

**JÚLIA DOS SANTOS FONSECA**

**FORMULAÇÃO FÚNGICA COM O FUNGO NEMATÓFAGO *Pochonia  
chlamydosporia* NO CONTROLE BIOLÓGICO DAS NEMATODIOSES DE  
BOVINOS EM VIÇOSA-MG-BRASIL**

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*.

Orientador: Jackson Victor de Araújo

Coorientador: Argemiro Sanavria

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

F676f  
2022  
Fonseca, Júlia dos Santos, 1995-  
Formulação fúngica com o fungo nematófago *Pochonia  
chlamydosporia* no controle biológico nas nematodioses de  
bovinos em Viçosa-MG-Brasil / Júlia dos Santos Fonseca. –  
Viçosa, MG, 2022.

1 dissertação eletrônica (38 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Jackson Victor de Araújo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Veterinária, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.678>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Nematóide-das-galhas - Controle biológico. 2. Helminto.  
3. Vermes. 4. *Pochonia chlamydosporia*. I. Araújo, Jackson  
Victor de, 1962-. II. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em  
Medicina Veterinária. III. Título.

CDD 22. ed. 636.0896962

**JÚLIA DOS SANTOS FONSECA**

**FORMULAÇÃO FÚNGICA COM O FUNGO NEMATÓFAGO *Pochonia chlamydosporia* NO CONTROLE BIOLÓGICO DAS NEMATODIOSES DE BOVINOS EM VIÇOSA-MG-BRASIL**

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*.

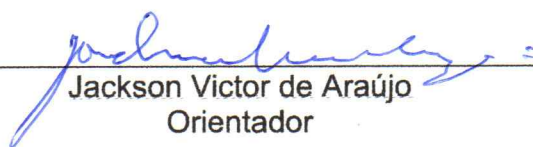
APROVADA: 03 de outubro de 2022.

Assentimento:



---

Júlia dos Santos Fonseca  
Autora



---

Jackson Victor de Araújo

Orientador

*A minha mãe e minha família.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

A Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

A minha mãe, por ser a pessoa mais importante em minha jornada, pelo apoio incondicional que sempre me deu mesmo de longe e por ser o motivo de cada passo meu.

A toda minha família, pela base e por estarem sempre comigo apesar da distância.

Ao meu tio Wagner, pelo incentivo a pesquisa e sonho de que eu fizesse mestrado, desde quando ingressei na Medicina Veterinária. E, por ter sido o principal responsável em persistir para que eu entrasse em uma Universidade.

A minha prima Rafaela, pela sua luta pela educação comigo, por acreditar em mim e ser apoio, lar.

Ao meu orientador, professor Jackson Victor, por ter me recebido de braços abertos desde o primeiro contato antes que eu tentasse o processo seletivo, depois, pela orientação sem igual ao longo de cada etapa do mestrado.

Ao professor Argemiro Sanavria, por ter me indicado ao meu orientador, por me acompanhar mesmo quando estava longe e no final do mestrado, me receber novamente na UFRRJ como meu coorientador, para desempenhar mais pesquisas e por ter dividido seu espaço comigo para que eu desenvolvesse a escrita.

Ao professor José Luis Luque, por todo incentivo e por acreditar tanto em mim, sempre.

Ao seu Tuim, pela parceria e por disponibilizar sua propriedade e os animais para a realização do experimento. Também por toda ajuda que me deu ao longo das coletas.

Ao Samuel, pelo apoio fundamental que sempre me deu, por ter me recebido e por se fazer presente sempre.

Ao Vinicius, pela ajuda ao longo de todo experimento e por se fazer presente ao longo de todo meu mestrado, me acompanhando tanto na UFV quanto na Rural.

Ao Cauzinho, professor Artur Kanadani, Adão, Cláudio, pelas conversas e por fazer os dias melhores ao longo do experimento.

A Rosi, por ter me ajudado sempre, desde o processo seletivo, até o final.

A Maria Rita, por ter sido minha companhia durante o tempo que morei em Viçosa, pela sua amizade comigo e companheirismo.

Ao meu amigo Erinaldo, pela sua importância em todo processo, antes do mestrado, na seleção, durante todo o período e pelo seu apoio em etapas chaves da minha formação.

A Maria Eduarda por ter sido tão importante durante meu mestrado.

Aos meus queridos amigos, Daniele, Daniel, Vinicius, Tiago, Raone, Lucas Rodrigo, Samuel, Taciano, Germán, Pedro e as meninas do F1037, Victória, Duda, Ligia e Bruna pela amizade e apoio que me deram na reta final do meu mestrado.

Ao Laboratório de Doenças Parasitárias e ao Departamento de Veterinária da UFV.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

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

*“Porque se chamavam homens, também se chamavam  
sonhos e sonhos não envelhecem”.*

(Milton Nascimento)

## RESUMO

FONSECA, Júlia dos Santos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2022. **Formulação fúngica com o fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia* no controle biológico das nematodioses de bovinos em Viçosa-MG-Brasil.** Orientador: Jackson Victor de Araújo. Coorientador: Argemiro Sanavria.

No controle de vermes bovinos, destaca-se o controle biológico por fungos nematófagos, principalmente *Pochonia chlamydosporia* que causa a destruição de ovos de helmintos. Este estudo teve como objetivo testar a eficácia de uma formulação contendo o fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia* para o controle biológico da nematodiose bovina. Doze bovinos foram divididos em dois grupos: grupo controle (GC) e grupo que recebeu a formulação (GT). Durante seis meses, no GT cada animal recebeu 1g ( $10^5$  chlamidósporos) de *Pochonia chlamydosporia* para cada 10 kg de peso vivo animal, administrado diariamente conjuntamente com ração comercial. Já no GC cada animal recebeu a mesma dosagem, porém, do placebo (farelo de arroz), sem o fungo adicionado a ração. Amostras de fezes e pastagens foram coletadas para a pesquisa de nematoides gastrointestinais. Vermes pulmonares e trematódeos foram investigados. Os animais foram pesados mensalmente. As médias de temperatura e precipitação foram registradas. A oferta do fungo *Pochonia chlamydosporia* não foi eficaz na redução dos ovos por grama de fezes de nematóides gastrointestinais (OPG) dos animais, não diferindo estatisticamente ( $p>0,05$ ) entre os grupos. Os valores médios de larvas recuperadas no pasto não diferiram significativamente ( $p>0,05$ ). O gênero *Haemonchus* sp. foi o mais prevalente. Não houve correlação entre o número de larvas com temperatura e precipitação ( $p>0,05$ ). Houve diferença estatisticamente significativa ( $p<0,05$ ) na penúltima pesagem do experimento. A formulação contendo *Pochonia chlamydosporia* não foi eficiente no controle biológico de nematóides gastrointestinais bovinos.

Palavras-chave: Biocontroladores. Helmintos. Verminose.

## ABSTRACT

FONSECA, Júlia dos Santos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2022. **Fungal formulation with the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* in the biological control of bovine nematodiosis in Viçosa-MG-Brazil.** Adviser: Jackson Victor de Araújo. Co-adviser: Argemiro Sanavria.

In the control of bovine worms, biological control by nematophagous fungi stands out, especially *Pochonia chlamydosporia* which causes the destruction of helminth eggs. This study aimed to test the effectiveness of a formulation containing the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* isolated for the biological control of bovine nematodiosis. Twelve cattle were divided into two groups: control group (GC) and the group that received the formulation (GT). Feces and pasture samples were collected for the research of gastrointestinal nematodes. Lung worms and trematodes were investigated. The animals were weighed monthly. The averages of temperature and rainfall were recorded. The supply of the fungus *Pochonia chlamydosporia* was not effective in reducing the eggs per gram of faeces of gastrointestinal nematodes (EPG) of the animals, not differing statistically ( $p>0.05$ ) between the groups. The mean values of larvae recovered in the pasture did not differ significantly ( $p>0.05$ ). The genus *Haemonchus* sp. was the most prevalent. There was no correlation between the number of larvae with temperature and rainfall ( $p>0.05$ ). There was a statistically significant difference ( $p<0.05$ ) in the penultimate weighing of the experiment. The formulation containing *Pochonia chlamydosporia* was not efficient in the biological control of bovine gastrointestinal nematodes.

Keywords: Helminthosis. Helminths. Parasitic nematodes.

## SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO GERAL .....	11
2.REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 Bovinocultura.....	12
2.2 Sanidade animal e as parasitoses.....	12
2.3 Verminose bovina.....	12
2.4 Gênero <i>Cooperia</i> .....	13
2.5 Gênero <i>Haemonchus</i> .....	14
2.6 Gênero <i>Oesophagostomum</i> .....	14
2.7 Gênero <i>Dictyocaulus viviparus</i> .....	15
2.8 Trematodas.....	15
2.8.1 <i>Fasciola hepática</i> .....	15
2.8.2 <i>Eurytrema coelomaticum</i> .....	16
2.9 Controle da verminose bovina.....	17
2.10 Controle biológico da verminose bovina.....	17
2.11 Fungos nematófagos.....	18
2.12 <i>Pochonia chlamydosporia</i> .....	18
2.13 Uso combinado de mais de uma espécie de controlador biológico.....	19
Referências .....	20
Capítulo 1.....	24
Efficacy of a Fungal Formulation with the Nematophagous Fungus <i>Pochonia chlamydosporia</i> in the Biological Control of Bovine Nematodiosis.....	25
Abstract .....	26
1. Introduction.....	27
2. Results and Discussion.....	28
3. Materials and Methods.....	33
4. Conclusions.....	34
Author Contributions.....	34
Funding.....	34
Institutional Review Board Statement.....	34
Informed Consent Statement.....	35
Data Availability Statement.....	35
Acknowledgments.....	35

References.....	35
3.CONCLUSÕES GERAIS.....	38

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A verminose bovina é uma das principais causas de prejuízos na bovinocultura. O desenvolvimento dessa atividade é prejudicado por impactos, como perdas de produção, gastos com tratamentos profiláticos e curativos e a mortalidade no rebanho em casos extremos (Araújo et al., 2006).

Os gêneros de maior importância e prevalência de nematoides parasitos gastrointestinais em bovinos são *Cooperia*, *Haemonchus* e *Oesophagostomum*. A espécie *Dictyocaulus viviparus* tem importância no parasitismo dos pulmões desses animais (Moraes et al., 2021). Os trematodas, cujas espécies de importância em bovinos são: *Fasciola hepatica* e *Eurytrema coelomaticum*, parasitos de fígado e ductos pancreáticos de bovinos, respectivamente (Lugo et al., 2018; Surian et al., 2022).

Para um controle parasitário eficiente, se torna necessário conhecer a epidemiologia dos parasitos. Utilizando esses conhecimentos, medidas profiláticas podem ser utilizadas para o controle eficaz, diminuindo o uso de produtos químicos, quadros de resistência anti-helmíntica e a dependência do uso de anti-helmínticos, quando associado a outros métodos de controle. Um desses métodos é o controle biológico por fungos nematófagos (Araújo et al., 2006).

Fungos nematófagos predadores e ovicidas foram comprovadamente testados em diversas pesquisas *in vitro* e *in vivo* na diminuição de infecções causadas por nematoides gastrintestinais em animais domésticos (Braga et al., 2014). De acordo com Frassy et al. (2010), estão presentes no meio ambiente e sua ação acontece nas fezes do animal no solo. Essa ação consiste na destruição dos ovos ou larvas de vida livre. No caso dos fungos ovicidas, esses causam alterações na casca do ovo e embrião dos nematoides.

Dentre os fungos utilizados para o controle biológico está a espécie *Pochonia chlamydosporia*, que se destaca e é amplamente estudada como biocontrolador (Li et al., 2022). Essa ação consiste na produção de proteases (enzimas extracelulares) que possui atividade ovicida contra os ovos de helmintos no ambiente das fezes. Além disso, essa espécie de fungo pode produzir extratos enzimáticos contra substratos sólidos, como proteínas, lipídeos e polissacarídeos (Braga et al., 2011).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Bovinocultura

O Brasil possui o maior rebanho comercial de bovinos do mundo, é referência na produção de carne e leite, ocupando lugar de destaque internacional (IBGE, 2018), sendo a pecuária uma das atividades mais importantes para a economia do país (FAO, 2019).

O Brasil se destaca na bovinocultura de corte, sendo um líder em exportações de carne (MAPA, 2015), e, segundo Charlier et al. (2014), há a necessidade do aumento da produção de carne para atender a demanda crescente da população mundial, com 7,2 bilhões atuais para 9,6 bilhões em 2050. Em relação à produção de leite, a bovinocultura leiteira é fundamental para o desenvolvimento econômico do país (MAPA 2018). Além de todas as transformações pelas quais essa atividade já passou, ainda é necessário e possível que o país melhore sua produção em relação a outros países (EMBRAPA, 2019).

### 2.2 Sanidade animal e as parasitoses

Um dos fatores mais importantes dentro da produção animal é a saúde dos rebanhos. Nessa, as parasitoses ocupam lugar de destaque. Os endo e ectoparasitos são considerados uma das maiores causas de perdas econômicas na América Latina, assim como em outras regiões subtropicais e tropicais do mundo (Molento et al., 2013). Dentre esses, helmintos gastrointestinais em bovinos levam a perdas econômicas de \$7,11 bilhões (Grisi et al., 2014). A maior parte dos rebanhos brasileiros são caracterizados pela produção de carne e leite a pasto (Charlier et al., 2014), sendo assim, as infecções pelos parasitos presentes nas pastagens é recorrente, uma vez que esses animais estão sendo constantemente desafiados (Dias et al., 2007).

### 2.3 Verminose bovina

A verminose bovina é uma doença determinada pela presença de nematoides gastrointestinais ou pulmonares em bovinos. Esse parasitismo, está relacionado ao menor ganho ou perda de peso, além da predisposição a doenças infecciosas. O clima da maioria das regiões brasileiras favorece o desenvolvimento dessas parasitoses. Aliado a isso, os vermífugos químicos são as opções de controle mais comercializados

no Brasil, mas seu uso indiscriminado, tem levado a resistência aos produtos, além dos custos ligados a mão de obra para sua aplicação. Esses fatores contribuem para as elevadas perdas produtivas e econômicas na bovinocultura do país (Azevêdo et al., 2008). Neste cenário, o uso de métodos de controle alternativos para reduzir a contaminação ambiental das formas infectantes e seus ovos são importantes para um controle eficiente da verminose bovina (Braga et al., 2011).

Os sintomas no rebanho se apresentam de forma clínica ou subclínica, irão variar de acordo com a idade do animal parasitado, seu estado nutricional e a espécie predominante do parasito que está acometendo esse hospedeiro. Mesmo que muitos animais não manifestem sintomatologia grave, pode ocorrer a diminuição da conversão alimentar e conseqüentemente perdas de produção. Os principais sintomas são: anorexia, com conseqüente perda de peso, pelos secos e arrepiados, anemia e edema submandibular (Bergamo et al., 2020).

Segundo Monteiro (2017), no caso de helmintoses pulmonares, o animal poderá apresentar dificuldade respiratória, taquipneia e tosse. Pode ainda, ocorrer o desenvolvimento da broncopneumonia verminótica, principalmente em bezerras, como resultado da inflamação e/ou infecção nos brônquios e bronquíolos pulmonares. Os gêneros de maior importância e prevalência de nematoides parasitos gastrointestinais em bovinos são *Cooperia*, *Haemonchus* e *Oesophagostomum*. A espécie *Dictyocaulus viviparus* tem importância no parasitismo dos pulmões desses animais. E, os trematodas, cujas espécies de importância em bovinos são: *Fasciola hepatica* e *Eurytrema coelomaticum*, parasitos de fígado e ductos pancreáticos, respectivamente.

#### 2.4 Gênero *Cooperia*

Esse gênero tende a ser o de maior prevalência em bovinos no Brasil. Sendo mais encontrado em animais jovens. As principais espécies que acometem bovinos são: *C. oncophora*, *C. pectinata* e *C. punctata*. O local de parasitismo é o intestino delgado, situando-se preferencialmente na metade, podendo ocorrer uma certa mobilidade do parasito entre a parte anterior e posterior (Maia e Mattos, 2020).

Seu ciclo de vida é direto, possui uma fase de vida livre (que ocorre nas pastagens) e de vida parasitária. O contato desse helminto com as vilosidades intestinais causa irritação na parede do intestino, podendo determinar a destruição dessas vilosidades. Dessa forma, pode ser ocasionado um processo inflamatório, com

formação de exsudato catarral e espessamento da mucosa. Conseqüentemente, levando ao aumento do peristaltismo, alterações de secreção e diminuição da absorção de nutrientes, levando ao quadro de diarreia. A diarreia pode evoluir para desidratação e óbito do animal (Monteiro, 2017).

## 2.5 Gênero *Haemonchus*

Os helmintos do gênero *Haemonchus* levam a elevadas perdas econômicas na bovinocultura. Em especial, na categoria de bezerros, com uma das maiores ocorrências no país (Marmitt et al., 2020). É identificado nos estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Piauí e Rio Grande do Sul. As espécies de importância são: *H. contortus*, *H. placei* e *H. similis*. Seu ciclo de vida é monoxeno e direto, apresentando fase de vida livre e parasitária. Esses parasitos causam lesão no abomaso consequente a ação espoliativa sanguínea. São hematófagos, causando anemia intensa e perda de grande quantidade de sangue na fase aguda da doença. Leva a altos índices de mortalidade e sua patogenia é caracterizada principalmente pela anemia hemorrágica aguda (Maia e Mattos, 2020).

