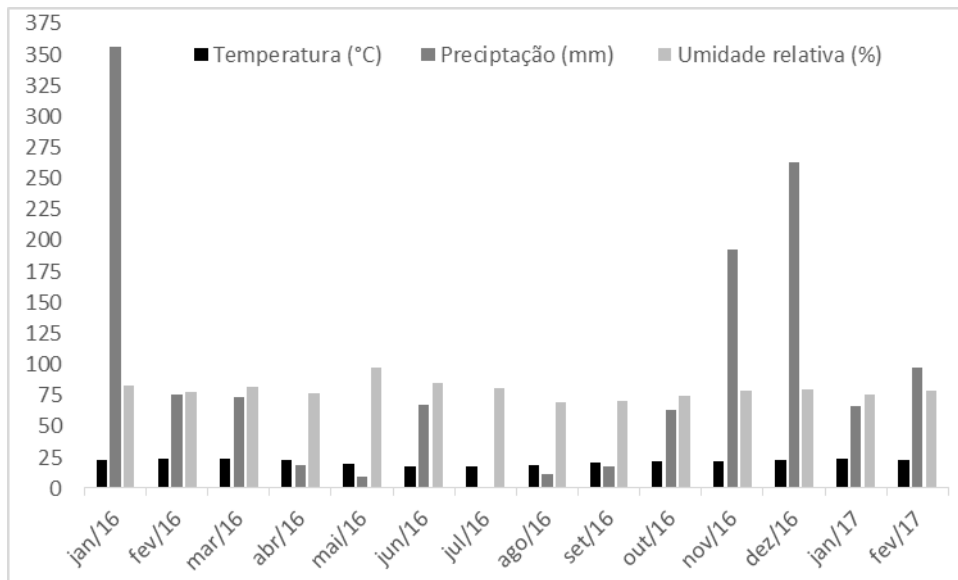


Figura 3: Médias mensais de temperatura (barra preta), precipitação (barra cinza escuro) e umidade relativa (barra cinza claro) registrada durante o período experimental de janeiro de 2016 a janeiro de 2017.

As médias de larvas recuperadas em ambas as distâncias do bolo fecal entre o grupo tratado e controle diferiram significativamente ($p \leq 0,05$) indicados pela tabela 1.

Tabela 1: Valores médios de larvas infectantes por quilograma de matéria seca recuperadas da pastagem nas distâncias de 20cm e 40cm do bolo fecal dos grupos controle e tratado com *Arthrobotrys cladodes* var *macroides* no período de fevereiro de 2016 a fevereiro de 2017.

	Larvas/Kg MS (20 cm)		Larvas/Kg MS 40 cm)		
	Grupo Controle	Grupo Tratado	Grupo Controle	Grupo Tratado	
Fev/16	57	30	Fev/16	39	9
Mar/16	101	54	Mar/16	74	64
Abr/16	132	69	Abr/16	113	51
Mai/16	51	65	Mai/16	31	29
Jun/16	36	22	Jun/16	76	29
Jul/16	46	47	Jul/16	21	32
Ago/16	80	40	Ago/16	45	30
Set/16	17	14	Set/16	16	4
Out/16	19	3	Out/16	13	10
Nov/16	36	15	Nov/16	24	39
Dez/16	244	17	Dez/16	91	22
Jan/17	138	17	Jan/17	139	9
Fev/17	100	34	Fev/17	74	34
Média	81^A	33^B	58^C	28^D	

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($p \leq 0,01$).

O percentual médio anual das coproculturas demonstrou que *Haemonchus* sp. foi o mais prevalente seguido por *Cooperia* sp. e *Oesophagostomum* sp. em ambos os grupos e não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) indicado pela Figura 4.

