

Avaliação de *Harposporium anguillulae* (Mycota: Deuteromycetes)
no biocontrole de estágios pré-parasitários de *Haemonchus*
contortus (Nematoda: Trichostrongylidae)

Marcus Vinícius Corrêa Roque

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA -
PARASITOLOGIA VETERINÁRIA

**Avaliação de *Harposporium anguillulae* (Mycota: Deuteromycetes) no
biocontrole de estágios pré-parasitários de *Haemonchus contortus*
(Nematoda: Trichostrongylidae)**

MARCUS VINÍCIUS CORRÊA ROQUE

**SOB A ORIENTAÇÃO DA DOUTORA:
TEREZINHA PADILHA**

*Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de Magister
Science em Medicina Veterinária -
Parasitologia Veterinária.*

SEROPÉDICA, RIO DE JANEIRO

JULHO, 1998

TÍTULO DA TESE:

“Avaliação de *Harposporium anguillulae* (Mycota: Deuteromycetes) no biocontrole de estágios pré-parasitários de *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae)”

AUTOR:

MARCUS VINÍCIUS CORRÊA ROQUE

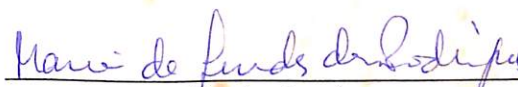
Aprovado em : 10/07/98.

Terezinha Padilha



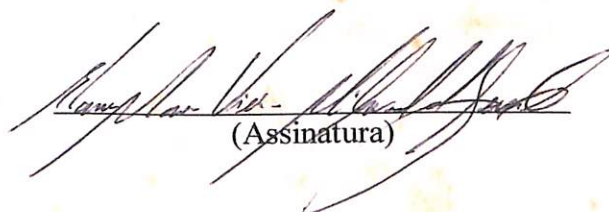
(Assinatura)

Maria de Lurdes de Azevedo Rodrigues



(Assinatura)

Eliane Maria Vieira Milward de Azevedo



(Assinatura)

Dedico este trabalho com muito carinho à professora Sueli de Souza Lima (UFJF) e aos tios Paulo Sérgio Roque e Maria das Graças Roque Prata Fernandes que foram importantes na minha formação como biólogo.

AGRADECIMENTOS

À Dr.^a Terezinha Padilha, pela orientação e pelo estímulo à pesquisa.

À Embrapa, Gado de Leite e à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), pela cessão de seus recursos físicos e materiais, como laboratórios, bibliotecas, áreas experimentais, animais, etc.

Ao corpo docente do Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária - Parasitologia Veterinária da UFRRJ, pelos seus conhecimentos transmitidos a mim através das disciplinas cursadas; aos amigos de pós-graduação e funcionários desta Universidade.

Ao amigo Carlos Alfredo Saumell, pelo acompanhamento de todo trabalho experimental e pelas válidas sugestões.

Aos amigos Clóvis de P. Santos, Ely Rodrigues Netto Júnior, Paula Hocayen de Paula, Janice Rocha Pedretti, Klinger Aparecido de Souza, Éder Sebastião dos Reis, José Placidino de Souza e Barcelos Carlos D`antas, os quais contribuíram no desenvolvimento do trabalho experimental.

À Professora Jane Azevedo da Silva, do departamento de Estatística da Universidade Federal de Juiz de Fora, pela análise estatísticas dos resultados.

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro.

BIOGRAFIA

MARCUS VINÍCIUS CORRÊA ROQUE, filho de Arthur Roque e Maria Lúcia Corrêa Roque, nasceu em Belo Horizonte – MG, aos 18 de março de 1971. Coursou o 1º e 2º graus em escolas públicas de Belo Horizonte. Graduou-se em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Juiz de Fora em 1995. Em 1993 foi bolsista de iniciação científica no Programa Especial de Treinamento (PET/CAPES) do Curso de Ciências Biológicas da referida Universidade. Em 1994 ingressou como bolsista de iniciação científica na Embrapa Gado de Leite, sendo também bolsista de aperfeiçoamento no período de agosto de 1995 a fevereiro de 1996, sob orientação da pesquisadora Dr.^a Terezinha Padilha, quando desenvolveu trabalhos de pesquisa sobre controle biológico de nematódeos gastrintestinais de ruminantes. Em 1994 fez estágio no Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia - CENARGEN/EMBRAPA, sob orientação do Dr. José Manuel Cabral S. Dias, com microorganismos do gênero *Bacillus*, como forma alternativa de controle da verminose em ruminantes. Em 1995 fez um curso

com a Dr^a Michele Peloille, na identificação de fungos nematófagos. Em 1996, iniciou o Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária - Parasitologia Veterinária, em nível de mestrado, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

CONTEÚDO

	Págs.
INTRODUÇÃO.....	1
REDUÇÃO NO NÚMERO DE LARVAS INFECTANTES DE <i>Haemonchus contortus</i> (RUDOLPHI, 1803) (NEMATODA: TRICHOSTRONGYLIDAE) EM FEZES OVINAS TRATADAS COM CONÍDIOS DE <i>Harposporium anguillulae</i> (LOHDE, 1874) (MYCOTA:DEUTEROMYCETES).....	16
1. RESUMO.....	16
2. SUMMARY	17
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
ANEXO1 – Reduction of <i>Haemonchus contortus</i> Infective Larvae by <i>Harposporium anguillulae</i> in Sheep Faecal Cultures	23

Págs.

EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CONÍDIOS DE <i>Harposporium anguillulae</i> (LOHDE, 1874) (MYCOTA: DEUTEROMYCETES) EM CULTIVO DE FEZES OVINAS CONTENDO OVOS DE <i>Haemonchus contortus contortus</i> (RUDOLPHI, 1803) (NEMATODA: TRICHOSTRONGYLIDAE) NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE NEMATÓDEOS DE VIDA LIVRE.....	25
1. RESUMO.....	25
2. SUMMARY	27
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE NEMATÓFAGA DE <i>Harposporium anguillulae</i> (LOHDE, 1874) (MYCOTA: DEUTEROMYCETES) SUBMETIDO AO ESTRESSE DIGESTIVO EM OVINOS.....	40
1. RESUMO.....	40
2. SUMMARY	42
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	43
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

ÍNDICE DAS FIGURAS

	Págs.
Figura 1. Órgãos de captura dos fungos nematófagos predadores.....	6
Figura 2. <i>Harposporium anguillulae</i>	7
Figura 3. Número médio de larvas de <i>Haemonchus contortus</i> recuperadas de fezes de dois ovinos no período pré e pós-administração via oral de uma dose única de $1,1 \times 10^8$ conídios de <i>Harposporium anguillulae</i>	48
Figura 4. Número médio de larvas infectantes de <i>Haemonchus contortus</i> recuperadas de fezes de dois ovinos (animais controle) no período pré e pós-administração via oral de água destilada.....	49

ÍNDICE DAS TABELAS

	Págs.
Tabela 1. Número de larvas infectantes (L₃) recuperadas em cada grama de fezes ovinas com ovos de <i>Haemonchus contortus</i> tratadas e não tratadas (amostras controle) com 300.000 esporos de <i>Harposporium anguillulae</i> por grama de fezes e a média aritmética de cada grupo.....	20
Tabela 2. Número de larvas infectantes de <i>Haemonchus contortus</i> e número de nematódeos de vida livre do gênero <i>Panagrellus</i> recuperados de cultivos de fezes ovinas tratadas com conídios de <i>Harposporium anguillulae</i>, e conídios desse fungo adicionado 500 <i>Panagrellus</i> por grama de fezes	36

INTRODUÇÃO

A verminose é uma doença parasitária endêmica que ocasiona redução da produtividade, principalmente em ruminantes criados em pastoreio. Dentre as verminoses que acometem os ruminantes, as provocadas por nematódeos da família Trichostrongylidae são as mais importantes. Esta família de nematódeos é representada por espécies que se desenvolvem e sobrevivem durante todo o ano nas regiões tropicais, em decorrência do clima favorável, fazendo com que os animais estejam sempre sujeitos a infecção e a reinfecção. Fatores climáticos, tais como, temperatura, umidade, tipo de vegetação e solo, afetam as fases de vida livre. Associadas aos fatores climáticos, práticas de manejo e a idade dos animais contribuem para a manutenção dos parasitos (CHARLES, 1992).

O conhecimento da época do ano em que as larvas ocorrem em maior ou menor número nas pastagens constitui um dado essencial para o entendimento da dinâmica populacional dos parasitos em determinada região e no estabelecimento de medidas de controle estratégico. De acordo com trabalhos realizados em diferentes regiões do Brasil, na estação chuvosa ocorre maior disponibilidade de larvas infectantes nas pastagens.

O número de helmintos adultos presentes nos animais é maior no período seco do que no chuvoso, observando-se portanto uma relação inversa entre o número de larvas infectantes nas pastagens e o número de larvas adultas presentes nos animais. Assim, para a maioria das nossas regiões, o controle estratégico dos helmintos, com três dosificações no período seco, é uma forma eficiente de controle da verminose dos ruminantes (CHARLES, 1992; BIANCHIN, 1996), já que ele elimina e/ou reduz a população contaminante, presente no animal, contribuindo para a redução da quantidade de larvas infectantes disponíveis para infecção e reinfecção. O desempenho dos animais em crescimento e o retorno econômico que o controle estratégico traz, faz deste método uma forma eficiente de controle da verminose em ruminantes (BIANCHIN, 1996; FURLONG, 1993). Portanto, os estudos epidemiológicos permitem conhecer o comportamento dos parasitos e viabilizam o uso de programas de controle. Os fatores climáticos e o manejo das pastagens influenciam na sobrevivência das larvas nas pastagens e são responsáveis pela manutenção das infecções nos animais.

Apesar da eficiência das recomendações de controle estratégico, a resistência anti-helmíntica (WALLER et al., 1996; ECHEVARRIA, 1996), resíduos na carne e no leite (PADILHA, 1996) e a ecotoxicidade de alguns compostos (HERD, 1996) são sérias ameaças para o uso exclusivo de anti-helmínticos, sendo que métodos não-químicos, como o uso de microorganismos que possam atuar nas formas de vida livre, constituem alternativa promissora para o controle dos nematódeos (WALLER, 1993).

Os fungos nematófagos constituem um grupo de microrganismos bastante propagados no ambiente onde colonizam e vivem na matéria orgânica do solo. De acordo

com a sua atividade, eles podem ser divididos em três grupos: ovicidas, predadores e endoparasitos (BARRON, 1977).

O primeiro grupo é composto pelos fungos que produzem hifas que se fixam nos ovos através de enzimas específicas que talvez estejam envolvendo o ovo. Inicialmente, o fungo estabelece um ponto de contato entre a hifa e a superfície do ovo. Em seguida, ele forma uma dilatação e danifica o complexo quitina-proteína da casca do ovo para efetuar a penetração. Após a penetração, o fungo forma ramos micelares no interior do ovo, consumindo o embrião. Este método de atuação, típico de *Verticillium chlamydospororum*, é importante sobre ovos de helmintos que permanecem um longo período no ambiente (LÝSEK & KRAJŠÍ, 1987; ARAÚJO et al., 1995).

