

**ATIVIDADE PREDATÓRIA DE *Arthrobotrys oligospora* e *Arthrobotrys flagrans*
NOS ESTÁDIOS LARVARES PRÉ -PARASÍTICOS DE CYATHOSTOMINAE
EM DIFERENTES TEMPERATURAS**

CLÓVIS DE PAULA SANTOS

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

**ATIVIDADE PREDATÓRIA DE *Arthrobotrys oligospora* E *Arthrobotrys flagrans*
NOS ESTÁDIOS LARVARES PRÉ-PARASÍTICOS DE CYATHOSTOMINAE
EM DIFERENTES TEMPERATURAS**

CLÓVIS DE PAULA SANTOS

ORIENTAÇÃO: TEREZINHA PADILHA CHARLES

**TESE SUBMETIDA À UFRRJ
COMO REQUISITO PARCIAL À
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
EM MEDICINA VETERINÁRIA
PARASITOLOGIA VETERINÁRIA.**

**SEROPÉDICA, RJ
FEVEREIRO, 1996**

291.233
9.227a
T

TITULO DA TESE

**ATIVIDADE PREDATÓRIA DE *Arthrobotrys oligospora* e *Arthrobotrys flagrans*
NOS ESTÁDIOS LARVARES PRÉ-PARASÍTICOS DE CYATHOSTOMINAE
EM DIFERENTES TEMPERATURAS**

AUTOR

CLÓVIS DE PAULA SANTOS

APROVADA EM: 15 / 02 / 96

TEREZINHA N. PADILHA CHARLES Padilha

MARIA DE LURDES DE A. RODRIGUES Maria de Lurdes de A. Rodrigues

LAERTE GRISI Laerte Grisi

AGRADECIMENTOS

A Dra. Terezinha Padilha, minha eterna gratidão, pelo tanto que tem feito pela minha formação.

Ao Dr. Rupert P. Herd, agradeço pela doação dos isolados de fungos.

Ao CNPGL - Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite - EMBRAPA e a UFRRJ- Universidade federal Rural do Rio de Janeiro, agradeço pela oportunidade de usufruir de seus recursos físicos e materiais, como laboratórios, bibliotecas, áreas experimentais, animais...

Ao corpo docente da Parasitologia Veterinária desta universidade, agradeço pelos seus conhecimentos oferecidos a mim através das disciplinas cursadas ou pelo convívio extra-classe.

Aos amigos Marcus Vinícius e Éder (dedi), agradeço pelo valioso auxílio que prestaram durante a parte experimental do trabalho.

Aos amigos Dr. Carlos Saumell, Dr. Jonh Furlong , José Placidino e Klinger agradeço a colaboração.

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

BIOGRAFIA

CLÓVIS DE PAULA SANTOS, filho de Camilo Teófilo dos Santos e Maria Helena dos Santos, nasceu em Rio Pomba-MG aos 6 de março de 1966. Graduiu-se em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Juiz de Fora em 1990. Em 1991, ingressou na equipe de pesquisa liderado pela Dra. Terezinha Padilha Charles do Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite da EMBRAPA, na qualidade de bolsista de iniciação científica do CNPq, onde trabalhou em vários projetos de pesquisa tendo como ênfase principal estudos sobre controle biológico de nematódeos gastrintestinais de ruminantes. Em 1993, graduou-se em Bacharel em Ciências Biológicas pela mesma universidade, apresentando como monografia requerida para a conclusão do curso uma revisão sobre fungos nematófagos intitulada “Fungos Nematófitos: Alternativa Para Redução Dos Estádios De Vida Livre Dos Nematódeos Gastrintestinais de Ruminantes”. Em 1994, iniciou o Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária na Área de concentração em Parasitologia Animal, em nível de mestrado, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

SUMÁRIO

	PÁGINA
RESUMO	viii
SUMMARY	xi
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DA LITERATURA	4
MATERIAL E MÉTODOS	14
RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
CONCLUSÕES	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