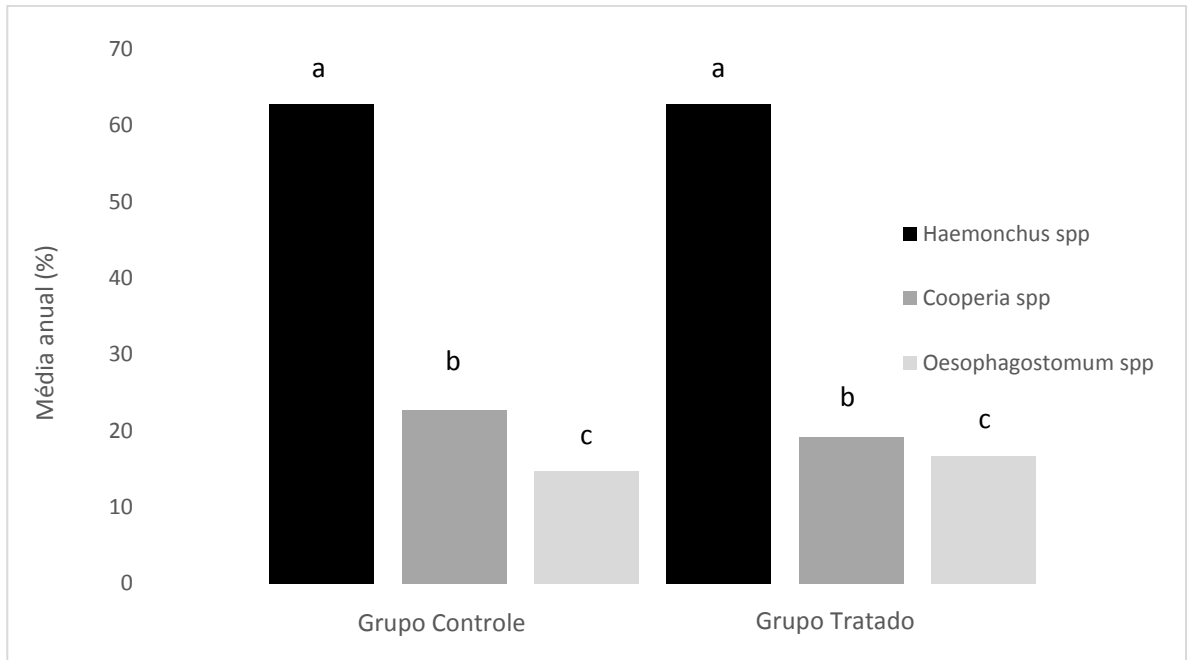


Figura 4: Média anual de larvas por gênero recuperadas das coproculturas do grupo controle e do grupo tratado com o fungo *Arthrobotrys cladodes var macroides*. Mesmas letras indicam a não diferença estatística ($p > 0,01$).

Os coeficientes de correlação e de determinação entre a média de ovos por grama de fezes (OPG) do grupo controle com as médias de larvas infectantes recuperadas da pastagem na distância de 0-20cm do bolo fecal foi de 0,50; 0,25 enquanto na distância de 20-40cm do bolo fecal foi de 0,52; 0,27, respectivamente. No grupo tratado os coeficientes de correlação e de determinação entre o OPG e as larvas infectantes recuperadas da pastagem na distância de 0-20cm do bolo fecal foi -0,44; 0,19 e para a distância de 20-40cm foi de -0,29; 0,09, respectivamente.

Nas amostras de fezes e solo foram confirmadas a presença dos fungos *Arthrobotrys cladodes var macroides*, *Arthrobotrys musiformis* e *Monacrosporium eudermatum* (figura 5).