O segundo grupo consiste nos fungos predadores em que as informações disponíveis sobre a sua atividade no controle de nematódeos parasitos de animais são quantitativamente maiores. Esses fungos, uma vez estabelecidos, têm extensivo desenvolvimento micelial no substrato. A captura dos nematódeos se faz por meio de especializações hifais em forma de armadilhas (Figura 1) com a finalidade de apreender os nematódeos (GRAY, 1987). O efeito e a seleção de fungos predadores sobre as formas pré-infectantes de várias espécies de nematódeos parasitos de animais tem sido investigado em vários trabalhos, havendo predomínio de estudos com isolados do gênero *Arthrobotrys* e *Duddingtonia* (PANDEY, 1973; NANSEN, 1986; GRONVOLD et al., 1987, 1988, 1989, 1993^a, 1993^b; LARSEN et al., 1991; ARAÚJO et al., 1992; MENDOZA-DE GIVES et al., 1992; WOLSTRUP et al., 1994; FAEDO, 1997). *Duddingtonia flagrans* vem sendo, recentemente, a espécie mais estudada, em virtude da sua capacidade de produzir uma

grande quantidade de clamidiosporos e a persistência nematófaga após a passagem pelo trato digestivo de ruminantes, eqüídeos e suínos (PELOILLE, 1991; WOLSTRUP et al., 1994; LARSEN et al., 1991, 1992, 1994, 1996, 1998; NANSEN et al., 1996; FERNÁNDEZ et al., 1997; KNOX & FAEDO, 1998), além de predação de formas de vida livre do verme pulmonar de ruminantes, *Dictiocaulus viviparus* (HENRIKSEN et al., 1997).

O terceiro grupo de fungos nematófagos é composto por fungos endoparasitas, em que os conídios em contato com sua presa se desenvolvem no interior do corpo do nematódeo, sendo os conídios a forma infectante. Portanto, eles não possuem desenvolvimento hifal externo, exceto no caso de hifas férteis, os conidióforos, que irão liberar posteriormente os esporos. Os fungos persistem no solo através destes conídios e penetram na vítima por adesão do conídio à cutícula do hospedeiro ou pela ingestão desses fungos, ocorrendo o desenvolvimento rápido através de hifas assimilativas que ocorrem pelo interior da vítima, produzindo, posteriormente, grande quantidade de conídios (BARRON, 1977; GRØNVOLD et al., 1993^b).

Entre os fungos endoparasitos, o gênero *Harposporium* tem sido isolado do solo, de folhas apodrecidas, madeira em decomposição, fezes e outros compostos orgânicos. Este gênero foi documentado, pela primeira vez, em 1874, por Lohde, que encontrou um isolado parasitando nematódeos e o denominou *Harposporium anguillulae* (GLOCKLING, 1993). Esta espécie tem a característica de produzir pequenos conídios, morfológicamente adaptados e capazes de serem ingeridos pelos nematódeos. Após a ingestão, os conídios se alojam preferencialmente nos tecidos da musculatura do esôfago, sendo a sua passagem favorecida pela elasticidade deste órgão. A partir do momento em

que se encontram no local de fixação, eles se tornam infectantes (Figura 2a). Posteriormente os conídios germinam, formando hifas assimilativas em seu interior, consumindo o conteúdo do corpo do nematódeo e posteriormente emitindo conidióforos que produzirão células conidiogênicas e conseqüentemente numerosos conídios de formato crescente (Figura 2b e 2c) (GRAY, 1987). Na observação em placas de petri, sua atividade sobre *Panagrellus* é intensa, pois a germinação dos conídios determina a morte do nematódeo. Em infecções antigas, clamidosporos são formados, apresentando parede espessa, servindo como uma estrutura de resistência do fungo (Figura 2c).

As informações em que se utilizam fungos endoparasitos no controle de formas pré-infectantes de trichostrongilídeos são escassas. Como agente para o controle biológico de nematódeos parasitos de ruminantes, *H. anguillulae* terá de possuir características importantes como passar pelo trato digestivo sem que perca a sua capacidade de realizar o nematofagismo. Este trabalho tem como objetivo verificar a eficiência de um isolado brasileiro de *H. anguillulae*, por meio de bioensaios *in vitro* e *in vivo*. Através dos bioensaios *in vitro* procurou-se verificar a quantidade de conídios por grama de fezes, capazes de reduzirem, significativamente, o número de larvas infectantes de *Haemonchus contortus* nas fezes. Os bioensaios *in vivo* tiveram como finalidade verificar a sua viabilidade após passagem pelo trato gastrintestinal de ovinos e a persistência da atividade nematófaga pós-passagem quando administrado em uma única dose.

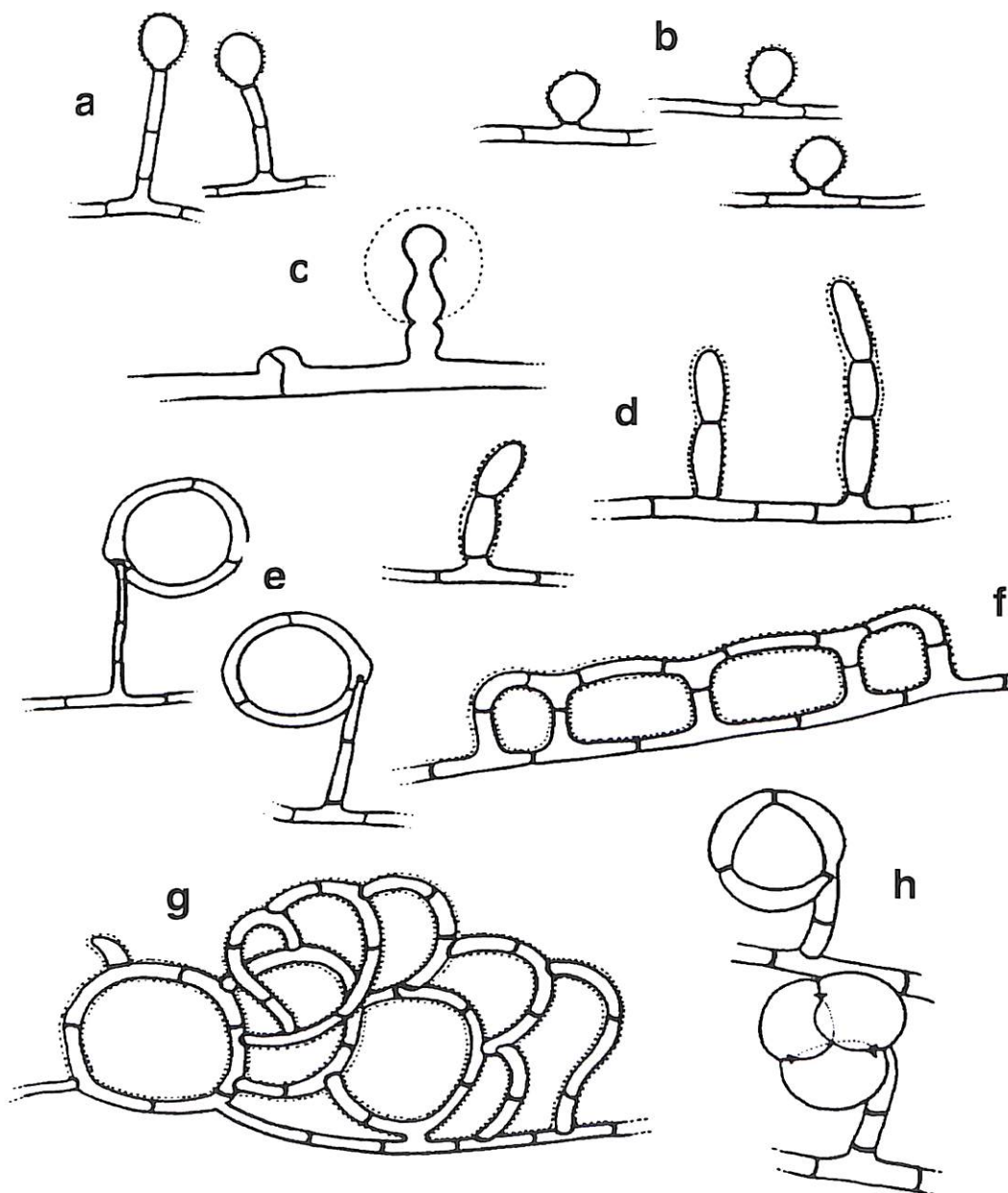


Figura 1 - Órgãos de captura de fungos nematófagos predadores: a) botões adesivos pedunculados; b) botões adesivos sésseis; c) botão adesivo ; d) hifas adesivas e) anéis não-constritores; f) hifa adesiva bidimensional; g) hifa adesiva tridimensional; h) anéis constritores (adaptado de Barron, 1977, com permissão).

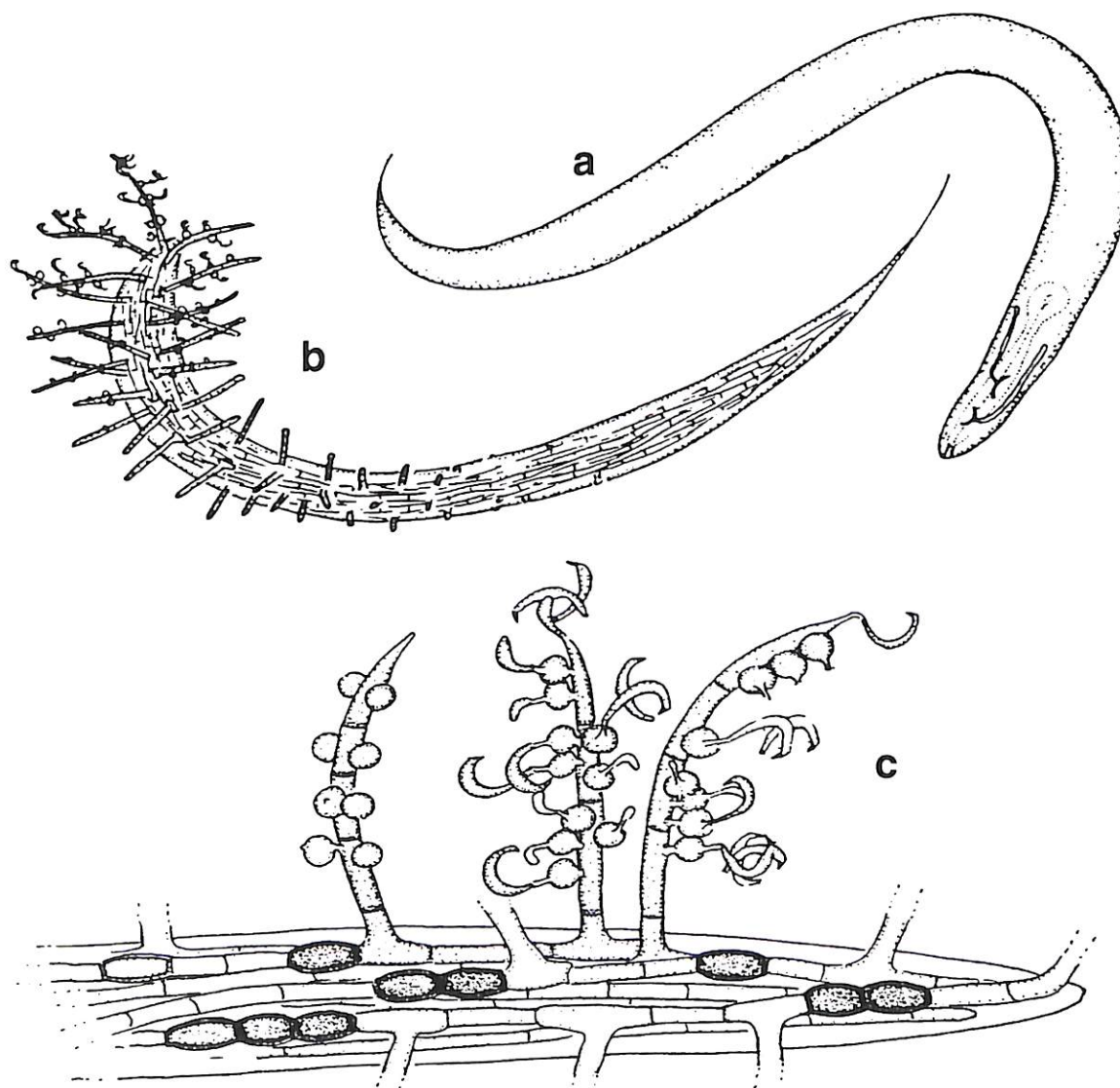


Figura 2. *Harposporium anguillulae* (adaptado de Barron, 1977, com permissão)