## 2.6 Gênero *Oesophagostomum*

Dentro desse gênero, a espécie *Oesophagostomum radiatum* é de importância no parasitismo de bovinos. Tem como local de parasitismo o intestino grosso dos animais (Monteiro, 2017). É de ocorrência mundial em áreas tropicais, sendo maior em épocas com elevada pluviosidade. Seu ciclo biológico também é direto, os animais se infectam quando ingerem a larva infectante (L3), que penetra na mucosa do intestino delgado ou grosso, forma grandes nódulos, dentro dos quais acontece a muda para a larva de quarto estágio (L4). Essas, migram para a superfície da mucosa e depois para o colón, para o desenvolvimento da fase adulta (Maia e Mattos, 2020).

De acordo com Monteiro (2017), a patogênese em bovinos é marcada pelos nódulos formados na parede do intestino. Em infecções agudas pode ocorrer anemia, edema submandibular e generalizado, diarreia verde-escura e emagrecimento. O controle pode ser realizado com anti-helmínticos associado a outras medidas de controle, como a rotação de pastagens e o uso do controle biológico.

## 2.7 Gênero *Dictyocaulus viviparus*

A espécie *Dictyocaulus viviparus* tem como hospedeiro os bovinos, localizando-se nos brônquios e na traqueia (Monteiro, 2017). Causa a dictiocaulose, que acontece com maior frequência em bezerros de raças leiteiras com até um ano de idade, no geral durante o primeiro período de pastejo. Quando a carga parasitária é alta, ocorrem graves alterações aos animais, podendo leva-los a morte, principalmente quando são jovens (Schade et al., 2020).

Segundo Monteiro (2017), as fêmeas dessa espécie produzem ovos com larvas totalmente desenvolvidas em seu interior. As larvas de primeiro estágio (L1) migram para a traqueia, são deglutidas e são eliminadas através das fezes. No ambiente, em condições favoráveis, passam de L1 para larva de terceiro estágio (L3) em aproximadamente cinco dias. Essas, alcançam a forragem e são ingeridas pelo animal. Após serem ingeridas, ocorre a penetração na mucosa intestinal, alcançando os linfonodos mesentéricos, nos quais acontece a muda para a larva de quarto estágio (L4). Essas, cerca de uma semana após a infecção, migram para os pulmões e alvéolos do animal através da linfa e do sangue. A última muda acontece nos bronquíolos e maturação nos brônquios. A doença caracteriza-se por bronquites e pneumonias, com isso os parâmetros respiratórios ficam alterados e os animais apresentam-se em posição ortopneica. Para o controle, o tratamento dos animais com medicamentos de amplo espectro no início da estação seca previne contra grandes infecções.

## 2.8 Trematodas

### 2.8.1 *Fasciola hepatica*

A fasciolose bovina é causada pela *Fasciola hepatica*, que tem como hospedeiro intermediário moluscos do gênero *Lymnaea* (caramujo aquático), como hospedeiros definitivos bovinos, ovinos, bubalinos, caprinos, equinos, suínos, animais silvestres e o homem como hospedeiro acidental (Silva et al., 2008).

Essa parasitose tem se expandido por vários estados brasileiros, com destaque para a região Sul e Sudeste. É de grande importância nos rebanhos bovinos, devido a diminuição na produção e qualidade do leite, perda de peso, gastos com medicamentos e condenação de fígados. Além disso, a doença também tem importância em Saúde Pública, pois se trata de uma zoonose. Nos hospedeiros

definitivos, o parasito irá acometer as vias biliares e o fígado, causando lesões graves, necrose e cirrose. Os animais se infectam quando se alimentam da vegetação contaminada pelas formas metacercárias do parasito. Nos bovinos, embora a maior prevalência seja da forma crônica, na forma aguda, poderá ocorrer edema submandibular e severas lesões hepáticas que contribuem para o óbito do animal (Silva et al., 2008).

Dentre as medidas de prevenção e controle estão o tratamento dos animais infectados, a rotação de pastagens e o combate ao hospedeiro intermediário com drenagem de campos alagados. Diante disso, especialistas têm sugerido a intervenção governamental, por meio da interação e cooperação de órgãos ligados às áreas da Saúde, Meio Ambiente, Vigilância Sanitária e Agropecuária, para um maior controle de qualidade na criação, abate, comercialização e transporte dos hospedeiros definitivos (Silva et al., 2008). Além disso, podem ser utilizados molusquicidas e competidores biológicos para compor um programa de controle integrado (Monteiro, 2017).

### 2.8.2 *Eurytrema coelomaticum*

O trematódeo *Eurytrema coelomaticum* parasita os ductos pancreáticos dos ruminantes. É endêmico em diversas regiões do Brasil, levando a perdas na produção de carne, leite, ganho de peso, problemas reprodutivos e deixando o hospedeiro mais susceptível a infecções secundárias, podendo levá-lo a óbito (Da Silva Junior, 2017).

O ciclo biológico deste parasito é heteróxico, necessitando de três diferentes grupos de hospedeiros para acontecer (molusco, artrópode e um vertebrado). O hospedeiro definitivo (vertebrado) se infecta através da ingestão acidental de gafanhotos infectados com metacercárias do parasito. Essas, são liberadas no duodeno do hospedeiro vertebrado e migram para o pâncreas. Os hospedeiros intermediários primários são moluscos da espécie *Bradybaena* ou similares que se infectam quando ingerem ovos do parasito, colocados no ambiente pelo hospedeiro definitivo (Da Silva Junior, 2017). Os hospedeiros intermediários secundários são os gafanhotos que se infectam com as bolas mucilaginosas, que são as cercarias eliminadas aglutinadas em uma mucosidade (Monteiro, 2017).

Os animais acometidos na maioria das vezes são assintomáticos, o que dificulta o diagnóstico e controle da doença, muitas vezes sendo achados apenas em necropsias e abate. Apesar de ser uma zoonose, é negligenciada, o que contribui para

que a doença se mantenha. Entretanto, há alto índice de animais infectados em abatedouros de diversos estados Brasil, o que mostra a importância da adoção de medidas de controle da doença, como a diminuição da população de moluscos no ambiente (Da Silva Junior, 2017).

## 2.9 Controle da verminose bovina

Os vermífugos químicos são as opções de controle mais comercializadas no Brasil. Porém, além dos resíduos químicos deixados em carne, leite, derivados e ambiente, seu uso indiscriminado tem tornado o controle da verminose bovina cada vez mais desafiador. Erros como a administração de dosagens inadequadas, uso repetido do mesmo princípio ativo, não rotação da pastagem e outros métodos de controle e, o diagnóstico incorreto da doença têm levado a quadros de resistência dos parasitos aos anti-helmínticos disponíveis no mercado, constituindo um problema global de saúde única. A resistência anti-helmíntica é caracterizada pela diminuição na potência do fármaco, que acontece de forma gradativa e silenciosa, não sendo notada na maioria das vezes pelos produtores (Bergamo et al., 2020). Neste cenário, o uso do controle biológico é uma alternativa eficaz no controle da verminose.

## 2.10 Controle biológico da verminose bovina

A implantação de alternativas de controle para reduzir a contaminação ambiental das formas infectantes e seus ovos são essenciais para o controle eficiente da verminose bovina (Braga et al., 2011). O conceito de controle biológico, no geral, refere-se ao uso de antagonistas já disponíveis no ambiente para o controle populacional de um agente causador de danos na produção agrícola ou pecuária. Sua ação não acontece no estágio de vida interno dos parasitos e sim em estágios larvais de vida livre. Dessa maneira, diminui a fonte de infecção para os hospedeiros. Uma de suas vantagens é que causa menos efeitos negativos para o ambiente se comparado ao controle químico (Mota et al, 2003).

Há muitas características importantes para que um microrganismo seja usado como um antagonista, como a especificidade de ação pelo agente, alta taxa reprodutiva e a capacidade de suportar as condições ambientais do local onde será usado como controlador. Para que um agente possa ser utilizado comercialmente no controle de parasitos gastrointestinais de ruminantes, é necessário que esse seja produzido em grande escala industrial, que o custo dessa produção seja razoável, que

o microrganismo sobreviva na formulação do produto por tempo determinado e que esse seja capaz de competir com medicamentos tradicionais já existentes no mercado. A formulação contendo o microrganismo precisa ser segura para os animais que serão tratados, produtores, consumidores e para o meio ambiente. Além de que, precisa ser eficaz no controle do agente que precisa ser controlado (Mota et al., 2003).

### 2.11 Fungos nematófagos

Os fungos nematófagos são os principais antagonistas naturais de nematoides nos solos, podendo ser predadores, endoparasitas ou ovicidas (Braga et al., 2011). Sua ação acontece nas fezes do animal no ambiente, consistindo na destruição dos ovos ou larvas de vida livre dos nematoides (Frassy et al., 2010).