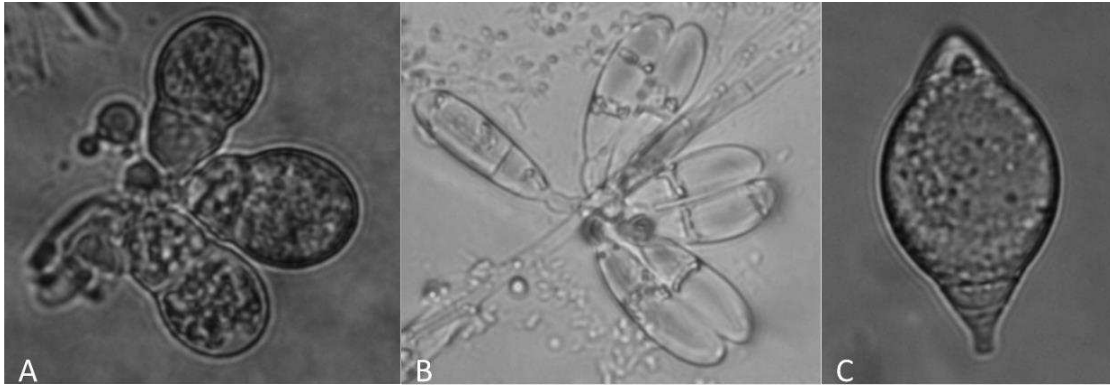


Figura 5: Conídios dos fungos isolados e identificados nas amostras de fezes e solo dos grupos experimentais. (A) *Arthrobotrys cladodes* var *macroides*; (B) *Arthrobotrys musiformis* e (C) *Monacrosporium eudermatum*.

4 Discussão

Este é o primeiro trabalho realizado em condições ambientais em que foi utilizado o fungo nematófago *Arthrobotrys cladodes* var *macroides* em matriz de alginato de sódio como controlador biológico de formas infectantes de nematoides parasitos gastrintestinais de bovinos.

As médias mensais de ovos por grama de fezes não diferiram significativamente ($p > 0,05$) entre o grupo tratado e controle. Contudo como podem ser observados os valores médios das contagens de ovos do grupo controle nos meses de março, maio, julho, setembro, outubro e dezembro de 2016 e janeiro de 2017 foram numericamente maiores das contagens de ovos do grupo tratado. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Silva et al. (2010) os quais forneceram peletes de matriz de alginato de sódio contendo os fungos *Duddingtonia flagrans* e *Arthrobotrys robusta* para o controle de parasitos gastrintestinais de ovelhas. Os mesmos verificaram que as médias de OPG não diferiram significativamente entre os grupos controle e tratados, com exceção em alguns meses em que o OPG foi maior nos animais do grupo controle do que os do grupo tratado. Uma diferença importante observada por estes autores foi que os animais que receberam os peletes contendo *A. robusta* necessitaram de menor intervenção de tratamentos anti-helminticos durante o período de 6 meses de experimento. Este fato ressalta a relevância de testar constantemente diferentes espécies de fungos nematófagos, uma vez que cada uma apresentará particularidades de adaptação ao ambiente e impõe o gênero *Arthrobotrys* como uma promissora alternativa de

controle de larvas infectantes. Perez et al. (2017) administraram o fungo *Duddingtonia flagrans* em bezerros em uma fazenda de produção de leite orgânico no México e nenhuma redução nos valores de OPG foi registrada, uma vez que não é esperada nenhuma ação direta sobre ovos de helmintos gastrintestinais. O mesmo foi verificado por Silva et al. (2014) que testaram a efetividade de *Duddingtonia flagrans* e *Monacrosporium thaumasium* em péletes de alginato de sódio administrados em bovinos e não diferiu estatisticamente ($p>0,05$) o OPG entre os animais dos grupos tratados e controle demonstrando que os fungos nematófagos são controladores ambientais e não atuam diretamente na redução do parasitismo clínico. Deve ser considerado no presente trabalho de que os animais foram desverminados no início do experimento e como a administração de bases químicas não reduz os estádios de vida livre no ambiente, os animais foram infectados novamente antes de um possível crescimento e estabelecimento do fungo no ambiente. Talvez menores valores de OPG juntamente ao longo de um maior tempo de avaliação pudesse ser observado, se os animais fossem desverminados em um segundo momento onde o fungo já estivesse adaptado ao solo predando as larvas de nematoides. Vale também ressaltar que os animais de ambos os grupos receberam diariamente suplementação alimentar, o que pode ter influenciado a não diferença nos valores de OPG dos animais do grupo controle e tratado. Pois há uma relação entre a qualidade da dieta e a intensidade da infecção do hospedeiro. A adequada suplementação nutricional, especialmente a proteica, propicia melhor eficiência na resposta imunológica o que permite maior capacidade de tolerância dos animais frente às adversas consequências do parasitismo (Cezar et al. 2008 e Molento et al. 2013).