1. Referências Bibliográficas

- ARAÚJO, J.V.; SANTOS, M.A.; FERRAZ, S.; MAIA, A.S. & MAGALHÃES, A.C.M. 1992. Controle de larvas infectantes de *Haemonchus placei* por fungos predadores da espécie *Monacrosporium ellypsosporum* em condições de laboratório. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte v. 44, n.6, p.521-526.
- ARAÚJO, J.V.; SANTOS, M.A. & FERRAZ, S. 1995. Efeito ovicida de fungos nematófagos sobre ovos embrionados de *Toxocara canis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte v.47, n.1, p. 37-42.
- BARRON, G.L. 1977. The Nematode-destroyng fungi. **Canadian Biological Publications**. Guelph,. 140 p.
- BIANCHIN, I. 1996. Epidemiologia dos nematódeos gastrointestinais em bovinos de corte nos cerrados e o controle estratégico no Brasil. In: Padilha T., ed., **Controle dos nematódeos gastrintestinais em ruminantes**. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, p. 113-156.

- CHARLES, T.P. 1992. Verminose dos Bovinos de Leite. In: CHARLES, T.P.; FURLONG, J. **Doenças Parasitárias dos Bovinos de Leite**. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, p. 55-110.
- ECHEVARRIA, F. 1996. Resistência Anti-helmíntica. In: Padilha T., ed, **Controle dos nematódeos gastrintestinais em ruminantes**. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, p. 53-75.
- FAEDO, M.; LARSEN, M. & WALLER, P.J. 1997. The potential of nemathophagous fungi to control the free-living stages of nematodes parasites of sheep: comparison between Autralian isolates of *Arthrobotrys spp.* e *Duddingtonia flagrans*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 72, p. 149-155.
- FERNÁNDEZ, A.S.; LARSEN, M.; NANSEN, P.; GRØNVOLD, J.; HENRIKSEN, S.A. & WOLSTRUP, J. 1997. Effect of the nematode-traping fungus *Duddingtonia flagrans* on the free-living stages of horse parasitic nematodes: a plot study. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.73, p. 257-266.
- FURLONG, J.; SILVA, A.M.; VERNEQUE, R.S.; GARDNER, A.L. & BROCKINGTON, N.R. 1993. Análise bioeconômica do uso de anti-helmínticos em bezerros na Zona da Mata de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 2, n. 2, p. 119-126.

GLOCKLING, S.L. 1993. Eelworm-Eaters. The *Harposporium* and the host. **Mycologist**, Reading, v. 7, n. 3, p. 139-142.

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

GRØNVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; HENRIKSEN, S.A. & NANSEN, P. 1987. Field experiments on the ability of *Arthrobotrys oligospora* (Hyphomycetales) to reduce the number of larvae of *Cooperia oncophora* (Trichostrongylidae) in cow pats and surrounding grass. **Journal of Helminthology**, London, v.61, p.65-71.

GRØNVOLD, J.; NANSEN, P.; HENRIKSEN, S.A.; THYLIN, J. & WOLSTRUP, J. 1988. The capability of the predacious fungus *Arthrobotrys oligospora* (Hyphomycetales) to reduce numbers of infective larvae of *Ostertagia ostertagi* (Trichostrongylidae) in cow pats and herbage during the grazing season in Denmark. **Journal of Helminthology**, London, v.62, p. 271-280.

GRØNVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; HENRIKSEN, S.A.; NANSEN, P. & THYLIN, J. 1989. Attempts to control infection with *Ostertagia ostertagi* (Trichostrongylidae) in grazing calves by adding mycelium of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* (Hyphomycetales) to cow pats. **Journal of Helminthology**, London, v. 63, p. 115-126.

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

GRØNVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; NANSEN, P. & HENRIKSEN, S.A. 1993^b. Nematode-trapping fungi against parasitic cattle nematodes. **Parasitology Today**, Barking, v. 9, p. 137-140.

HENRIKSEN, Sv. Aa.; LARSEN, M.; GRØNVOLD, J.; NANSEN, P. & WOLSTRUP, J. 1997. Nematode-trapping fungi in biological control of *Dictyocaulus viviparus*. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v. 38, n. 2, p. 175-179.

HERD, R. 1996. Impactos ambientais associados aos compostos endectocidas. In: Padilha T., ed, **Controle dos nematódeos gastrintestinais em ruminantes**. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL., p. 95-111.

KNOX, J. & FAEDO, M. 1998. Biological control of field infection of nematode parasites of young sheep with *Duddingtonia flagrans*. In: INTERNATIONAL CONFERENCE NOVEL APPROACHES TO THE CONTROL OF HELMINTH PARASITES OF

LIVESTOCK, 2., 1998, Baton Rouge, **Abstracts...** Baton Rouge: Louisiana State University, p. 58.

LARSEN, M.; WOLSTRUP, J.; HENRIKSEN, S.A.; DACKMAN, C.; GRØNVOLD, J. & NANSEN, P. 1991. *In vitro* stress selection of nematophagous fungi for biocontrol of parasitic nematodes in ruminants. **Journal of Helminthology**, London, v. 65, p. 193-200.

LARSEN, M.; WOLSTRUP, J.; HENRIKSEN, S.A.; DACKMAN, C.; GRØNVOLD, J. & NANSEN, P. 1992. *In vivo* passage through calves of nematophagous fungi selected for bio-control of parasitic nematodes. **Journal of Helminthology**, London, v. 66, n. 2, p. 137-141.

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

LARSEN, M.; NANSEN, P.; GRØNDAHAL, C.; THAMSOBORG, S.M.; GRØNVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; HENRIKSEN, S.A. & MONRAD, J. 1996. The capacity of the fungus *Duddingtonia flagrans* to prevent strongyle infections in foals on pasture. **Parasitology**, Cambridge, v. 113, p. 1-6.

- LARSEN, M. 1998. Biological Control. In: INTERNATIONAL CONFERENCE NOVEL APPROACHES TO THE CONTROL OF HELMINTH PARASITES OF LIVESTOCK, 2., 1998, Baton Rouge. **Abstracts...** Baton Rouge: Louisiana State University, p. 30-31.
- LÝSEK, H. & KRAJŠÍ, D. 1987. Penetration of ovicidal fungus *Verticillium chlamydosporium* through the *Ascaris lumbricoides* egg-shells. **Folia Parasitologica**, Olomouc, v. 34, p. 57-60.
- MENDOZA-DE GIVES, P.; ZAVALETA-MEJIA, E.; QUIROZ-ROMERO, H.; HERRERA-RODRIGUEZ, D. & PERDOMO-ROLDAN, F. 1992. Interaction between the nematode-destroying fungus *Arthrobotrys robusta* (Hyphomycetales) and *Haemonchus contortus* infective larvae in vitro. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 41, p. 101-107.
- NANSEN, P.; GRØNVOLD, J.; HENRIKSEN, S. A. & WOLSTRUP, J. 1986. Predacious activity of the nematode-destroying fungus, *Arthrobotrys oligospora*, on preparasitic larvae of *Cooperia oncophora* and on soil nematode. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, Washington, v. 53, n. 2, p. 237-243.
- NANSEN, P.; LARSEN, M.; ROEPSTORFF, A.; GRØNVOLD, J.; WOLSTRUP, J. & HENRIKSEN, S.A. 1996. Control of *Oesophagostomum dentatum* and *Hyostrogylus rubidus* in outdoor-reared pigs by daily feeding with the microfungus *Duddingtonia flagrans*. **Parasitology Research**, [S.n.] v. 82, p. 580-584.

- PADILHA, T. 1996. Resíduos de anti-helmínticos na carne e leite. In: Padilha T., ed, **Controle dos nematódeos gastrintestinais em ruminantes**. Coronel Pacheco, Embrapa-CNPGL,. p. 77-93.
- PANDEY, V.S. 1973. Predatory activity of nematode trapping fungi against the larvae of *Trichostrongylus axei* and *Ostertagia ostertagi*: A possible method of biological control. **Journal of Helminthology**, London, v. 47, n. 1, p. 35-48.
- PELOILLE, M. 1991. Selection of nematode-trapping fungi for use in biological control. **Bulletin SROP (International Organization for Biological Control of Noxious Animals and Plants. West Palearctic Regional Section)**, Monnaie, v. 14, n. 2, p. 13-17.
- WALLER, P.J. 1993. Nematophagous fungi: prospective biological control agentes of animal parasitic nematodes ? **Parasitology Today**, Barking, v. 9, n. 11, p. 429-431.
- WALLER, P.J.; ECHEVARRIA, F.; EDDI, C.; MACIEL, S.; NARI, A. & HANSEN, J.W. 1996. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: general overview. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 62, p. 181-187.

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

REDUÇÃO NO NÚMERO DE LARVAS INFECTANTES DE
Haemonchus contortus (RUDOLPHI, 1803) (NEMATODA:
TRICHOSTRONGYLIDAE) EM FEZES OVINAS TRATADAS
COM CONÍDIOS DE *Harposporium anguillulae* (LOHDE,
1874) (MYCOTA: DEUTEROMYCETES)*

1. Resumo

Harposporium anguillulae é um fungo nematófago endoparasita que coloniza rapidamente bolos fecais de bovinos depositados em pastagem de *Brachiaria decumbens* na Zona da Mata de Minas Gerais. Seu efeito sobre os estádios infectantes de *Haemonchus contortus* em cultura de fezes ovinas, foi avaliada *in vitro*. A adição de 300.000 conídios

* Publicado no International Journal for Parasitology, In: CHARLES, T.P., ROQUE, M.V.C., & SANTOS, C. de P., 1996. Reduction of *Haemonchus contortus* infective larvae by *Harposporium anguillulae* in sheep faecal cultures. *International Journal for Parasitology*, Oxford, 26(5): 509 - 510.

por grama de fezes causou uma redução de 99,5%, comparado com o grupo controle. Estes resultados indicam que *H. anguillulae* pode ser um candidato para o desenvolvimento de estratégias para o biocontrole dos nematódeos trichostrongilídeos.