Os fungos predadores produzem estruturas em forma de anéis constritores e não constritores, hifas, botões e redes tridimensionais adesivas ao longo do micélio. Após aprisionar o nematoide na armadilha, há a penetração das hifas na cutícula do parasito. No interior desse, as hifas crescem e acontece a digestão dos conteúdos internos. Os fungos endoparasitos infectam nematoides através de esporos. Esses, quando ingeridos pelo nematoide irão desenvolver hifas que farão a absorção de seus conteúdos internos. Por último, os fungos ovicidas, que são considerados oportunistas por parasitarem ovos. Suas hifas penetram a casca do ovo do nematoide, crescem ao passar pela camada vitelínica e atravessa a camada adjacente (quitínica e lipídica). A camada vitelínica divide-se, hifas endógenas emergem do ovo, produzindo conidióforos. Dessa forma, esses fungos colonizam o conteúdo do ovo e a larva do nematoide presente no seu interior (Mota et al., 2003).

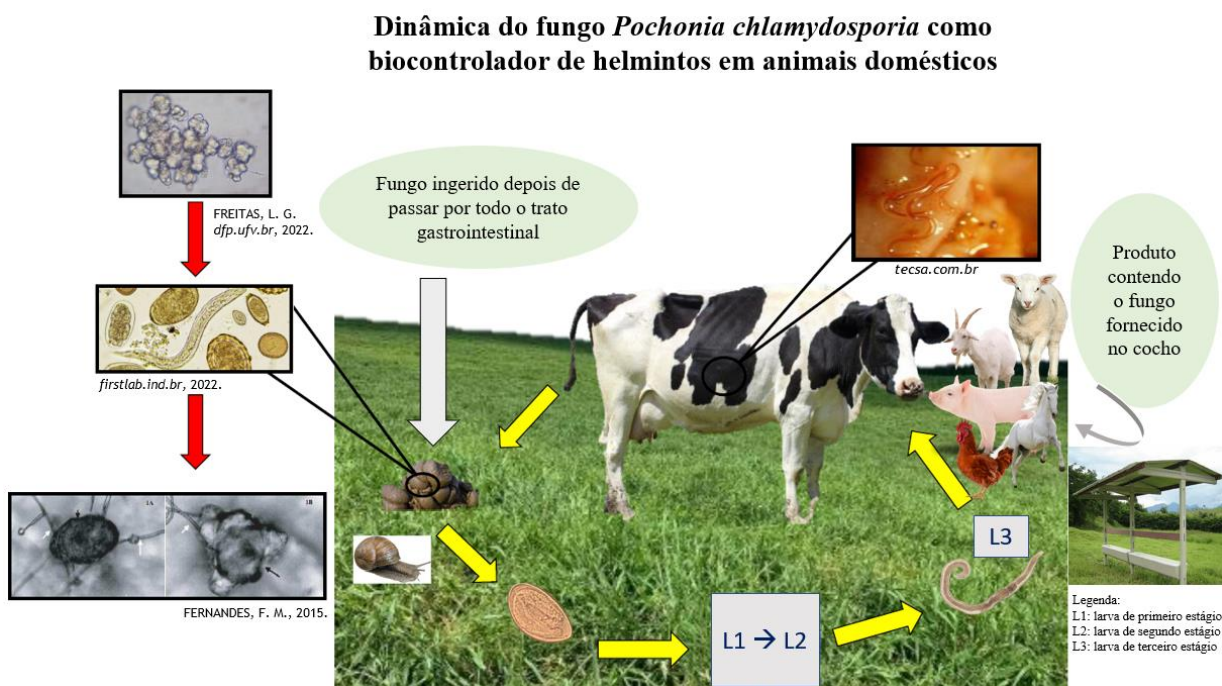
Vários fatores ambientais, como por exemplo a temperatura, podem interferir na dinâmica de predação de nematoides pelos fungos, uma vez que cada espécie tem uma capacidade diferente de adaptação às condições climáticas (Oliveira et al., 2018).

### 2.12 *Pochonia chlamydosporia*

Dentre as espécies de fungos usadas para o controle biológico, está a espécie *Pochonia chlamydosporia* (Figura 1).

Nos mecanismos de ação já mencionados, essa espécie causa a destruição dos ovos, sendo considerada ovicida (Frassy et al., 2010). Sua ação ovicida tem sido testada com sucesso em condições laboratoriais e a campo contra ovos de vários gêneros de helmintos. Essa ação consiste na produção de proteases (enzimas

extracelulares) que possui atividade ovicida contra os ovos de helmintos no ambiente das fezes. Além disso, essa espécie de fungo pode produzir extratos enzimáticos contra substratos sólidos, como proteínas, lipídeos e polissacarídeos (Braga et al., 2011). É usada em diversas espécies de animais domésticos, mostrando redução de até 87,4% de parasitos gastrointestinais em testes *in vitro* (Li et al., 2022).



**Figura 1:** Dinâmica de predação do fungo nematófago *Pochonia chlamydsoporia*.

### 2.13 Uso combinado de mais de uma espécie de controlador biológico

Para diminuir infecções recorrentes ou interromper o ciclo de vida dos nematoides, estudos atuais têm buscado usar estrategicamente a combinação de vários fungos. Podem ocorrer falhas no uso isolado de controladores biológicos, ou seja, na administração de apenas um controlador. E além disso, no ambiente persistem de maneira natural todas as formas de vida livre: ovos e larvas. Para isso, é indicado o uso combinado de controladores biológicos para reduzi-las. Além de reduzir falhas, a combinação de mais de uma espécie de fungos pode potencializar a ação predatória das espécies. É necessário verificar a compatibilidade e incompatibilidade na escolha das espécies para que seja feita a combinação. Visto

que, erros na escolha das espécies podem impedir a estratégia de combinação e consequentemente no controle dos nematoides (Li et al., 2022).

Dentre os métodos para a associação, está a combinação de dois grupos diferentes de fungos, um fungo ovicida e um predador. Sendo esse, o método mais eficaz, uma vez que os alvos de predação dos fungos são diferentes (Li et al., 2022). Alguns autores demonstraram que o uso de fungos como *Duddingtonia flagrans* + *Pochonia chlamydosporia* aumentou significativamente a predação se comparado ao uso de um fungo isolado, mostrando efeito sinérgico entre os fungos (Vieira et al., 2019; Vieira et al., 2020; Vilela et al., 2012; Vilela et al., 2013). Com esses estudos da literatura, sugere-se o uso da espécie *Pochonia chlamydosporia* associada a *Duddingtonia flagrans*, com estudos *in vitro* mostrando redução de até 96,4% de nematoides gastrointestinais em animais (Luns et al., 2018; Assis et al., 2013), como uma alternativa promissora para o futuro no controle das nematodioses em bovinos.

## Referências

ARAÚJO, J.V.; ASSIS, R.C.L.; CAMPOS, A.K.; MOTA, M.A. Efeito antagônico de fungos predadores dos gêneros *Monacrosporium*, *Arthrobotrys* e *Duddingtonia* sobre larvas infectantes de *Cooperia* sp. e *Oesophagostomum* sp. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.58, n.3, p.373-380, 2006.

ASSIS, R.C.L.; LUNS, F.D.; ARAUJO, 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.

AZEVÊDO, D.M.M.R.; ALVES, A.A.; SALES, R.O. Principais Ecto e Endoparasitas que Acometem Bovinos Leiteiros no Brasil: Uma Revisão. Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal, v.2, n.4 p.43-55, 2008.

BERGAMO, G.P.; HOLSBACH, V.T.K.; WERLE, C.H. Análise múltipla de vermífugos em bovinos de corte. Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária, v. 3, n.1, 2020.

BRAGA, F.R.; ARAUJO, J.M.; SILVA, A.R.; ARAÚJO, J.V.; CARVALHO, R.O.; SOARES, F.L.F.; QUEIRO, J. H.; GÊNIER, H.L.A. Ação ovicida do extrato bruto enzimático do fungo *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Ancylostoma* sp. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.44, n.1. p.116-118, 2011.

BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J. Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals. Appl. Microbiol. Biotechnol, v.98, p.71–82, 2014.

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, 2014.

DA SILVA JÚNIOR, F. A. Ocorrência e caracterização morfológica de *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet, 1892) (Digenea, Dicrocoeliidae) em rebanhos bovinos provenientes da Região Sul de Minas Gerais, Brasil, 2017. 91f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Saúde) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

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.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2019. Disponível em: <https://www.embrapa.br/gado-de-leite>.

FRASSY, L.N.; BRAGA, F.R.; SILVA, A.R.; ARAÚJO, J.V.; FERREIRA, S.R.; FREITAS, L.G. Destruição de ovos de *Toxocara canis* pelo fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.43, n.1, p.102-104, 2010.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2019. Disponível em: <http://www.fao.org/home/en/>.

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.

LI, S.; WANG, D.; GONG, J.; ZHANG, Y. Individual and Combined Application of Nematophagous Fungi as Biological Control Agents against Gastrointestinal Nematodes in Domestic Animals. *Pathogens*, v.11, n.172, 2022. <https://doi.org/10.3390/pathogens11020172>

LUGO, M.; MORÁN, R.; CHACÍN, E.; MOLINA, R.; GONZÁLEZ, L.; ANGULO-CUBILLÁN, F. *Fasciola hepatica* (Trematoda: Fasciolidae), em bovinos ubicados en dos niveles altitudinales del estado mérida, Venezuela. *Revista Científica*, v.28, n.4, p.265 - 269, 2018.