Quanto ao ganho de peso não foi observada diferença significativa ($p>0,05$) durante todo o período experimental entre os dois grupos. O ganho de peso médio diário dos animais do grupo tratado foi de 518g, enquanto os animais do grupo controle ganharam uma média de 493g/dia. Nenhuma diferença significativa ($p>0,05$) no ganho de peso corporal dos animais entre os grupos tratados e controles na avaliação dos fungos *Duddingtonia flagrans* e *Monacrosporium thaumasium* foi verificada por Silva et al. (2014), mas entre os tempos de tratamento, um ganho em peso vivo foi estatisticamente significativo. Um maior ganho de peso nos animais do grupo tratado em relação ao grupo controle foi observada por Assis

et al. (2013) quando estes compararam a ação dos fungos *Duddingtonia flagrans* e *Monacrosporium thaumasium* em bovinos no Sudeste brasileiro. No presente trabalho verificou-se também que o ganho de peso se manteve crescente nos dois grupos, com exceção apenas nos meses de agosto e outubro de 2016 em que os dois grupos apresentaram leve redução corporal. Por outro lado Assis et al. (2013) relatou quedas importantes durante a estação seca devido a uma marcada redução na produção e valor nutritivo da pastagem. A proporção de matéria seca disponível na pastagem é uma das variáveis mais importantes para determinar o risco de infecção parasitária. Dependendo da quantidade de L3 ingerida por dia pode haver uma redução na eficiência do uso de nutrientes ingeridos e levar a uma queda de até 50% no ganho de peso dos animais (Heckler & Borges et al. 2016).

Diversos são os fatores que interferem na migração, sobrevivência, manutenção e quantidade de nematoides gastrintestinais no ambiente e, conseqüentemente, influenciam a taxa de infecção dos animais. Durante o período experimental as temperaturas médias mensais oscilaram entre 17,2°C (registrada em julho de 2016) e 23,8°C (registrada em fevereiro de 2016). A precipitação pluvial mensal oscilou entre zero no mês de julho de 2016 e 355,7mm registrados em janeiro de 2016. A menor umidade relativa foi de 69,5% registrada em agosto de 2016 e a máxima foi de 97,1 % em maio de 2016. A dinâmica climática exibida no presente estudo foi favorável ao movimento das larvas na pastagem. De acordo com Heckler & Borges (2016) em regiões tropicais, como o Brasil, o clima é favorável à produção pecuária, mas, as mesmas condições ambientais que favorecem a criação de gado também ajudam as larvas infectantes de nematóides parasitos a viver e se multiplicar durante todo o ano.

Arthrobotrys cladodes var *macroides* apresentou redução satisfatória da contaminação ambiental por nematoides gastrintestinais. No presente estudo, as médias de larvas recuperadas em ambas as distâncias entre o grupo tratado e controle diferiram significativamente ($p < 0,05$) e as reduções em L3 recuperadas de pastagens foram de 59% na distância de 0-20 cm e 52 % a 20-40 cm do bolo fecal. Percentuais de redução semelhantes a estes foram encontrados por Assis et al. (2015) quando estes testaram a administração de peletes contendo micélio do fungo nematófago *Monacrosporium thaumasium* avaliada no controle biológico de tricostrongilídeos de bovinos de corte. A massa fecal pode servir como importante