2. Summary

Harposporium anguillulae is a common nematophagous fungus which colonizes cattle pats deposited in *Brachiaria decumbens* pasture in Brazil. To assess its possible effect on free living stages of trichostrongylid nematodes, the reduction of *Haemonchus contortus* infective stages in sheep faecal culture was evaluated *in vitro*. Addition of 300,000 conidia per gram of faeces caused a reduction of 99.5% compared to the control group. This result indicates that *H. anguillulae* could be a candidate for the development of strategies for biological control of trichostrongylid nematodes.

3. Revisão de Literatura

Harposporium anguillulae foi o primeiro fungo descrito como parasito de nematódeos sendo relatado pela primeira vez em 1874 (GLOCKING, 1993). Este fungo é um endoparasito que produz uma grande quantidade de pequenos conídios de formato crescente, possuindo ambas as extremidades terminais agudas. Para infectar nematódeos, os conídios devem ser ingeridos pelo hospedeiro, o qual geralmente são espécies de

nematódeos que se alimentam de bactérias e pequenas partículas orgânicas. Devido à forma dos conídios, eles geralmente se alojam na porção anterior do canal alimentar onde os esporos germinam, produzindo septos, ramos de hifas que geralmente invadem os tecidos dos nematódeos, quebrando os órgãos internos. Durante seu crescimento, os conidióforos são formados e rompe-se para fora através da cutícula do nematódeo. Uma vez no exterior, várias células conidiogênicas de formato esférico são produzidas. Os conídios são então formados em aproximadamente 16 - 38 horas sobre uma prolongação terminal destas células. *Harposporium anguillulae* também forma clamidosporos que são geralmente formados na conidiogênese, quando parte das hifas assimilativas desenvolvem-se em uma parede espessa, os quais têm a capacidade de produzir conidióforos secundários (KARLING, 1938; ACHNER & KOHN, 1958).

H. anguillulae tem sido isolado de vários habitats (GLOCKLING, 1993). Na região tropical do Brasil, é um fungo nematófago comum e que coloniza bolos fecais de bovinos depositados em pastagem de *Brachiaria decumbens*, quando pode ser isolado em bolos fecais na região da Zona da Mata de Minas Gerais em apenas três dias após sua deposição. Seu crescimento e formação de esporos e clamidosporos em placas de Petri com ágar-água é rápido e sua atividade nematófaga sobre os estádios de vida livre dos nematódeos é intensa. Embora *H. anguillulae* colonize naturalmente bolos fecais de bovino depositados na pastagem e sua atividade nematófaga sobre os nematódeos que se alimentam de matéria orgânica seja conhecida, nenhuma avaliação sobre a sua atividade sobre os estádios de vida livre dos nematódeos trichostrongilídeos foi efetuado, os quais se distribuem no mesmo habitat, e cujos primeiro e segundo estádios larvares se alimentam de

matéria orgânica. Este trabalho apresenta os resultados de um experimento que visa demonstrar o possível efeito deste fungo sobre os estádios de vida livre de nematódeos trichostrongilídeos.

4. Material e Métodos

A obtenção do isolado de *Harposporium anguillulae* foi feita através de fezes bovinas depositadas em pastagem de *Brachiaria decumbens* no município de Coronel Pacheco, Minas Gerais. Os esporos foram produzidos a partir do meio de cultura de ágar-água (2%) com nematódeos atingidos. Os esporos foram recolhidos pela lavagem da superfície do ágar com água destilada e posteriormente vertidos em um béquer. A suspensão de esporos foi contada em uma Câmara de Neubauer e ajustados em 300.000 esporos/ml. Para a condução do bioensaio, 20 amostras de 2 g de fezes obtidas de um ovino com infecção pura de *Haemonchus contortus*, isolado no Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite (Embrapa Gado de Leite), foram pesadas e colocadas em recipientes plásticos individuais. Dois mililitros da suspensão de esporos foram adicionados em 10 amostras do grupo tratado, enquanto as 10 amostras do grupo controle receberam 2 ml de água destilada. As amostras tratadas e as amostras controle foram individualmente homogeneizadas e incubadas a 27°C por sete dias. Após incubação, as amostras foram baermanizadas para recuperação das larvas que sobreviveram, as quais foram preservadas em formalina a 10% para posterior contagem.

5. Resultados e discussão

O número de larvas (média aritmética) recuperadas em cada grama de fezes de amostras fecais tratadas foi de 2,6 (0 - 6), enquanto nas amostras do grupo controle a média foi de 593,5 larvas por grama (26 - 1107), representando uma redução de 99,5% (Tabela 1).

Tabela 1. Número de larvas infectantes (L₃) recuperadas em cada grama de fezes ovinas com ovos de *Haemonchus contortus* tratadas e não tratadas (amostras controle) com 300.000 esporos de *Harposporium anguillulae* por grama de fezes e a média aritmética de cada grupo.

	Tratado	Controle
Nº da amostra	0	924
1	4	627
2	3	26
3	5	778
4	0	154
5	3	217
6	3	902
7	0	215
8	6	985
9	2	1107
10	2.6	593.5
Média de L₃ recuperadas		

A seleção de fungos nematófagos para o uso no controle biológico de nematódeos de ruminantes concentra-se nos fungos predadores (WALLER & LARSEN, 1993). Estes resultados indicam que *H. anguillulae* pode ser usado em estratégias para reduzir biologicamente os estádios de vida livre dos nematódeos trichostrongilídeos na pastagem. Embora *H. anguillulae* seja um fungo endoparasita que necessita infectar

nematódeos para produzir esporos, ele pode ser produzido artificialmente em cultura pura (ASCHNER & KOHN, 1958). A produção massal de esporos para ser usado no controle biológico é um problema de técnicas a serem aperfeiçoadas. Os fungos do gênero *Harposporium* podem ter uma vantagem em substrato aquoso quando comparado a fungos predadores, pois seus esporos são facilmente dispersados e têm alta probabilidade de serem ingeridos pelos nematódeos. Além disto, admite-se que através da infecção oral o fungo se disperse para outros locais no habitat. Outra vantagem é que, quando a população de nematódeos declina, a de *Harposporium anguillulae* também decresce. Estas vantagens, apontadas por GLOCKLING (1993), são aplicados ao controle dos nematódeos trichostrongilídeos, especialmente para os parasitos de bovinos, porque as fezes destes animais têm um alto conteúdo de água. Estudos adicionais precisam ser feitos para identificar o número mínimo de conídios necessários para reduzir o número de larvas em cultura e avaliar sua habilidade e viabilidade após passagem pelo trato gastrintestinal.

6. Referências Bibliográficas

- ASCHNER, M. & KOHN, S. 1958. The biology of *Harposporium anguillulae*. **Journal of General Microbiology**, v. 19, p. 182-189.
- GLOCKLING, S.L. 1993. Eelworm-eaters. The *Harposporium* and the host. **Mycologist**, Reading, v. 7, p. 139-142.

KARLING, J.S. 1938. *Harposporium anguillulae*. **Mycologia**, New York, v. 30, p. 512-519.

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

Anexo I



Pergamon

International Journal for Parasitology, Vol. 26, No. 5, pp. 509–510, 1996
 Copyright © 1996 Australian Society for Parasitology. Published by Elsevier Science Ltd
 Printed in Great Britain
 0020-7519/96 \$15.00+0.00

PII: S0020-7519(96)00026-4

RAPID COMMUNICATION

Reduction of *Haemonchus contortus* Infective Larvae by *Harposporium anguillulae* in Sheep Faecal Cultures

T. P. CHARLES*, M. V. C. ROQUE and C. DE P. SANTOS

EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite,
 Rodovia MG 133 km 42, Coronel Pacheco, MG 36155-000, Brazil

(Received 1 December 1995; accepted 19 February 1996)

Abstract—Charles T. P., Roque M. V. C. & Santos C. de P. 1996. Reduction of *Haemonchus contortus* infective larvae by *Harposporium anguillulae* in sheep faecal cultures. *International Journal for Parasitology* 26: 509–510. *Harposporium anguillulae* is a common nematophagous fungus which colonizes cattle pats deposited in *Brachiaria decumbens* pasture in Brazil. To assess its possible effect on free living stages of trichostrongylid nematodes, the reduction of *Haemonchus contortus* infective stages in sheep faecal culture was evaluated *in vitro*. Addition of 300,000 conidia per gram of faeces caused a reduction of 99.5% compared to the control group. This result indicates that *H. anguillulae* could be a candidate for the development of strategies for the biological control of trichostrongylid nematodes. Copyright © 1996 Australian Society for Parasitology. Published by Elsevier Science Ltd.

Key words: Biological control; animal parasites; ruminants; trichostrongylid nematodes; nematophagous fungi; *Harposporium anguillulae*; integrated pest management.

INTRODUCTION

Harposporium anguillulae was the first fungus described as parasite of nematodes dating back to the late 1800s (Glockling, 1993). This fungus is an endoparasite which produces a great amount of small crescent-shaped conidia pointed at both ends. To infect nematodes, the conidia must be ingested by species which feed on bacteria and small organic particles. Due to the shape of the conidia, they generally lodge in the anterior portion of the nematode's alimentary canal where the spores germinate, producing septate, branching hyphae that invade the nematode's tissues, lysing the internal organs. During their growth, conidiophores are formed and break out through the nematode cuticle. Once on the exterior, several spherical conidiogenous cells are produced. Conidia are then formed in about 16–38 h on a prolongation at the end of these cells.

H. anguillulae also forms chlamydospores, generally after conidiogenesis, when part of the assimilative hypha develops into a thick-walled chlamydospore with the capacity to produce secondary conidiospores (Aschner & Kohn, 1958; Karling, 1938).

H. anguillulae has been isolated from several habitats (Glockling, 1993). In the tropical regions of Brazil it very commonly colonizes cattle pats deposited in *Brachiaria decumbens* pasture, where it can be found in the pats within 3 days after deposition. The fungus develops quickly and forms spores and chlamydospores in water-agar Petri dishes where nematophagous activity on free living nematodes added to the plates is intense (unpublished results). Although *H. anguillulae* is a natural colonizer of cattle pats and its nematophagous activity on nematodes which feed on organic matter is known, there is no information on its activity on free living stages of trichostrongylid nematode parasites, which share the same habitat, and whose first and second stage larvae feed on organic matter.

*To whom correspondence should be addressed. Tel/Fax: +55-32-215-8550.

This paper presents the results of an experiment aimed at the demonstration of the possible effects of this fungus on the free living stages of these nematodes.

The strain of *H. anguillulae* used was isolated from bovine faeces deposited in *B. decumbens* pastures. Spores were produced through the culture of the fungus on water agar (2%) Petri dishes inoculated with infected free living, as well as healthy, nematodes. The spores were recovered by washing the surface of the agar with distilled water into a beaker. The suspension of spores was counted in a Newbauer chamber and adjusted to 300,000 spores/ml. To conduct the bioassay, 20 samples of 2 g of faeces obtained from a sheep with a pure infection of *Haemonchus contortus* isolated at the Brazilian Dairy Cattle Research Center (EMBRAPA-CNPGL), were weighed and put into individual plastic cups. Two millilitres of the spore suspension were then added to 10 treated samples and 2 ml of distilled water to the other 10 control samples. Treated and control samples were individually homogenized and incubated at 27°C for 7 days. After incubation, the samples were baermanized to recover the surviving larvae, which were preserved in 10% formalin and counted. The average number of larvae (arithmetic mean) recovered in each gram of the treated faecal samples was 2.6 (0–6), whereas in the control samples there was an average of 593.5 larvae per gram (26–1107), representing a reduction of 99.5% (Table 1).