LUNS, F.D.; ASSIS, R.C.L.; SILVA, L.P.C.; FERRAZ, C.M.; BRAGA, F.R.; DE ARAUJO, J.V. Coadministration of nematophagous fungi for biological control over nematodes in Bovine in the south-eastern Brazil. *BioMed Research International*, 2018.

MAIA, D.; MATTOS, M.J.T. Nematodeoses gastrintestinais em bovinos no Brasil: revisão de artigos publicados no período de 2012 a 2020. *Revista Agrária Acadêmica*, v.3, n.3, 2020.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Plano Agrícola e Pecuário. Brasília: MAPA/ACS. 2018. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/plano-agricola-e-pecuario/arquivos-pap/PAP1718.pdf>.

MARMITT, I.V.P.; SEDREZ, F.S.; FÉLIX, S.R.; NIEDERMEYER, F.; CHAGAS, B.C.; NIZOLI, L.Q.; SILVA, S. S.; SILVA, E. F. Estudo transversal da ocorrência de *Haemonchus* spp. em bovinos de corte submetidos a diferentes sistemas de terminação. *Brazilian Journal of Development*, v.6, n.8, p.58624- 58633, 2020.

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.

MONTEIRO, S.G. Parasitologia na Medicina Veterinária - Segunda edição. Rio de Janeiro: Roca, 2017. 582p.

MORAES, A.M.S.; MOURA, L.C.; BOBÁNY, D.M.; BASTOS, B.F.; MARTINS, A.V. Avaliação da eficácia de dois diferentes anti-helmínticos em bovinos alojados na fazenda escola do UNIFESO, Teresópolis-RJ. *REVISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA DO UNIFESO*, v.1, n.1, 2021.

MOTA, M.A.; CAMPOS, A.K.; ARAÚJO, J.V. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, n.2, v.3, p.93-100, 2003.

OLIVEIRA, I.C.; VIEIRA, Í.S.; CARVALHO, L.M.; CAMPOS, A.K.; FREITAS, S.G.; ARAUJO, J.M.; BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V. Reduction of bovine strongilides in naturally contaminated pastures in the southeast region of Brazil. *Exp. Parasitol*, v.194, p.9–15, 2018.

SCHADE, J.; ALBERNAZ, R.M.; REIS, A.C.F.; FONTEQUE, J.H. Dictiocaulose em bovinos no município de Londrina, PR, Brasil. *Veterinária e Zootecnia*, v.27, p.001-006, 2020.

SILVA, E.R.V.; CAPOANI, R.Q.; RITZ, R.; SURIAN, C.R.S. Fasciolose hepática. *Revista científica eletrônica de medicina veterinária*, v.6, n.11, p.1-7, 2008.

SURIAN, C.R.S.; SURIAN, S.R.S.; CARNEIRO, C.; PEROSA, F.F.; HORN, V.W.; FRONZA, N.; BONASSI, D.E.; PERIPOLLI, V.; SANTAROSA, B. P.; GOMES, T.M.A.; MENDES, R.E. *Eurytrema coelomaticum* infection: correlation between parasite burden and impairment of pancreatic exocrine enzyme secretion. *Ciência Rural*, v.52, n.2, 2022.

VIEIRA, T.S.; OLIVEIRA, I.; CAMPOS, A.K.; ARAÚJO, J. Association and predatory capacity of fungi *Pochonia chlamydosporia* and *Arthrobotrys cladodes* in the biological control of parasitic helminths of bovines. *Parasitology*, v.146, p.1347-1351, 2019.

VIEIRA, T.S.; OLIVEIRA, I.; CAMPOS, A.K.; ARAÚJO, J. *Arthrobotrys cladodes* and *Pochonia chlamydosporia*: Nematicidal effects of single and combined use after passage through cattle gastrointestinal tract. *Exp. Parasitol.*, v.218, 108005, 2020.

VILELA, V.; FEITOSA, T.F.; BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.; SOUTO, D.; SANTOS, H.; SILVA, G.; ATHAYDE, A. Biological control of goat gastrointestinal helminthiasis by *Duddingtonia flagrans* in a semi-arid region of the northeastern Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.188, p.127–133, 2012.

VILELA, V.; FEITOSA, T.F.; BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.; LUCENA, S.; DANTAS, E.S.; ATHAYDE, A.; SILVA, W.W. Efficacy of *Monacrosporium thaumasium* in the control of goat gastrointestinal helminthiasis in a semi-arid region of Brazil. *Parasitol. Res.*, 2013.

**CAPÍTULO 1**

Article

**Efficacy of a Fungal Formulation with the Nematophagous Fungus *Pochonia chlamydosporia* in the Biological Control of Bovine Nematodiosis***Pathogens*, (impact factor 4.531), 11, 695.Doi: <https://doi.org/10.3390/pathogens11060695>

(2022)

Article

**Efficacy of a Fungal Formulation with the Nematophagous Fungus *Pochonia chlamydosporia* in the Biological Control of Bovine Nematodiosis**

Júlia dos Santos Fonseca<sup>1\*</sup>, Vinícius Monteiro Ferreira<sup>2</sup>, Samuel Galvão de Freitas<sup>1</sup>, Ítalo Stoupa Vieira<sup>3</sup> and Jackson Victor de Araújo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Veterinary Medicine, Federal University of Viçosa (UFV), Viçosa 36570-900, MG, Brazil;

samuel.freitas@ufv.br (S.G.d.F.); jvictor@ufv.br (J.V.d.A.)

<sup>2</sup>Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica 23897-000, RJ, Brazil; viniciusmferreira@ufrj.br

<sup>3</sup>Department of Veterinary Medicine, Univértix, Matipó 35367-000, MG, Brazil; italostoupavieira@gmail.com

\*Correspondence: julia.d.fonseca@ufv.br

*Pathogens* 2022, 11, 695. <https://doi.org/10.3390/pathogens11060695>  
<https://www.mdpi.com/journal/pathogens>

## Abstract

In the control of bovine worms, biological control by nematophagous fungi stands out, especially *Pochonia chlamydosporia* which causes the destruction of helminth eggs. This study aims to test the effectiveness of a formulation containing the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* isolated for the biological control of bovine nematodiosis. Twelve cattle were divided into two groups: control group (GC) and the group that received the formulation (GT). Feces and pasture samples were collected for the research of gastrointestinal nematodes. Lung worms and trematodes were investigated. The animals were weighed monthly. The averages of temperature and rainfall were recorded. The supply of the fungus *Pochonia chlamydosporia* was not effective in reducing the eggs per gram of feces of gastrointestinal nematodes (EPG) of the animals, not differing statistically ( $p > 0.05$ ) between the groups. The mean values of larvae recovered in the pasture did not differ significantly ( $p > 0.05$ ). The genus *Haemonchus* sp. was the most prevalent. There was no correlation between the number of larvae with temperature and rainfall ( $p > 0.05$ ). There was a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) in the penultimate weighing of the experiment. The formulation containing *Pochonia chlamydosporia* was not efficient in the biological control of bovine gastrointestinal nematodes.

Keywords: helminthosis; helminths; parasitic nematodes

## 1. Introduction

Bovine verminosis is one of the main causes of losses in livestock. Cattle farming is harmed by impacts such as production losses, expenses with prophylactic and curative treatments, and mortality in the herd in extreme cases. In this scenario, some genera of greater importance and prevalence of gastrointestinal parasitic nematodes in cattle raised in tropical countries stand out, such as *Cooperia*, *Haemonchus*, and *Oesophagostomum*. The species *Dictyocaulus viviparus* is important in the parasitism of the lungs of these animals [1] along with the trematodes, whose species of importance in cattle are: *Fasciola hepatica* and *Eurytrema coelomaticum*, which are liver and pancreatic duct parasites of cattle, respectively [2,3].

For an efficient parasite control, it is necessary to know the epidemiology of the parasites. Using this knowledge, prophylactic measures can be used for effective control, reducing the use of chemicals, cases of anthelmintic resistance, and dependence on the use of anthelmintics, when associated with other control methods. One of these methods is biological control by nematophagous fungi [4].

Nematophagous fungi are present in the environment and their action takes place in the animal's feces in the soil. Among the mechanisms of action, the destruction of free-living helminth eggs or larvae stands out. Among the species of fungi used for biological control, there is the ovicidal species *Pochonia chlamydosporia* that acts by causing the destruction of eggs and *Duddingtonia flagrans*, a larvicidal species that causes the destruction of helminth larvae [5]. In cattle farming, one method for the distribution of these fungi in the environment is the administration of fungal structures in the cattle diet [6].