reserva para fases infectantes, mesmo durante os períodos prolongados de seca (Verschave et al. 2016). O coeficiente de correlação entre a média de ovos por grama de fezes (OPG) do grupo controle com as médias de larvas infectantes recuperadas da pastagem na distância de 0-20cm do bolo fecal foi de 0,50 enquanto na distância de 20-40cm do bolo fecal o coeficiente de correlação foi de 0,52. No grupo tratado o coeficiente de correlação entre o OPG e as larvas infetantes recuperadas da pastagem na distância de 0-20cm do bolo fecal foi -0,44 e para a distância de 20-40cm foi de -0,29. Os coeficientes de determinação foram baixos não ultrapassando 29%. A correlação positiva encontrada no grupo controle indica que o aumento do OPG dos animais foi acompanhado por uma elevação dos números de larvas recuperadas. O grupo tratado apresentou correlação negativa, indicando que mesmo o OPG estando alto o número de larvas na pastagem foi reduzido devido à ação do fungo. Assis et al. (2013) citaram que as correlações significativas entre OPG e L3 em pastagem indicam que a contaminação ambiental é um fator importante no aumento da carga parasitária de animais. Além dos nematoides gastrintestinais de bovinos a presença de nematoides de vida livre foi constante em todo o período experimental indicando que o fungo não causou desequilíbrio ambiental.

As coproculturas indicaram a presença dos gêneros *Haemonchus* sp., *Cooperia* sp. e *Oesophagostomum* sp. Estes mesmos gêneros foram encontrados por Assis et al. (2012), (2013) e (2015) e Silva et al. (2014). O percentual médio anual, nos grupos tratado e controle demonstrou que *Haemonchus* sp. foi o gênero mais prevalente seguido por *Cooperia* sp. e *Oesophagostomum* sp. ($p \leq 0,05$). Já nos trabalhos de Silva et al. (2014) e Assis et al. (2015) *Cooperia* sp. foi o gênero de maior predominância. Heckler & Borges (2016) citam que *Haemonchus* sp., é um helminto amplamente distribuído no Brasil e no mundo, sobrevivendo em temperaturas mais baixas e é menos sensível à radiação ultravioleta, se comparado a nematóides de outros gêneros, justificando a sua prevalência. Ocorreram apenas dois períodos em que diferenças significativas ($p \leq 0,05$) na predominância mensal dos gêneros entre o grupo tratado e controle foi observada. O gênero *Oesophagostomum* sp. foi significativamente maior ($p < 0,05$) no grupo controle em maio de 2016, enquanto o gênero *Haemonchus* sp. do grupo tratado foi maior do que o controle em julho de 2016. Os gêneros *Cooperia* e *Oesophagostomum* são

melhores adaptados a temperaturas entre 13 e 26°C e a baixas precipitações. De acordo com Heckler & Borges (2016) o gênero *Oesophagostomum* sp. ocorre com menor frequência porque além de apresentar maior robustez também tem ondulações na cutícula que dificultam o movimento.

As amostras de fezes e solo coletadas em dois períodos do experimento foram importantes para visualizar a presença do fungo nematófago *Arthrobotrys cladodes var macroides* e de outros fungos. O fungo encontrou-se disperso em todos os quadrantes avaliados, inclusive nas amostras de fezes e solo do grupo controle. Este fato pode ser justificado pelas condições ambientais favoráveis ao seu crescimento o que propiciou a dispersão de esporos para áreas de pastagens adjacentes, uma vez que os piquetes eram muito próximos. A presença de outros isolados fúngicos colonizando o solo e as fezes indicam que a introdução de forma inundativa no grupo tratado com *Arthrobotrys cladodes* não levou a inibição de espécies pré-existentes. De acordo com Mota et al. (2003) com a colonização do fungo no ambiente, os clamidósporos podem atingir a pastagem sendo frequente sua ingestão juntamente com o pasto, o que proporciona sua permanência no ambiente.