Research on selection of nematophagous fungi to be used in biological control of nematodes of live-stock is centered on predatory nematode-destroying fungi (Waller & Larsen, 1993). These results indicate that *H. anguillulae* could be used in strategies to reduce biologically free living stages of trichostrongylid nematodes in pastures. It should be noted that although *H. anguillulae* is an endoparasitic fungus and needs to infect nematodes to produce spores, it can be produced artificially in pure culture (Aschner & Kohn, 1958). Mass production of spores to be used for biological control is a matter of perfecting the techniques. In addition, fungi of the genus *Harposporium* could have an advantage in

Table 1—Number of larvae recovered in each gram of sheep faeces containing eggs of *H. contortus* treated and untreated (control samples) with 300,000 spores of *H. anguillulae* per gram of faeces and the arithmetic mean of each group

Sample no.	Treated	Control
1	0	924
2	4	627
3	3	26
4	5	778
5	0	154
6	3	217
7	3	902
8	0	215
9	6	985
10	2	1107
Arithmetic mean	2.6	593.5

watery substrates when compared to predatory nematode-destroying fungi, as their spores are easily dispersed and have a high likelihood of being ingested by nematodes. Besides, oral infection allows the fungus to spread to other locations in the habitat. Another advantage is that once the nematode population declines, *Harposporium* also dies off. These advantages, pointed out by Glockling (1993), are applicable to the control of trichostrongylid nematodes, especially for cattle parasites because cattle faeces have a high water content. Additional studies are needed to identify the minimal number of spores required to reduce the number of larvae in culture significantly and to evaluate their ability to survive passage through the gastrointestinal tract.

REFERENCES

- Aschner M. & Kohn S. 1958. The biology of *Harposporium anguillulae*. *Journal of General Microbiology* **19**: 182–189.
- Glockling S. L. 1993. Eelworm-eaters. The *Harposporium* and the host. *Mycologist* **7**: 139–142.
- Karling J. S. 1938. *Harposporium anguillulae*. *Mycologia* **30**: 512–519.
- Waller P. J. & Larsen M. 1993. The role of nematophagous fungi in the biological control of nematode parasites of livestock. *International Journal for Parasitology* **23**: 539–546.

**EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE
CONÍDIOS DE *Harposporium anguillulae* (LOHDE, 1874)
(MYCOTA: DEUTEROMYCETES) EM CULTIVO DE FEZES
OVINAS CONTENDO OVOS DE *Haemonchus contortus*
(RUDOLPHY, 1803) (NEMATODA:
TRICHOSTRONGYLIDAE) NA AUSÊNCIA E PRESENÇA
DE NEMATÓDEOS DE VIDA LIVRE**

1. Resumo

A utilização de fungos nematófagos visando a redução da disponibilidade de larvas infectantes de nematódeos trichostrongilídeos é uma estratégia que tem sido explorada em vários estudos recentes. *Harposporium anguillulae*, uma espécie de fungo que ocorre com frequência em fezes bovinas e ovinas depositadas em ambiente tropical e temperado, possui atividade comprovada nas formas larvares desses nematódeos. Para

verificar o efeito da adição de diferentes concentrações de conídios desse fungo no ambiente fecal na presença e ausência de nematódeos de vida livre, 140 amostras individuais de 5g de fezes ovinas contendo ovos de *Haemonchus contortus* (1.490 ± 290) foram pesadas. Em seguida, seis grupos de dez amostras receberam cada um 5 ml de uma suspensão contendo 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 2×10^5 , 3×10^5 conídios/grama de fezes, respectivamente. Seis outros grupos de 10 amostras cada receberam além da suspensão de conídios, 500 nematódeos de vida livre do gênero *Panagrellus* por cada grama de fezes. Um grupo de 10 amostras recebeu apenas 5ml de água destilada, enquanto um outro grupo recebeu água destilada e 500 nematódeos de vida livre por cada grama de fezes. Após o tratamento, as amostras foram individualmente homogenizadas e incubadas a 25°C por sete dias. Após incubação, larvas infectantes e nematódeos de vida livre foram recuperadas através da baermanização, fixadas e preservadas para contagem posterior. A quantidade de larvas recuperadas dos cultivos foi inversamente proporcional a densidade de conídios. *H. anguillulae* tem a capacidade de reduzir significativamente os estágios pré-parasitários de nematódeos trichostrongilídeos em mais de 80% quando a concentração de 2×10^5 conídios esta presente em cada grama de fezes. Quando os cultivos fecais foram adicionados de conídios e nematódeos de vida livre, maiores reduções no número de larvas foram observados nas maiores concentrações. A presença de nematódeos de vida livre e um possível incremento da atividade do fungo através do aumento da densidade do inóculo ocorreu apenas na concentração de 3×10^5 conídios por grama de fezes ($p=0,022$). *H. anguillulae* é um fungo promissor. Estudos adicionais que possam contribuir com a sua

caracterização e definição da sua potencialidade para uso associado ou isolado são desejáveis.

2. Summary

The use of nematophagous fungi to reduce infective larvae availability in pasture is a strategy studied in recent years to control nematode infection in ruminants. *Harposporium anguillulae*, a fungus species commonly found in cattle and sheep feces deposited in tropical and temperate environment, is active against developing larval stages of trichostrongylid nematodes. To define the effect of the addition of different densities of conidia of this fungus in the presence and absence of free-living nematodes, 140 individual samples of 5g of sheep feces containing eggs of *Haemonchus contortus* (1.490 ± 290) were weighed. From these samples, six groups of 10 samples each received 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 2×10^5 and 3×10^5 conidia per gram of feces. Six other groups of 10 samples each received in addition to the conidia suspension 500 free-living nematodes (*Panagrellus* sp.) per gram of feces. One group containing 10 samples received only distilled water and another group of 10 samples received distilled water and 500 free-living nematodes per gram of feces. All samples were incubated at 25°C for seven days after which they were baermanized to recover infective larvae. Recovered larvae were fixed and preserved for counting. The number of larvae recovered in the cultivates was lower when conidia densities were higher. *H. anguillulae* can reduce in more than 80% the number of larvae when the concentration of conidia is equal or higher than 2×10^5 conidia per gram of feces ($P < 0,05$). Reduction in

the number of larvae in the cultivates in which free-living nematodes were added were also higher in higher densities. The presence of free-living nematodes and a possible increment in the density of the inoculum due to it happened only when the density was 3×10^5 conidia per gram of feces ($p=0,022$). *H. anguillulae* is a promising fungus. Additional studies that can further characterize its potential as a biocontrol agent of trichostrongilyd nematodes are needed.

3. Revisão de Literatura

O desenvolvimento de estratégias não-quimioterapêuticas que possam contribuir com a implementação de medidas de controle integrado das nematodioses gastrintestinais de ruminantes é uma necessidade, sobretudo nas regiões tropicais onde os animais são criados em sistemas de produção dependente, em sua maioria, do uso contínuo de pastagens (WALLER, 1997; 1998). A possível utilização de microrganismos no biocontrole das formas de vida livre de nematódeos trichostrongilídeos é uma estratégia que tem sido explorada em vários estudos desenvolvidos nos últimos anos. Dentre os microrganismos explorados, os fungos nematófagos são considerados os mais promissores de serem incorporados nos processos de controle em curto/médio prazo (WALLER & FAEDO, 1996).

Os fungos nematófagos atuam através da predação ou endoparasitismo. Os estudos se concentram nos gêneros predadores *Arthrobotrys* e *Duddingtonia* (WALLER &

FAEDO, 1996), principalmente em *Duddingtonia flagrans* (LARSEN, 1998), sendo pouco conhecida a atividade dos fungos nematófagos endoparasitas nos estágios larvares de nematódeos trichostrongilídeos. Estudos preliminares indicam que dois gêneros endoparasitas, *Drechmeria* e *Harposporium*, são capazes de reduzir significativamente o número de larvas infectantes em cultivos fecais (SANTOS & CHARLES, 1995; CHARLES et al., 1996).

A espécie *Harposporium anguillulae* ocorre com frequência em fezes bovinas e ovinas depositadas em ambiente tropical e temperado. No Brasil, esta espécie foi encontrada em fezes bovinas e ovinas em pastagem de *Brachiaria decumbens*, no município de Coronel Pacheco, Minas Gerais, três dias após a deposição (SAUMELL et al., 1996). O nematofagismo de um isolado brasileiro quando observado em placas com nematódeos de vida livre, é intenso. Esta atividade foi comprovada nas formas larvares de nematódeos trichostrongilídeos quando 300 000 conídios foram adicionados a cada grama de fezes contendo ovos de *Haemonchus contortus*. Nessa concentração *H. anguillulae* ocasionou uma redução no número de larvas infectantes de 99,5% (CHARLES et al., 1996).

H. anguillulae é um fungo cosmopolita que ocorre em vários habitats (GLOCKLING, 1993). Ele infecta nematódeos através da ingestão de conídios. No processo de multiplicação ele determina a morte dos nematódeos e a produção de conídios e clamidosporos. Sendo um endoparasito obrigatório ele necessita infectar nematódeos para completar seu ciclo de vida na natureza (ASCHNER & KOHN, 1958).

Apesar de *H. anguillulae* ser um endoparasito, técnica de cultivo artificial independente do nematofagismo é disponível. Contudo, tanto através do cultivo dependente do nematofagismo quanto pelo cultivo independente da presença de nematódeos o

processo de produção é laborioso (LOHMANN & SIKORA, 1989). Assim, o conhecimento da densidade mínima de conídios que possam reduzir significativamente o número de larvas de nematódeos trichostrongilídeos é uma necessidade para que haja uma melhor eficiência na utilização deste fungo em uma possível formulação.

Entre os organismos que compõem a coprofauna existem várias associações, incluindo microrganismos e invertebrados. Algumas dessas associações podem auxiliar na potencialização da atividade de alguns grupos. Por exemplo, fezes bovinas e ovinas em pastagens de *B. decumbens* são colonizadas por *H. anguillulae* em três dias. Este fato indica que as fezes foram inicialmente colonizadas por nematódeos de vida livre presentes no solo. A presença de nematódeos de vida livre pode potencializar a atividade de *H. anguillulae* contra as larvas de nematódeos trichostrongilídeos já que estes nematódeos podem incrementar a densidade do inóculo, além de contribuir com a sua dispersão.

O objetivo deste trabalho foi quantificar a eficácia de um isolado brasileiro de *H. anguillulae* na redução de larvas infectantes de nematódeos trichostrongilídeos em diferentes concentrações de conídios na ausência e na presença de nematódeos de vida livre.

4. Material e Métodos

Para testar a atividade das diferentes concentrações de conídios e a possível associação de sua atividade com a presença de nematódeos de vida livre adicionou-se diferentes concentrações a fezes de ovinos com ou sem nematódeos de vida livre.