*Pochonia chlamydosporia* is widely used as a biocontrol agent [7]. Its ovicidal action consists of the production of proteases (extracellular enzymes) that have ovicidal activity against helminth eggs in the feces environment. In addition, this fungal species can produce enzyme extracts against solid substrates such as proteins, lipids, and polysaccharides [8]. Morphological changes are caused in the shell and internal content of nematode eggs [7]. In addition, this species also produces secondary metabolites [9]. This species of fungus acts on parasite eggs of several species of domestic animals such as cattle, swine, horses, dogs, cats, and humans [5,10]. Many in vitro studies have shown the action of this fungus on eggs of *Eurytrema*

*coelomaticum*, *Fasciola hepatica*, *Oxyuris equi*, *Ascaris suum*, *Ancylostoma* sp., among other diverse species [10], and also in vivo [5]. It is important to emphasize that there is no evidence in the literature of larvicidal action of this species. Although the species of fungus studied is ovicidal and the eggs of gastrointestinal nematodes are released in the animal's feces, there is a very fast passage to hatching and entering the larval stage [10]. It is not yet known whether the fungus in question could influence the development of the larval stage.

The objective of this study was to test the effectiveness of a fungal formulation containing the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* isolated for the biological control of bovine nematodiosis in southeastern Brazil.

## 2. Results and Discussion

The supply of the fungus *Pochonia chlamydosporia* was not effective in reducing the eggs per gram of feces (EPG) of gastrointestinal nematodes of the animals. The mean values of EPG did not differ statistically ( $p > 0.05$ ) between the two groups (Table 1).

**Table 1.** Average values and standard deviation (SD) of the eggs per gram of feces (EPG) values of gastrointestinal nematodes from animals in the group treated with the fungal *Pochonia chlamydosporia* and in the control group during the period from April to October 2021, in Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

Month	EPG	Control	Treated
April	1 <sup>o</sup>	50.0 (83.3) <sup>a</sup>	83.3 (98.3) <sup>a</sup>
	2 <sup>o</sup>	133.3 (20.0) <sup>a</sup>	20.0 (44.7) <sup>a</sup>
May	3 <sup>o</sup>	133.3 (233.8) <sup>a</sup>	33.3 (81.6) <sup>a</sup>
	4 <sup>o</sup>	133.3 (175.1) <sup>a</sup>	116.6 (132.9) <sup>a</sup>
June	5 <sup>o</sup>	66.7(121.1) <sup>a</sup>	133.3 (186.2) <sup>a</sup>
	6 <sup>o</sup>	100.0 (167.3) <sup>a</sup>	66.7 (121.1) <sup>a</sup>
July	7 <sup>o</sup>	50.0 (122.4) <sup>a</sup>	50.0 (54.7) <sup>a</sup>
	8 <sup>o</sup>	100.0(167.3) <sup>a</sup>	133.3 (196.6) <sup>a</sup>
August	9 <sup>o</sup>	16.7 (40.8) <sup>a</sup>	50.0 (83.6) <sup>a</sup>
	10 <sup>o</sup>	33.3 (51.6) <sup>a</sup>	16.7 (40.8) <sup>a</sup>
September	11 <sup>o</sup>	83.3 (204.1) <sup>a</sup>	216.7 (278.6) <sup>a</sup>
	12 <sup>o</sup>	100.0 (200.0) <sup>a</sup>	183.3 (183.4) <sup>a</sup>
October	13 <sup>o</sup>	83.3 (160.2) <sup>a</sup>	233.3 (301.1) <sup>a</sup>
	14 <sup>o</sup>	150.0 (320.9) <sup>a</sup>	16.7 (40.8) <sup>a</sup>

Arithmetic means with the same letters do not differ significantly by the Student's t-test ( $p > 0.05$ ).

Due to the ovicidal action of the fungal species used in this experiment, these results may have occurred because of the rapid passage of eggs to the larval stage of gastrointestinal nematodes. The passage of gastrointestinal nematodes in the environment from the egg stage to hatching is rapid, and there may not have been enough time for the fungus to perform its ovicidal action.

Despite the results found here, the enzymatic mechanisms of these fungi in egg adhesion and consequent destruction are suggested by several studies [11]. Additionally, in vitro and in vivo studies have been developed to decrease the number of recurrent gastrointestinal nematode infections in domestic animals using ovicidal fungi [7]. However, the factors that often impair the effectiveness of these fungi are strategies developed by the parasites themselves, such as the rapid passage from the egg to larval stage mentioned above, which makes interaction with the egg difficult [10].

During the entire experimental period, no eggs of the Trematoda class and no larvae of the species *Dictyocaulus viviparus* were found. The experiment was conducted in the dry season which could have influenced the non-appearance of these organisms.

The mean values of infective larvae (L3) recovered from the pasture did not differ significantly ( $p > 0.05$ ) between the treated and control groups (Table 2). These results could be explained by low precipitation rates, since, according to Silva [12], rain is necessary for the larvae to leave the fecal cake and migrate to the grass. In addition, in the dry period, the highest parasite load is concentrated in the animal and not in the pasture, due to the unfavorable environmental conditions of this period. Another factor that may explain the results found here is the penetration of L3 into the soil to avoid desiccation. All these factors may have interfered in the recovery of L3 by the technique used in this study and consequently in the results presented.

**Table 2.** Mean values of infective larvae (L3) of nematodes recovered per kilogram of dry matter standard deviation (SD) in the group treated with the fungus *Pochonia chlamydosporia* and in the control group during the period from April to October 2021, in Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

T20	C20	T40	C40
24.9 (67.6) <sup>a</sup>	21.5 (31.7) <sup>a</sup>	13.3 (37.7) <sup>a</sup>	9.44 (15.7) <sup>a</sup>

Legend: 20 and 40 represent, respectively, the distance of 0–20 and 20–40 cm from the fecal cake at which the grass was collected from the paddocks of the treated and control groups. Arithmetic means with the same letters do not differ significantly by the Student's t-test ( $p > 0.05$ ).

The prevalence of helminths in coprocultures is shown in Table 3. *Haemonchus* sp. was the most prevalent, followed by *Cooperia* sp. and *Oesophagostomum* sp. In other studies, such as by Rodrigues et al. [13] and Vieira et al. [14] in southeastern Brazil, *Haemonchus* sp. was also the most prevalent.

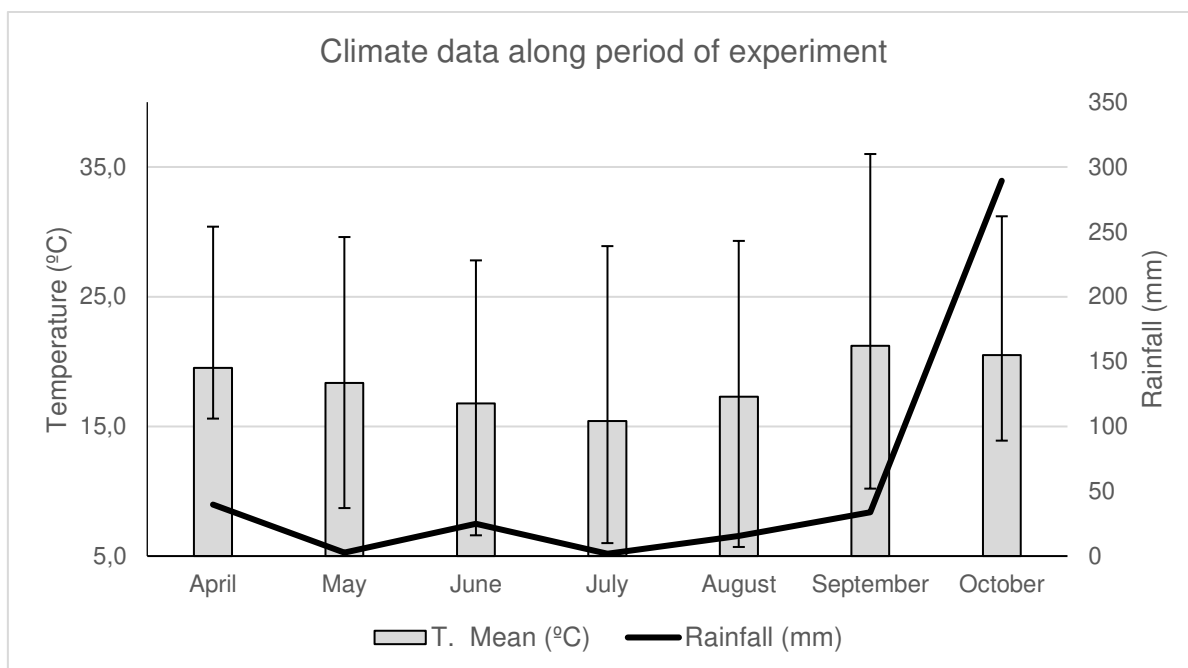
**Table 3.** Mean values of the percentages of *Haemonchus* sp. (Haem), *Cooperia* sp. (Coop), and *Oesophagostomum* sp. (Oeso) of L3 of nematodes recovered from coprocultures of groups of animals treated with the formulation containing *Pochonia chlamydosporia* and the control group during the period from April to October 2021 in Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

Treated			Control		
Haem	Coop	Oeso	Haem	Coop	Oeso
54.4%	22.8%	22.8%	61.4%	23.9%	14.3%

The climatic data recorded during the experimental period in the municipality of Viçosa (MG) are shown in Figure 1.