No presente trabalho, a administração do micélio de *Arthrobotrys cladodes var macroides* por meio de matriz de alginato de sódio, duas vezes na semana, diminuiu a infestação de larvas na pastagem, sugerindo a espécie como controlador biológico promissor no combate das formas infectantes de nematoides presentes no meio ambiente.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, Fapemig e a CAPES pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- ANAN'KO, G. G. & TEPLYAKOVA, T. V. Factors responsible for transition of the *Duddingtonia flagrans* carnivorous fungus from the saprotrophic to the zootrophic nutrition type. **Mikrobiologiya**, v. 80, n. 2, p. 200–206, 2011.
- ASSIS, R.C.L.; LUNS, F.D.; ARAÚJO, J.V.; BRAGA F.R. Biological control of trichostrongyles in beef cattle by the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in tropical southeastern Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 132, p.373–377, 2012.
- ASSIS, R.C.L.; LUNS, F.D.; ARAÚJO, J.V.; BRAGA F.R.; ASSIS, R.L.; MARCELINO, J.L.; FREITAS, P.C.; ANDRADE, M.A.S. Comparison between the action of nematode predatory fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* in the biological control of bovine gastrointestinal nematodiasis in tropical southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 193, p.134–140, 2013.
- ASSIS, R.C.L.; LUNS, F.D.; ARAÚJO, J.V.; BRAGA F.R.; ASSIS, R.L.; MARCELINO, J.L.; FREITAS, P.C.; ANDRADE, M.A.S. An isolate of the nematophagous fungus *Monacrosporium thaumasium* for the control of cattle trichostrongyles in southeastern Brazil. **Journal of Helminthology**, v. 89, p.244–249, 2015.
- BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V. Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 71-82, 2014.
- CEZAR, A.S.; CATTO, J.B.; BIANCHIN, I. Controle alternativo de nematoides gastrintestinais dos ruminantes: atualidades e perspectivas. **Ciência Rural**, v.38, n.7, p.2083-2091, 2008.
- CHARLIE, J.; VOORT, M.V.D.; KENYON, F.; SKUCE, P.; VERCRUYSSSE, J. Chasing helminths and their economic impact on farmed ruminants. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 7, p. 361-367, Jul. 2014.
- CLAUDINO, L. S. D. **Discursos e práticas sociais da sustentabilidade a partir da pecuária bovina brasileira**. Sustentabilidade em Debate, Brasília, v. 5, n. 3, p. 184-202, set./dez. 2014. Disponível em: <<http://periodicos.unb.br/index.php/sust/article/view/10597>>. Acesso em: 30 nov. 2016.
- COOKE, R. C.; GODFREY, B. E. S. A key of nematode destroying fungi. **Transactions British Mycological Society**, Cambridge, v. 47, p. 61-74, 1964.
- DUDDINGTON, C. L. A new predacious species of *Trichotecium*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 32, p. 284-287, 1950.
- GORDON, H. M.; WHITLOCK, H. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v.12, p.50-52, 1939.

GRISI, L.; LEITE, R.C.; MARTINS, J.R.S.; BARROS, A.T.M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P.H.D.; LEÓN, A.A.P.; PEREIRA, J.B.; VILLELA, H.S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 150-156, abr./jun. 2014.

HECKLER, R.P. & BORGES, F.A. Climate variations and the environmental population of gastrointestinal nematodes of ruminants. **Nematoda**, n.3, 2016.

KEITH, R.K. The differentiation on the infective larvae of some common nematode parasites of cattle. **Australian Journal of Zoology**, v.1, p.223-235, 1953.

LACKEY, B.A.; MULDOON, A.E.; JAFFE, B.A. Alginate pellet formulation of *Hirsutella rossiliensis* for biological control of plant-parasitic nematodes. **Biological Control**, v.3, p.155-160, 1993.

LIMA, W.S. **Dinâmica das populações de parasitos gastrintestinais em bovinos de corte, alguns aspectos da relação parasito-hospedeiro e do comportamento dos estádios de vida livre na região do vale do Rio Doce, MG. Brasil.** Tese de Doutorado. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 178p., 1989.

LIU, X.Z.; ZHANG, K.Q. Nematode-trapping species of *Monacrosporium* with special reference to two new species. **Mycological Research**, v. 98, n.8, p.862-868, 1994.

MOLENTO, M.B.; VERÍSSIMO, C.J.; AMARANTE, A.T.; WYK, J.A.; CHAGAS, A.C.S. ARAÚJO, J.V.; BORGES, F.A. Alternativas para o controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.80, n.2, p.253-263, 2013.