Inicialmente, 140 amostras individuais de 5g de fezes ovinas contendo ovos de *H. contortus* (1490 ± 290) ovos por grama de fezes, determinados pela técnica de GORDON & WHITLOCK, 1939) foram pesadas. Em seguida, seis grupos de dez amostras receberam cada um 5 ml de suspensão contendo 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 2×10^5 , 3×10^5 conídios/grama de fezes, respectivamente. Seis outros grupos de dez amostras cada um receberam, além da suspensão de conídios, 500 nematódeos de vida livre do gênero *Panagrellus* por grama de fezes. Um grupo de dez amostras recebeu apenas 5ml de água destilada, enquanto um outro grupo recebeu água destilada e 500 nematódeos de vida livre por grama de fezes. Após o tratamento, as amostras foram individualmente homogenizadas e incubadas a 25°C por sete dias. Após incubação, elas foram recuperadas pela técnica de ROBERT O'SULLIVAN (1950), por um período de 24 horas, para recuperação das larvas infectantes e dos nematódeos de vida livre. As larvas e os nematódeos recuperados foram fixadas e preservadas em formalina 10% para contagem posterior. O número de larvas e nematódeos de vida livre recuperados dos cultivos foram analisados após a transformação logarítmica em que se usou a expressão $x = \log_{10}(x + 1)$. Para o teste de duas médias para amostras independentes, usaram-se os procedimentos para populações homocedásticas ou heterocedásticas, de acordo com o teste de Levene. No caso de comparação de três ou mais médias (Análise de Variância) foi utilizado o teste de Tukey (*post hoc*) para identificação das médias que apresentaram diferenças significativas, também ao nível de significância de 5% (HENKEL, 1976; GLANTZ, 1992). Para as análises utilizou-se o aplicativo SPSS, Base for Windows, versão 7.5 (SPSS, 1997).

$$\% \text{eficácia} = \frac{C - T}{C} \times 100$$

onde:

C: indica a média do nº de larvas recuperadas do grupo não tratado.

T: indica a média do nº de larvas recuperadas do grupo tratado.

O isolado de *H. anguillulae* utilizado no bioensaio foi obtido de fezes bovinas depositadas em pastagem de *Brachiaria decumbens* implantada na Estação Experimental de Coronel Pacheco (EECP) da Embrapa Gado de Leite. O fungo foi isolado no dia 10/04/95 e estava armazenado em tubo contendo ágar água (2%) e nematódeos de vida livre desde o dia 20/3/96 sob refrigeração, sendo estimulado novamente no dia 19/11/97. Os conídios foram produzidos através do cultivo em placas de Petri com ágar água (2%) e nematódeos de vida livre. Após o cultivo, os conídios foram recolhidos pela lavagem superficial do ágar com água destilada. A suspensão obtida foi contada com auxílio do hemacitômetro e ajustada para as seguintes concentrações: 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 2×10^5 e 3×10^5 conídios/ml.

A atividade nematófaga do isolado de *H. anguillulae*, assim como uma possível presença de outros fungos nematófagos nas fezes ovinas utilizadas no bioensaio foram verificados. Para comprovar a ação nematófaga, dez placas de Petri contendo ágar-água (2%) receberam suspensões de 10^5 conídios e 1600 nematódeos de vida livre por placa, adicionados como iscas. Para verificar uma possível presença de fungos nematófagos, dez amostras de 5g de fezes foram inoculadas individualmente no centro das placas de Petri com ágar-água (2%) e nematódeos de vida livre. Tanto as placas inoculadas para verificação da atividade nematófaga do isolado, quanto as destinadas a verificação de uma

possível contaminação das fezes ovinas foram incubadas durante 21 dias a 25°C e observadas periodicamente para identificação da multiplicação do fungo.

Os nematódeos de vida livre, do gênero *Panagrellus*, são mantidos no Laboratório de Helminologia da Embrapa Gado de Leite por meio de passagens sucessivas em meio de aveia umedecida com água destilada. Os nematódeos utilizados foram recuperados dos cultivos por meio de lavagens superficiais e submetidos a lavagens sucessivas em água destilada antes do seu uso. O inóculo foi quantificado através de diluições.

As fezes utilizadas no bioensaio foram obtidas de cinco ovinos com 6 meses de idade. Eles abrigavam infecção monoespecífica com *H. contortus*, produzida através de infecção experimental com uma cepa proveniente de Bagé/RS (Embrapa-Pecuária do Sul). Os animais foram estabulados na EECP e recebiam alimentação conservada.

5. Resultados e discussão

Os vinte meses em que o isolado de *H. anguillulae* utilizado no bioensaio ficou sob refrigeração não afetou a sua atividade nematófaga. Nos cultivos para verificação da ação das suspensões usadas sobre nematódeos de vida livre, no quarto dia pós-inoculação, uma das dez placas já apresentavam os conidióforos do fungo saindo através da cutícula dos nematódeos já mortos. No dia seguinte, esta mesma placa continha conídios. No sétimo dia, duas placas apresentavam nematódeos atingidos e baixa produção de conídios e em

uma placa todos os nematódeos estavam atingidos e havia uma abundante produção de conídios. Sete das dez placas, possuíam nematódeos sem movimentação no décimo-quarto dia pós-inoculação, e em três placas clamidoporos podiam ser evidenciados.

As fezes ovinas utilizadas no bioensaio eram livres de outros fungos nematófagos. Nenhuma espécie de fungo predador ou endoparasito foi observado nas placas cultivadas com este objetivo.

A quantidade de larvas recuperadas dos cultivos onde se adicionou conídios de *H. anguillulae* foi inversamente proporcional a densidade de conídios (Tabela 2). *H. anguillulae* tem a capacidade de reduzir significativamente os estágios pré-parasitários de nematódeos trichostrongilídeos em mais de 80% quando a concentração de 2×10^5 conídios está presente em cada grama de fezes, reduzindo portanto a necessidade do inóculo inicialmente identificado como 3×10^5 conídios por grama (CHARLES et al., 1996).

Quando os cultivos fecais foram adicionados de conídios e nematódeos de vida livre, maiores reduções no número de larvas foram observados nas maiores concentrações (Tabela 2). Contudo, o número de nematódeos de vida livre recuperados desse cultivos, não segue a mesma tendência, reduções não ocorreram (Tabela 2).

A presença de nematódeos de vida livre e um possível incremento da atividade do fungo, através do aumento da densidade do inóculo, ocorreu apenas na concentração de 3×10^5 conídios por grama de fezes ($p=0,022$). Apesar do nematódeo de vida livre poder exercer um papel potencializador, a densidade de conídios é igualmente importante para que eles sejam disponíveis para ingestão e permitir a multiplicação do fungo e conseqüentemente aumento da densidade do inóculo. Embora na densidade de 3×10^5 conídios por grama de fezes, a presença de nematódeos tenha ocasionado diferença significativa, o percentual de

redução larval ocasionado por esta adição, quando comparado com o grupo onde apenas conídios foram adicionados foi de 91%. Possivelmente, este pouco acréscimo à redução (4,0%) seja devido ao período de tempo necessário para ingestão e ação do fungo. Em placas, o período para produção de conídios foi no mínimo de cinco dias. O período nas fezes, possivelmente seja menor, mas mecanismos que tornem o processo mais rápido no substrato fecal são necessários para que a potencialização seja mais evidente.

Incrementos na atividade do fungo pela presença de nematódeos de vida livre é desejável. Contudo, a possibilidade de ação nestes organismos, não alvo do controle biológico dos nematódeos trichostrongilídeos, podem ocasionar impactos ambientais ainda impossível de serem antecipados. Assim, a concentração de 2×10^5 conídios por grama de fezes é possivelmente mais adequada, já que ela não ocasionou impacto na população de nematódeos de vida livre adicionados às fezes.

Para infectar os nematódeos, *H. anguillulae* requer que seus conídios sejam ingeridos. Este fato, determina que eles precisem estar disponíveis em grande quantidade no substrato para facilitar a ingestão pelas larvas de primeiro e segundo estágios dos nematódeos trichostrongilídeos que se desenvolvem rapidamente nas fezes (menos de 48 horas).

A forma de infecção de *Harposporium anguillulae* e *Drechmeria coniospora*, que também é um fungo endoparasita, são distintas sendo que em *D. coniospora* os conídios se aderem à cutícula do nematódeo. A adesão de conídios deve ocorrer antes que a larva se torne infectante, devido a cutícula deste estágio que protege contra à infecção pelo fungo (JANSSON et al., 1985, SANTOS et al., 1995). Em *Drechmeria coniospora*,

por exemplo, 10^8 conídios por grama são necessários para ocasionar reduções significativas.

Estudos adicionais que possam contribuir para melhor caracterização de *H. anguillulae* no biocontrole de nematódeos trichostrongilídeos são necessários. Este fungo, além de possuir um conídio com tamanho e formato que facilitam a dispersão no ambiente fecal, mantém a sua capacidade nematófaga por um período longo de armazenamento. Além disso, o inóculo necessário para reduzir significativamente o número de larvas de nematódeos trichostrongilídeos é reduzida quando comparada com *Drechmeria coniospora*, único fungo endoparasita que possui atividade contra estes estágios pré-parasitários conhecida. Estes fatos tornam este fungo promissor para emprego no controle biológico de nematódeos trichostrongilídeos em uso isolado ou em associação com outros fungos que utilizam estratégias de atuação semelhantes ou diferentes.

Tabela 2. Número de larvas infectantes de *Haemonchus contortus* e número de nematódeos de vida livre do gênero *Panagrellus* recuperados de cultivos de fezes ovinas tratadas com conídios de *Harposporium anguillulae*, e conídios desse fungo adicionando 500 *Panagrellus* por grama de fezes.

	Conídios	Conídios e nematódeos de vida livre	
		Larvas infectantes	Nematódeos de vida livre
		a	a
		721 ± 268	259 ± 165
	a	(0) a	111 ± 89 (57) a
Controle	1728 ± 590 (56) a	758 ± 339 (39) a	106 ± 105 (60) a
10^2	762 ± 471 (66) a	443 ± 293 (35) a	81 ± 164 (69) a
10^3	589 ± 322 (66) a	466 ± 398 (52) a	130 ± 172 (50) a
10^4	583 ± 414 (67) a	349 ± 207 (71) b	179 ± 86 (31) a
10^5	564 ± 337 (84) b	212 ± 121 (79) b	138 ± 101 (47) a
2×10^5	269 ± 89 (87) b	150 ± 55	
3×10^5	220 ± 116		

• Os números entre parênteses representam a porcentagem de redução do número de larvas. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas.

6. Referências bibliográficas

- ASCHNER, M. & KOHN, S. 1958. The biology of *Harposporium anguillulae*. **Journal of General Microbiology** v. 19, p. 182-189.
- CHARLES, T.P., ROQUE, M.V.C., SANTOS, C.P. 1996. Reduction of *Haemonchus contortus* infective larvae by *Harposporium anguillulae* in sheep faecal cultures. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.26, n.5, p. 509-510.
- GLANTZ, S.A. 1992. Primer of biostatistics. 3 ed. **Mc Graw Hill Inc.** New York, 440 p.
- GLOCKLING, S.L. 1993. Eelworm-eaters. The *Harposporium* and the host. **Mycologist**, Reading, v.7, p.139-142.
- GORDON, H. McL., WHITLOCK, H.V. 1939. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of the Council Scientific and Industrial Research of Australia**, v. 12 p. 50-52.
- HENKEL, R.E. 1976. Tests of significance. Sage QASS Series, **Sage Publications**, California. 92 p.

JANSSON, H., JEYPRAKASH, A., ZUCKERMAN, B.M. 1985. Differential adhesion and infection of nematodes by the endoparasitic fungus *Meria coniospora* (Deuteromycetes). **Appli. Environm. Microbiol.**, v. 49, p 552-555.