The highest averages of temperature recorded were in 30.4 °C (April), 36 °C (Sep-tember), and 31.2 °C (October), at the beginning and end of the experimental period, respectively. The average temperatures recorded were 19 °C, 21 °C, and 20 °C in April, September, and October, respectively. In these months, the highest levels of rainfall were also recorded, with 39.8 mm in April, 33.8 mm in September, and 289.4 mm in October. It was observed that the months with higher temperatures also had the highest average rain-fall. During the months of May to August, the lowest average indices of temperature and rainfall were recorded, characterizing the dry period. The

minimum temperatures during these months were 8.7 °C in May, 6.6 °C in June, 6 °C in July, and 5.7 °C in August. The average temperatures were 18 °C in May, 17 °C in June, 15 °C in July, and 17 °C in August. The rainfall during this period was 2.6 mm in May, 25.00 mm in June, 1.8 mm in July, and 15.4 mm in August.



**Figure 1.** Minimum Temperature (T Min), Average (T Mean), Maximum (T Max), and Rainfall (mm/month) values from April to October 2021 in Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

During the experimental period, there was no correlation between the number of larvae recovered with temperature and rainfall ( $p > 0.05$ ). Thus, the meteorological data did not contribute to differences between the two experimental groups in this study.

This study was developed predominantly during the dry season of the year, with the lowest temperatures for this region and the lowest levels of rainfall, which may have contributed to the results found, since the evolutionary forms of helminths present in the environment are also disadvantaged by low temperatures and lack of rainfall in the dry period. The development and migration of infective forms are impaired [15]. Mkandawire et al. [16] reported that environmental factors directly influence the hatching of eggs. In addition, environmental factors, such as temperature, can interfere with the dynamics of nematode predation by fungi since each species has a different ability to adapt to climatic conditions [17]. Additionally, such factors impact the action of these fungi also because each fungal species has a different adaptive capacity [7].

The data of average daily weight gain in kilograms (kg/day) are presented in Table 4. There was no statistically significant difference ( $p > 0.05$ ) from April to July and also at the last weighing of the experimental period, in the month of September. However, there was a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) in the penultimate weighing of the experiment in August, in the average of the entire experimental period, in which the weight of the animals in the group treated with the fungal formulation containing *Pochonia chlamydosporia* was higher than in the control group.

The statistically significant difference in the penultimate weighing of this study, in which greater weight gain was observed in the treated group compared to the control group, may indicate some action of the fungus. Oliveira et al. [18] also recorded an increase in weight gain in animals that received the fungus for six months compared to the control group, however, in the case of a larvicidal and non-ovicidal fungus.

For future studies, the associated use of the species *Pochonia chlamydosporia* with other important biocontrol fungi is important, with emphasis on the association between them and *Duddingtonia flagrans*. Some authors have shown that this association significantly increased predation when compared to the separate use of fungi, showing a synergistic effect between the fungi [19–22]. With these literature studies and the results of this work, the use of the fungus *Pochonia chlamydosporia* associated with a larvicidal fungus, such as *Duddingtonia flagrans*, may be a promising alternative for the future in the control of nematodiosis in cattle. The present results indicated that the formulation containing the *Pochonia chlamydosporia* isolate was not efficient in the biological control of bovine gastrointestinal nematodes.

**Table 4.** Average daily weight gain in kilograms (kg/day) standard deviation (SD) of young crossbred cattle from the control group and the group treated with a formulation containing the isolated fungus *Pochonia chlamydosporia*, from April to October 2021 in Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

ADG	1 <sup>o</sup> -2 <sup>o</sup>	2 <sup>o</sup> -3 <sup>o</sup>	3 <sup>o</sup> -4 <sup>o</sup>	4 <sup>o</sup> -5 <sup>o</sup>	5 <sup>o</sup> -6 <sup>o</sup>	6 <sup>o</sup> -7 <sup>o</sup>
<b>Treated</b>	-0.50 (0.9) <sup>a</sup>	1.08 (0.7) <sup>a</sup>	0.24 (0.2) <sup>a</sup>	-0.38 (0.8) <sup>a</sup>	1.27 (1.0) <sup>a</sup>	-0.03 (1.0) <sup>a</sup>
<b>Control</b>	0.43 (1.0) <sup>a</sup>	0.53 (1.2) <sup>a</sup>	0.00 (0.7) <sup>a</sup>	0.20 (0.3) <sup>a</sup>	0.30 (0.6) <sup>b</sup>	0.54 (0.3) <sup>a</sup>

Arithmetic means with different letters differ significantly by Student's t-test ( $p < 0.05$ ).

### 3. Materials and Methods

The experiment was lead on a farm, situated in the city of Viçosa, MG, Brazil at a tropical climate in the dry season for 6 months, from April to October 2021. Twelve crossbred cattle, 18 months old, with an average weight of 300 kg were used for the experiment. Previously, the anthelmintic doramectina 1% (Dectomax®, Zoetis, São Paulo, Brazil) was administered at a dose of 1 mL/50 kg animal body weight in these animals. Fifteen days after treatment with the anthelmintic and when the absence of nematode eggs in the feces was confirmed, the animals were randomly divided into two groups with six animals each: control group (GC) and six animals that received the product formulation containing the fungus (GT). These were distributed in two paddocks with two hectares each of *Brachiaria decumbens*, naturally infested with helminth larvae, due to the previous grazing history of young animals.

The fungus tested was *Pochonia chlamydosporia* in a formulation conveyed in rice bran produced by Ghenvet Animal Health (Paulínia, SP, Brazil), containing  $10^5$  chlamydospores per gram. In the GT, each animal was treated with 1 g ( $10^5$  chlamydospores) of *Pochonia chlamydosporia* for every 10 kg of animal live weight, administered daily together with commercial feed. In the GC, each animal received the same dosage, however, of the placebo (rice bran), that is without the fungus added to the ration.

During the six months of the experiment, every 15 days, after the animals were introduced to the pastures, stool samples were collected directly from the rectal ampulla of all animals in each group. In these samples, the counts of eggs per gram of feces (EPG) were determined by the method of Gordon and Whithlock [23] modified by Lima [24]. In addition to EPG, coprocultures were produced with 20 g of feces mixed with vermiculite and taken to an incubator at 26°C for 15 days to obtain infective larvae (L3), which were later identified according to Keith [25]. For the research of lung worms, the method of Baermann [26] was used. For the search for trematodes, the method of Dennis et al. [27] was used.

Additionally, every 15 days, two samples of pasture (0–20 and 20–40 cm away from the fecal cake) were collected from the GT and GC paddocks in (W) from six alternate points, according to Raynaud and Gruner [28]. Samples of 500 g pasture were used to recover the L3 following the methodology described by Lima [24]. Subsequently, the sediment was examined under an optical microscope (Olympus

Corporation, Tokyo, Japan) to identify and count the larvae according to the criteria established by Keith [25]. These samples were placed in an oven for three days at 70°C to obtain dry matter (DM). The data obtained were transformed into the number of larvae per kilogram of DM.

The weight of the animals was taken monthly. Weight gain was calculated by subtracting current weight from previous weight and dividing by days between the two weighings. The result was given in kg/day. The averages of minimum, average, and maximum temperature and rainfall during the experimental period were recorded.

The results obtained were submitted to Student's t-test at a significance level of 5%.

This experimental trial strictly followed all the recommended procedures by the rules of use in animals and certified by the Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA/UFV). This project was approved by CEUA/UFV, file no. 42/2021.

#### 4. Conclusions

The rapid transition from egg to larvae stage was not affected by the fungus *Pochonia chlamydosporia*, therefore the fungal formulation containing *Pochonia chlamydosporia* was not efficient in the biological control of bovine gastrointestinal nematodes.

**Author Contributions:** J.d.S.F. and J.V.d.A. conceived and designed the study. J.d.S.F., V.M.F. and S.G.d.F. performed the data collection. Í.S.V. performed statistical analyses. J.d.S.F., V.M.F. and J.V.d.A. wrote the article. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES)-Finance Code 001.

**Institutional Review Board Statement:** This study was previously approved by the Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) of the Federal University of Viçosa (protocol number 42/2021). The study was conducted in accordance with the guidelines of the Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA/UFV) from the Veterinary Department of the

Federal University of Viçosa (protocol number 42/2021). The experimental test strictly followed all the procedures recommended by the norms of conduct for the use of animals in teaching, research, and extension of the Veterinary Department of the Federal University of Viçosa.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available upon request from the corresponding author.