MOTA, M.A. et al. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 3, p. 93-100, 2003.

PERÉZ, D.O.O.; MUÑOZ, B.S.; TORAL, J.N.; ZEBADÚA, M.A.O.; LÓPEZ, J.L.C.; GARCÍA, M.E.R.; DE GIVES, P.M. Using *Duddingtonia flagrans* in calves under an organic milk farm production system in the Mexican tropics. **Experimental Parasitology**, v. 175, p. 74-78, 2017.

POWERS, K.G.; WOOD, I.B.; ECKERT, J.; GILSON, T.; SMITH, H.J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) Guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine and ovine). **Veterinary Parasitology**, V.10, P.265-284, 1982.

RAYNAUD, J. P. & GRUNER, L. Feasibility of herbage sampling in large extensive and availability of cattle nematode in mountain pastures. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.10, n.1, p.57-64, 1982.

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

SILVA, M.E.; ALVES, A.P.F.; BARCELLOS, M.D. “Sustainable Beef” Práticas para a Sustentabilidade na Cadeia da Carne Bovina Gaúcha. Desenvolvimento em questão. Editora Unijuí, n. 35, p. 274-306, ano 14, jul./set. 2016.

SILVA, M.E.; BRAGA, F.R.; BORGES, L.A.; OLIVEIRA, J.M.; LIMA, W.S.; GUIMARÃES, M.P.; ARAÚJO, J.V. Evaluation of the effectiveness of *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* in the biological control of gastrointestinal nematodes in female bovines bred in the semiarid region. **Veterinary Research Communications**, v.38, p. 101-106, 2014.

SILVA, M.E.; BRAGA, F.R.; BORGES, L.A.; OLIVEIRA, P.; LIMA, W.S.; ARAÚJO, J.V. Producción de conidios y clamidosporas de los hongos *Duddingtonia flagrans* y *Monacrosporium thaumasium* en diferentes medios sólidos. **Arquivos do Instituto Biológico (Online)**, v. 82, p. 1-5, 2015.

SILVA, B.F.; CARRIJO-MAUAD, J.R.; BRAGA, F.R.; CAMPOS, A.K.; ARAÚJO, J.V.; AMARANTE, A.F.T. Efficacy of *Duddingtonia flagrans* and *Arthrobotrys robusta* in controlling sheep parasitic gastroenteritis. **Parasitology Research**, v. 106, p. 1343-1350, 2010.

SOARES, F.B. & MONTEIRO, A.C. Compatibilidade de *Metarhizium anisopliae* com carrapaticidas químicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, p. 385-391, 2011.

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

VENTURINI, T. & MENEZES, L.F.G. **Técnicas de manejo agropecuário sustentável**. Curitiba: UTFPR, 2016.

VERSCHAVE, S.H.; CHARLIE, J.; ROSE, H.; CLAEREBOUT, E.; MORGAN, E.R. Cattle and nematodes under global change: transmission models as an ally. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 9, p. 724-738, set. 2016.

WALKER, H.L.; CONNICK, W.J. Sodium alginate for production and formulation of mycoherbicides. **Weed Science Journal**, v.31, p.333-338, 1983.

WOOD, J.B.; AMARAL, N.K.; BAIRDEN, K.; DUNCAN, J.L.; KASSAI, T.; MALONE, J.B.; PANKAVICH, J.A.; REINECKE, R.K.; SLOCOMBE, O.; TAYLOR, S.M.; VERCRUYSSSE, J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). **Veterinary Parasitology**, v.58, p.181-213, 1995.

4 Conclusões gerais

Arthrobotrys cladodes demonstrou atividade predatória sobre as larvas de nematoides parasitas gastrintestinais de bovinos e foi capaz de passar pelo trato gastrintestinal de ruminantes sem perder sua viabilidade.

A administração do micélio de *Arthrobotrys cladodes var macroides* por meio de matriz de alginato de sódio, duas vezes na semana, diminuiu a infestação de larvas na pastagem.