LARSEN, M. 1998. Biological Control. In: INTERNATIONAL CONFERENCE NOVEL APPROACHES TO THE CONTROL OF HELMINTH PARASITES OF LIVESTOCK, 2., 1998, Baton Rouge, **Abstracts**, Baton Rouge, Lousiana State University, p. 30-31.

LOHMANN, U., SIKORA, R.A. 1989. Mass production of the endoparasitic fungi *Drechmeria coniopora*, *Verticillium balanoides* e *Harposporium anguillulae* em líquido culture. **Nematologica**, Leiden, v.35, p.97-104.

ROBERTS, F.H.S., O'SULLIVAN, P.J. 1950. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. **Australian Journal for Agricultural Research**, East Melbourne, v.3, p. 187-226.

SANTOS, C.P., CHARLES, T.P. 1995. Efeito da aplicação de conídios de *Drechmeria coniospora* em cultivos de fezes contendo ovos de *Haemonchus contortus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.47, n.2, p. 123-128.

SAUMELL, C.A.; SANTOS, C. de P.; PADILHA, T. 1996. Colonization of cow pats by nematophagous fungi in the Mata Region of Minas Gerais State, Brazil. In: SIMPÓSIO

- DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5, 1996, Foz do Iguaçu, **Anais** Foz do Iguaçu; EMBRAPA-CNPSO, p.62.
- SPSS. 1997. Statistical Package for Social Science. Base for Windows. v. 7.5 Chicago.
- WALLER, P.J., FAEDO, M. 1996. The prospects for biological control of the free-living stages of nematode parasites of livestock. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.26, p. 915-925.
- WALLER, P.J. 1997. Sustainable helminth control of ruminants in developing countries. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.71, p. 195-207.
- WALLER, P.J. 1998. Parasite epidemiology, resistance and the prospects for implementation of alternative control programs. In: **BIOLOGICAL CONTROL OF GASTRO-INTESTINAL NEMATODES OF RUMINANTS USING PREDACIOUS FUNGI**, Ipoh, Malaysia, p. 1-10.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE NEMATÓFAGA DE *Harposporium anguillulae* (LOHDE, 1874) (MYCOTA: DEUTEROMYCETES) SUBMETIDO AO ESTRESSE DIGESTIVO EM OVINOS

1. Resumo

A capacidade de determinadas espécies de fungos nematófagos passarem pelo trato digestivo de ruminantes é uma característica desejável para a provável utilização de um fungo promissor no controle integrado da verminose. Nenhuma informação é disponível para fungos que utilizam a estratégia de ingestão de conídios como *Harposporium anguillulae* que possui atividade comprovada em formas de vida livre de nematódeos trichostrongilídeos em determinadas densidades no ambiente fecal. Este trabalho visa caracterizar a resistência de um isolado brasileiro de *H. anguillulae* em passar pelo trato digestivo de ruminantes, assim como a sua dinâmica de passagem, a persistência de sua

atividade nematófaga pós-passagem e a redução de larvas de nematódes trichostrongilídeos quando administrado em dose única. Para isto, durante seis dias consecutivos foram coletadas fezes de quatro ovinos infectados com uma cultura pura de *Haemonchus contortus*. No sexto dia dois desses animais receberam por via oral uma suspensão contendo 110.000.000 de conídios de *H. anguillulae*, enquanto dois outros receberam apenas água destilada. Após a administração dos conídios, fezes foram coletadas em todos os quatro animais num intervalo de 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72 e 96 horas. As fezes coletadas foram submetidas a exame para determinação do número de ovos e larvas por grama de fezes. A possível presença de *H. anguillulae* nas fezes dos ovinos antes e após a administração dos conídios foi avaliada através do cultivo em placas de petri contendo agar água e nematódeos de vida livre. *H. anguillulae* foi capaz de sobreviver a passagem pelo trato digestivo e manter a atividade nematófaga. Ele foi recuperado das fezes dos animais tratados da 12^a até a 72^a hora após a administração dos conídios. Apesar do fungo ter sido capaz de passar pelo trato digestivo dos ovinos, nenhum efeito associado a sua presença foi observado quando o número médio de larvas recuperado nos cultivos pós-administração da suspensão fungica foi comparado ao número pré-administração. A capacidade de passar pelo trato digestivo e manter a atividade nematófaga torna *H. anguillulae* um fungo promissor. Contudo, esforços devem ser direcionados ao desenvolvimento de técnicas de produção massal que permita a sua utilização continuada e a obtenção de densidades elevadas no ambiente fecal.

2. Summary

The capability of some species of nematophagous fungi to withstand passage through the gut of ruminants maintaining its nematophagous activity, is a desirable characteristic in the selection of species to be used in the biological control of free-living stages. No information is available in fungus that produces spores that need to be ingested by nematodes, such as *Harposporium anguillulae*, an efficient fungus to reduce infective larvae in the fecal environment when in high densities. To characterize this capability in *H. anguillulae* as well as its passage dynamics, its nematophagous activity post-passage and the reduction of infective larvae a single dose of $1,1 \times 10^8$ conidia were administered in an aqueous suspension to two sheep infected with *Haemonchus contortus*. Feces were collected in the animals 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72 and 96 hours after fungi administration. The presence of *H. anguillulae* in the collected feces was investigated by culture of fecal samples in plates in which free-living nematodes were added as baits. The reduction of infective larvae was studied through counting the larvae recovered by baermanization of cultures of feces for seven days at 25°C. *H. anguillulae* was able to withstand gut passage and keep its nematophagous activity as it was demonstrated in plates. The fungus was isolated in feces of the animals from 12 up to 72 hours after inoculum administration. However, its presence in feces was not associated with any reduction in the number of larvae recovered in the cultivates. This data indicates that *H. anguillulae* is a promising fungus to be used in the biocontrol of trichostrongylid nematodes of ruminants. Efforts should be concentrated in the development of techniques to mass-produce conidia to make viable its use viable.

3. Revisão de Literatura

A capacidade de determinadas espécies de fungos nematófagos passarem pelo trato digestivo de ruminantes é uma característica desejável para a provável utilização de um fungo promissor no controle integrado da verminose (PADILHA & MENDOZA-DE GIVES, 1996). Esta capacidade permite que ao serem administrados aos animais os estágios reprodutivos tenham acesso as fezes onde ovos e larvas se desenvolvem. Nas fezes, um meio rico em nutrientes, as formas reprodutivas se multiplicam e exercem sua atividade impedindo o desenvolvimento e/ou migração das larvas para as pastagens. Isolados com esta capacidade tem sido objeto de vários estudos em diversas regiões. (HASHMI & CONNAN, 1989; LARSEN et al., 1995; LARSEN et al., 1996; NANSEN et al., 1995; GITHIGIA et al., 1997).

As poucas espécies de fungos nematófagos em que o nematofagismo pós-passagem pelo trato digestivo de ruminantes foi avaliado utilizam a predação como mecanismo de ataque inicial aos nematódeos. Nenhuma informação é disponível para fungos que utilizam a estratégia de adesão ou ingestão de conídios como por exemplo *Drechmeria coniospora* e *Harposporium anguillulae*, respectivamente. Estas duas espécies possuem atividade sobre as formas de vida livre de nematódeos trichostrongilídeos em determinadas densidades no ambiente fecal (SANTOS & CHARLES, 1995; CHARLES et al., 1996). Contudo, a capacidade delas em atravessar o trato digestivo e permanecerem ativas após a passagem não foi ainda avaliada. Este trabalho visa caracterizar a resistência

de um isolado brasileiro de *H. anguillulae* em passar pelo trato digestivo de ruminantes, assim como a sua dinâmica de passagem, a persistência de sua atividade nematófaga pós-passagem e a redução de larvas de nematódeos trichostrongilídeos quando administrado em dose única.

4. Material e Métodos

Durante seis dias consecutivos, foram coletadas fezes de quatro ovinos infectados com uma cultura pura de *Haemonchus contortus*. No sexto dia, dois desses animais receberam via oral uma suspensão contendo conídios de *H. anguillulae*, enquanto dois outros receberam apenas água destilada na mesma quantidade. Após a administração dos conídios, fezes foram coletadas em todos os quatro animais num intervalo de 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72 e 96 horas.

As fezes coletadas foram submetidas a exame para determinação do número de ovos (GORDON & WHITLOCK, 1939) e larvas por grama de fezes (ROBERT & O'SULLIVAN, 1950). O número de larvas recuperados dos cultivos do sexto dia e a cada hora pós-administração do material fúngico, foi analisado após a transformação logarítmica utilizando a expressão $x = \log_{10} (x + 1)$. Para o teste de duas médias para amostras independentes foi utilizado os procedimentos para populações homocedásticas ou heterocedásticas, de acordo com o indicado pelo teste de Levene. No caso da comparação de três ou mais médias (Análise de Variância) o teste de Tukey foi utilizado (*post hoc*) para identificação das médias que apresentaram diferenças significativas, também ao nível de

significância de 5% (HENKEL, 1976; GLANTZ, 1992). Para as análises, utilizou-se o aplicativo SPSS, Base for Windows, versão 7.5 (SPSS, 1997).

O isolado de *H. anguillulae* utilizado no bioensaio foi obtido de fezes bovinas depositadas em pastagem de *Brachiaria decumbens* implantada na Estação Experimental de Coronel Pacheco (EECP) da Embrapa Gado de Leite. O fungo foi isolado no dia 10/04/95 e estava armazenado em tubo contendo ágar água (2%) e nematódeos de vida livre desde o dia 20/3/96 sob refrigeração, sendo estimulado novamente no dia 19/11/97. Os conídios foram produzidos através do cultivo em placas de petri contendo ágar água (2%) e nematódeos de vida livre (300 placas utilizadas). Após o cultivo, os conídios foram recolhidos pela lavagem superficial do ágar com água destilada. A suspensão obtida foi contada com auxílio do hemacitômetro e ajustada para 110.000.000 conídios/animal.

A possível presença de *H. anguillulae* nas fezes dos ovinos antes do início da administração de conídios foi avaliada no quinto e sexto dia após o início da coleta de fezes dos animais. A presença de *H. anguillulae* e a atividade nematófaga foi avaliada 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72 e 96 horas após a administração. Para cada animal e horário, amostras de 2g de fezes foram adicionadas no centro de quatro placas de petri contendo agar água (2%) e nematódeos de vida livre (*Panagrellus* sp) como iscas. As placas foram mantidas a 25°C por um período de três semanas e examinadas periodicamente. Em adição, em cada intervalo após a administração da suspensão de conídios ou água destilada aos animais, amostras de 0,3g de fezes foram retiradas de cada coprocultura e cultivadas em ágar água na presença de nematódeos de vida livre para a detecção da presença do fungo.

Os nematódeos de vida livre, do gênero *Panagrellus*, são mantidos no Laboratório de Helmintologia da Embrapa Gado de Leite através de passagens sucessivas

em meio de aveia umedecida com água destilada. Os nematódeos utilizados foram recuperados dos cultivos através de lavagens superficiais e submetidos a lavagem em água destilada.

Os quatro ovinos utilizados tem seis meses de idade e abrigavam infecção monoespecífica com *H. contortus*. A infecção foi produzida através da administração oral de larvas infectantes provenientes de Bagé/RS (Embrapa-Pecuária do Sul). Os animais foram estabulados na Estação Experimental de Coronel Pacheco da Embrapa-Gado de Leite e recebiam alimentação conservada.