**Acknowledgments:** The authors thank CNPq, CAPES, FAPES, and FAPEMIG, and Cooperação CAPES/FAPES (Programa de Desenvolvimento da Pós-Graduação—PDPG) for all the financial support throughout the group's research for their financial assistance. **Conflicts of Interest:** The authors declare that they have no competing financial interest or personal relationships that may have influenced the work reported in this article.

## References

1. Moraes, A.M.S.; Moura, L.C.; Bobány, D.M.; Bastos, B.F.; Martins, A.V. Avaliação da eficácia de dois diferentes anti-helmínticos em bovinos alojados na fazenda escola do UNIFESO, Teresópolis-RJ. *Rev. Med. Vet. UNIFESO* 2021, 1, 1.
2. Lugo, M.; Morán, R.; Chacín, E.; Molina, R.; González, L.; Angulo-Cubillán, F. *Fasciola hepatica* (Trematoda: Fasciolidae), em bovinos ubicados en dos niveles altitudinales del estado Mérida, Venezuela. *Rev. Cient.* 2018, 28, 265–269.
3. Surian, C.R.S.; Surian, S.R.S.; Carneiro, C.; Perosa, F.F.; Horn, V.W.; Fronza, N.; Bonassi, D.E.; Peripolli, V.; Santarosa, B.P.; Gomes, T.M.A.; et al. *Eurytrema coelomaticum* infection: Correlation between parasite burden and impairment of pancreatic exocrine enzyme secretion. *Ciênc. Rural* 2022, 52, 2. [CrossRef]
4. Baiak, B.H.B.; Gasparina, J.M.; Lanke, L.; Sousa, K.T.; Deniz, M.; Pereira, L.M.; Araújo, J.V.; Rocha, R.A.; Dittrich, J.R. Predatory activity of nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in infective larvae after gastrointestinal transit: Biological control in pasture areas and in vitro. *J. Helminthol.* 2021, 95, e31. [CrossRef] [PubMed]
5. Araújo, J.V.; Braga, F.R.; Mendoza-De-Gives, P.; Paz-Silva, A.; Vilela, V.L.R. Recent advances in the control of helminths of domestic animals by helminthophagous fungi. *Parasitologia* 2021, 1, 168–176. [CrossRef]

6. Mendoza-De-Gives, P.; Braga, F.R.; Araújo, J.V. Nematophagous fungi, an extraordinary tool for controlling ruminant parasitic nematodes and other biotechnological applications. *Biocontrol Sci. Technol.* 2022, 1–17. [CrossRef]
7. Li, S.; Wang, D.; Gong, J.; Zhang, Y. Individual and combined application of nematophagous fungi as biological control agents against gastrointestinal nematodes in domestic animals. *Pathogens* 2022, 11, 172. [CrossRef]
8. Braga, F.R.; Araujo, J.M.; Silva, A.R.; Araújo, J.V.; Carvalho, R.O.; Soares, F.L.F.; Queiro, J.H.; Gênier, H.L.A. Ação ovicida do extrato bruto enzimático do fungo *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Ancylostoma* sp. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2011, 44, 116–118. [CrossRef]
9. Ferreira, S.R.; Machado, A.R.T.; Furtado, L.F.; Gomes, J.H.S.; Almeida, R.M.; Mendes, T.O.; Maciel, V.N.; Barbosa, F.S.; Carvalho, L.M.; Bueno, L.L.; et al. Ketamine can be produced by *Pochonia chlamydosporia*: An old molecule and a new anthelmintic? *Parasites Vectors* 2020, 13, 527. [CrossRef]
10. Braga, F.R.; Araújo, J.V. Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014, 98, 71–82. [CrossRef]
11. Carvalho, L.M.; Braga, F.R.; Domingues, R.R.; Araujo, J.M.; Lelis, R.T.; Paula, A.T.; Silveira, W.F.; Araújo, J.V. Interaction of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* and *Parascaris equorum* eggs in different culture media. *J. Basic Microbiol.* 2014, 54, 109–114. [CrossRef]
12. Silva, H.M. Nematodioses gastrintestinais de caprinos: Uma revisão. *Rev. Ciênc. Agrovet.* 2014, 13, 199–208.
13. Rodrigues, J.A.; Roque, F.L.; Lima, B.A.; Silva Filho, G.M.; Oliveira, C.S.M.; Sousa, L.C.; Silva, A.L.P.; Lima, E.F.; Feitosa, T.F.; Braga, F.R.; et al. Control of sheep gastrointestinal nematodes on pasture in the tropical semiarid region of Brazil, using Bioverm® (*Duddingtonia flagrans*). *Trop. Anim. Health Prod.* 2022, 54, 179. [CrossRef]
14. Vieira, V.D.; Feitosa, T.F.; Vilela, V.L.R.; Azevedo, S.S.; Almeida Neto, J.L.; de Moraes, D.F.; Ribeiro, A.R.C.; Athayde, A.C.R. Prevalence and risk factors associated with goat gastrointestinal helminthiasis in the Sertão region of Paraíba State, Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.* 2014, 46, 355–361. [CrossRef]
15. Pereira, J.R. Práticas de controle e prevalência de helmintos gastrintestinais parasitos de bovinos leiteiros em Pindamonhangaba, São Paulo, Brasil. *Rev. Ciênc. Agrovet.* 2011, 10, 16–22.
16. Mkandawire, T.T.; Grecis, R.K.; Berriman, M.; Duque-Correa, M.A. Hatching of parasitic nematode eggs: A crucial step determining infection. *Trends Parasitol.* 2022, 38, 174–187. [CrossRef]
17. Oliveira, I.C.; Vieira, Í.S.; Carvalho, L.M.; Campos, A.K.; Freitas, S.G.; Araujo, J.M.; Braga, F.R.; Araújo, J.V. Reduction of bovine strongilides in naturally contaminated pastures in the southeast region of Brazil. *Exp. Parasitol.* 2018, 194, 9–15. [CrossRef]

18. Oliveira, L.; Dias, F.G.S.; Melo, A.L.T.; De Carvalho, L.M.; Silva, E.N.; De Araujo, J.V.D. Bioverm® in the control of nematodes in beef cattle raised in the central-west region of Brazil. *Pathogens* 2021, 10, 548. [CrossRef]
19. Vieira, T.S.; Oliveira, I.; Campos, A.K.; Araújo, J. Association and predatory capacity of fungi *Pochonia chlamydosporia* and *Arthrobotrys cladodes* in the biological control of parasitic helminths of bovines. *Parasitology* 2019, 146, 1347–1351. [CrossRef]
20. Vieira, T.S.; Oliveira, I.; Campos, A.K.; Araújo, J.V. *Arthrobotrys cladodes* and *Pochonia chlamydosporia*: Nematicidal effects of single and combined use after passage through cattle gastrointestinal tract. *Exp. Parasitol.* 2020, 218, 108005. [CrossRef]
21. Vilela, V.; Feitosa, T.F.; Braga, F.R.; Araújo, J.; Souto, D.; Santos, H.; Silva, G.; Athayde, A. Biological control of goat gastrointestinal helminthiasis by *Duddingtonia flagrans* in a semi-arid region of the northeastern Brazil. *Vet. Parasitol.* 2012, 188, 127–133. [CrossRef]
22. Vilela, V.; Feitosa, T.F.; Braga, F.R.; Araújo, J.; Lucena, S.; Dantas, E.S.; Athayde, A.; Silva, W.W. Efficacy of *Monacrosporium thaumasium* in the control of goat gastrointestinal helminthiasis in a semi-arid region of Brazil. *Parasitol. Res.* 2013, 112, 871–877. [CrossRef]
23. Gordon, H.M.; Whitlock, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *J. Counc. Sci. Ind. Res.* 1939, 12, 50–52.
24. Lima, W.S. Dinâmica Das Populações De Nematóides Parasitos Gastrintestinais Em Bovinos De Corte, Alguns Aspectos Da Relação Parasito-Hospedeiro E Do Comportamento Dos Estádios De Vida Livre Na Região do Vale do Rio Doce, MG, Brasil. Ph.D. Thesis, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, 1989.
25. Keith, R.K. The differentiation on the infective larvae of some common nematode parasites of cattle. *Aust. J. Zool.* 1953, 1, 223–235. [CrossRef]
26. Baermann, G. Eine einfache methode zur auffinding von ankylostomum (Nematoden) larven in erdproben. *Geneesk. Tijdschr. Nederl.* 1917, 57, 131–137.
27. Dennis, W.R.; Stone, W.M.; Swanson, L.E. A new laboratory and field diagnostic test for fluke ova, in feces. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1954, 124, 47–50.
28. Raynaud, J.P.; Gruner, L. Feasibility of herbage sampling in large extensive pastures and availability of cattle nematode infective larvae in mountain pastures. *Vet. Parasitol.* 1982, 10, 57–64. [CrossRef]

### 3. Conclusões gerais

A rápida transição do estágio de ovo para larva não foi afetada pelo fungo *Pochonia chlamydosporia*, portanto a formulação fúngica contendo *Pochonia chlamydosporia* não foi eficiente no controle biológico de nematódeos gastrointestinais de bovinos.