5. Resultados e Discussão

Harposporium anguillulae demonstrou ser capaz de passar pelo trato digestivo dos ovinos e manter o nematofagismo. Nos dois animais que receberam a suspensão fungica, em um deles o fungo foi isolado desde a 12^a hora após a administração da suspensão até a 72^a hora. No outro animal o fungo foi isolado da 24^a até a 36^a hora pós-administração.

Apesar do fungo ter sido capaz de passar pelo trato digestivo dos dois animais tratados, provavelmente a densidade de conídios presentes nas fezes não tenha sido suficiente para ocasionar uma redução significativa no desenvolvimento larvar. O número de larvas presentes nos cultivos de fezes dos animais que receberam a suspensão fúngica não demonstra o efeito do fungo. Tanto os animais tratados quanto os não tratados, apresentaram um número de larvas nas fezes relacionada com a dinâmica normal do desenvolvimento larvar (Figuras 3 e 4). No animal tratado número 1 nenhuma diferença foi

observada entre as médias do número de larvas recuperadas nos diferentes intervalos. No animal tratado número 2 diferença significativa foi observada na oitava hora pós-administração. Nos animais não tratados diferenças significativas foram observadas na 24^a 96^a hora de observação no animal 1 e na 8^a hora e na 72^a hora de observação no animal 2. No exame das amostras de fezes retiradas das coproculturas para identificação da presença dos fungos, ele não foi encontrado em nenhuma das placas.

A capacidade de passar pelo trato digestivo de ovinos e manter a atividade nematófaga de *H. anguillulae* torna este fungo promissor para utilização no controle biológico das formas de vida livre de nematódeos trichostrongilídeos. Contudo, este fungo necessita atingir densidades elevadas no ambiente fecal. Estudos anteriores identificaram que esta densidade deve ser no mínimo de 200.000 conídios por grama de fezes (ver trabalho anterior). Assim, o fungo necessita de ser administrado em doses elevadas e continuadas para atingir esta densidade. Neste experimento 300 placas foram necessárias para produzir o inóculo utilizado, o que indica que esforços futuros devem ser direcionados para obtenção de técnicas eficientes de produção massal deste fungo antes que ele possa ser considerado para uso em formulações biológicas isoladamente ou em associação com outros fungos.

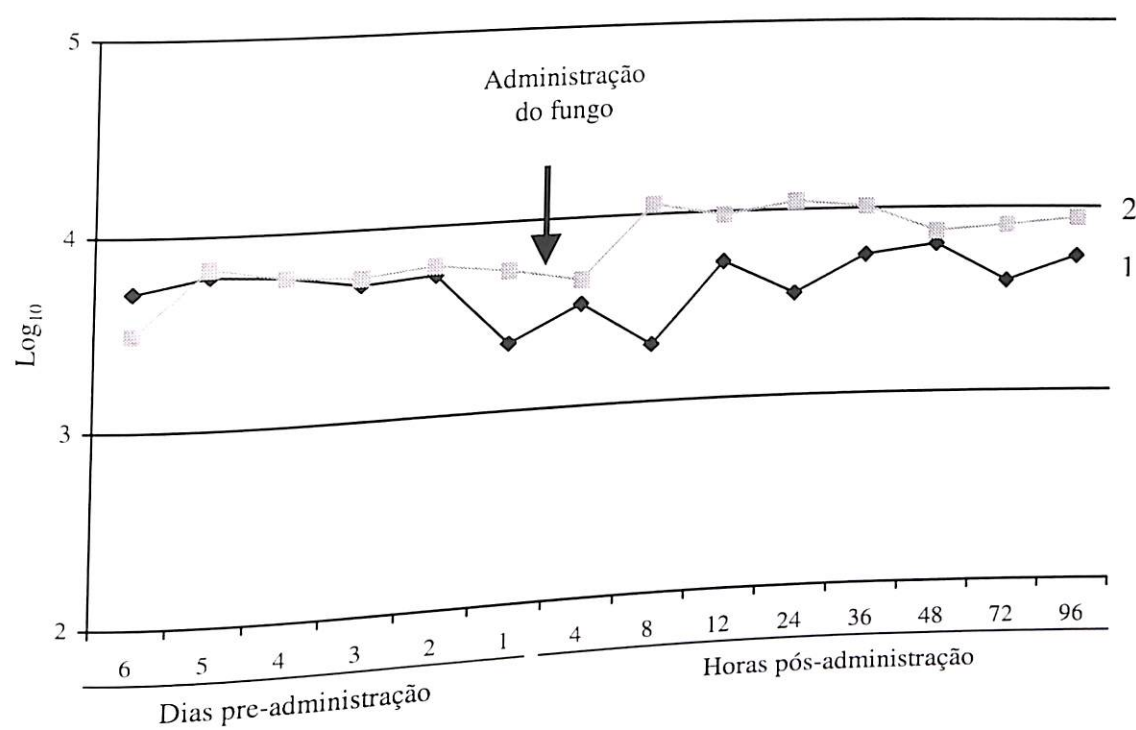


Figura 3. Número médio de larvas infectantes de *Haemonchus contortus* recuperadas de fezes de dois ovinos no período pré e pós-administração via oral de uma dose única de $1,1 \times 10^8$ conídios de *Harposporium anguillulae*

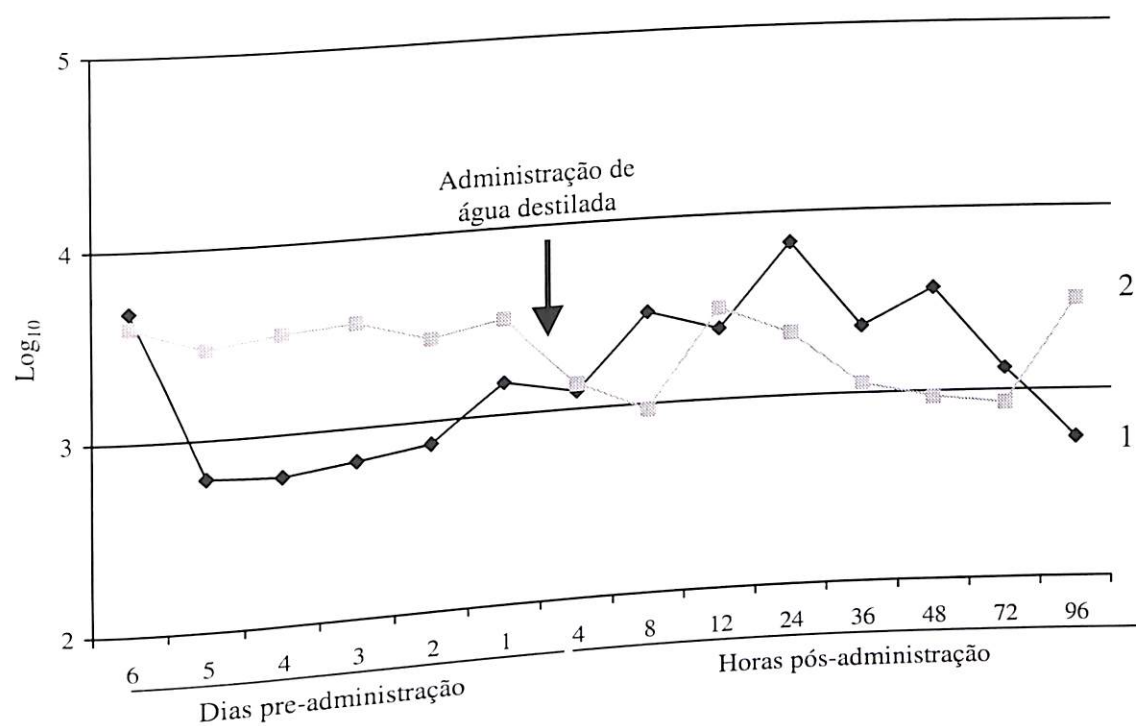


Figura 4. Número médio de larvas infectantes de *Haemonchus contortus* recuperadas de fezes de dois ovinos (animais controle) no período pré e ps-administrao via oral de água destilada.

6. Referências Bibliográficas

- CHARLES, T.P.; ROQUE, M.V.C.; SANTOS, C.P 1996, Reduction of *Haemonchus contortus* infective larvae by *Harposporium anguillulae* in sheep faecal cultures. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.26, n.5, p. 509-510.
- GLANTZ, S. A. 1992, Primeer biostatistics. 3 ed. **Mc Graw Hill Inc.** New York. 440p.
- GITHIGIA, S.M.; THAMSBORG, S.M.; LARSEN, M.; KYVSGAARD, N.C.; NANSEN, P. 1997, The preventive effect of the fungus *Duddingtonia flagrans* on trichostrongyle infections of lambs on pasture. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 27, n. 8, p. 931-939.
- GORDON, H. McL.; WHITLOCK, H.V. 1939, A new technique for counting nematodes eggs in sheep faeces. **Journal of the Council Scientific and Industrial Research of Australia**, Jena, v. 12, p. 50-52.
- HASHMI, H.A.; CONNAN, R.M. 1989, Biological control of ruminant trichostrongylids by *Arthrobotrys oligospora*, a predacious fungus. **Parasitology Today**, Barking, v.5, n.1, p. 28-30.
- HENKEL, R.E. 1976, Tests of significance Sage QASS Series. **Sage Publications**, California. 92p.

LARSEN, M.; NANSEN, P.; WOLSTRUP, J.; GRØNVOLD, J.; HENRIKSEN, S.A.; ZORN, A. 1995, Biological control of trichostrongyles in calves by the fungus *Duddingtonia flagrans* fed to animals under natural grazing conditions. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam

LARSEN, M.; NANSEN, P.; GRØNDAHL, C.; THAMSBORG, S.M.; GRØNVOLD, J., WOLSTRUP, J.; HENRIKSEN, S.A.; MONRAD, J. 1996, The capacity of the fungus *Duddingtonia flagrans* to prevent strongyle infections in foals on pasture. **Parasitology**, Cambridge, v. 113, p. 1-6.

NANSEN, P.; LARSEN, M.; GRØNVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; ZORN, ^a; HENRIKSEN, 1995, S.Aa. Prevention of clinical trichostrongylidosis in calves by strategic feeding with the predacious fungus *Duddingtonia flagrans*. **Parasitology Research**, [S.n.] v. 81, p. 371-374.

PADILHA, T.; MENDOZA-DE GIVES, P. 1996, Controle microbiano das formas de vida livre dos nematódeos trichostrongilídeos: uma alternativa para higienização das pastagens. In: **Controle dos nematódeos gastrintestinais em ruminantes**, ed. Padilha T., Coronel Pacheco, EMBRAPA-CNPGL, p. 215-235.

ROBERTS, F.H.S.; O'SULLIVAN, P.J. 1950, Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. **Australian Journal for Agricultural Research**, East Melbourne, v.3, p. 187-226.

SANTOS, C.P., CHARLES, T.P. 1995, Efeito da aplicação de conídios de *Drechmeria coniospora* em cultivos de fezes contendo ovos de *Haemonchus contortus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.47, n.2, p. 123-128.

SPSS. 1997. Statistical Package for Social Sciences. Base for Windows. v.7.5, Chicago.