ÍNDICE DAS FIGURAS

	PÁGINA
FIG. 1 Delineamento experimental	17
FIG. 2 Número médio de larvas infectantes de nematódeos ciatostomíneos recuperadas em cultivos submetidos a temperatura de 10°C e 27°C	19
FIG. 3 Número médio de larvas infectantes de nematódeos ciatostomíneos recuperadas em cultivos submetidos a temperatura de 15°C e 27°C	21
FIG. 4 Número médio de larvas infectantes de nematódeos ciatostomíneos recuperadas em cultivos submetidos a temperatura de 20°C e 27°C	22
FIG. 5 Número médio de larvas infectantes de nematódeos ciatostomíneos recuperadas em cultivos submetidos a temperatura de 25°C e 27°C	23
FIG. 6 Número médio de larvas infectantes de nematódeos ciatostomíneos recuperadas em cultivos submetidos a temperatura de 30°C e 27°C	25

ÍNDICE DAS TABELAS

	PÁGINA
TAB.1 OPG em cultivos de fezes eqüinas tratadas e não tratadas (controles) com conídios de <i>A. oligospora</i> ou clamidosporos de <i>A. flagrans</i> após 14 dias de cultivo em diferentes temperaturas constantes.	20
TAB.2 Concentração de conídios de <i>A. oligospora</i> e clamidosporos de <i>A. flagrans</i> por cada ovo de ciatostomíneos em cultivos de fezes	26

RESUMO

A atividade predatória de fungos nematófagos e o desenvolvimento de estágios pré-parasitários de nematódeos strongilídeos são influenciados pela temperatura. O efeito de diferentes temperaturas constantes na atividade predatória dos fungos *Arthrobotrys oligospora* e *Arthrobotrys flagrans* sobre as fases de vida livre dos nematódeos ciatostomíneos foi avaliado em um experimento onde inicialmente amostras de fezes foram colhidas diretamente do reto de eqüinos com infecção natural. Após homogeneização, 150 amostras de 4 g cada foram pesadas e distribuídas em recipientes plásticos individuais. Dessas, 50 amostras receberam 2000 conídios/g de fezes de *A. oligospora* diluídos em água destilada, 50 amostras receberam uma suspensão de água destilada contendo 2000 clamidosporos/g de fezes de *A. flagrans* e 50 amostras receberam apenas água destilada. Após adição dos conídios, clamidosporos ou água destilada, as fezes foram homogeneizadas individualmente e cultivadas durante 14 dias. Das 50 amostras submetidas a cada tratamento, 20 foram incubadas a 27°C (temperatura controle) e 30 em cada uma das temperaturas teste (10°C, 15°C, 20°C, 25°C e 30°C). Após a incubação, de cada grupo

tratado com água destilada ou fungo na temperatura controle, 10 amostras destinaram-se a extração de larvas infectantes (L_3) e 10 amostras destinaram-se para contagem do número de ovos por grama de fezes (OPG). Das amostras mantidas na temperatura teste, além das 10 amostras para extração de L_3 e das 10 para contagem de OPG, 10 outras amostras de cada grupo tratado com água destilada ou fungo foram incubadas por um período adicional de 14 dias na temperatura controle para verificação do efeito da temperatura teste na interrupção do desenvolvimento dos estádios pré parasíticos e/ou fungos. Após o período adicional de cultivo na temperatura controle, fez-se então a extração das L_3 . As L_3 recuperadas foram fixadas e preservadas em formalina a 10% para quantificação posterior. Este procedimento foi repetido para cada uma das temperaturas avaliadas. A temperatura ótima de desenvolvimento de ovo até L_3 foi de 25°C. A 10°C o número de L_3 recuperado foi praticamente nulo e a 15°C e 20°C o percentual obtido foi inferior a 10%. Quando estes cultivos foram incubados por um período adicional de 14 dias à 27°C permitiram o desenvolvimento até L_3 . Em todos os cultivos inoculados com fungos, quando as larvas estavam presentes, houve uma redução significativa no número de larvas atribuído a ação predatória dos fungos. Ao serem estimulados à 25°C e 30°C os fungos ocasionaram reduções acima de 90% no número de L_3 . Os cultivos mantidos à 10°C, 15°C, 20°C, 25°C e 30°C quando incubados por um período adicional de 14 dias na temperatura controle, mantiveram percentuais de redução larvar superior a 90% para o fungo *A. oligospora*, o mesmo não ocorrendo para *A. flagrans*, que apresentou percentuais de 47% e 42% quando estimulado a 10°C e 20°C, respectivamente. Esses fungos demonstraram ser eficientes na redução do

número de L_3 quando adicionados a fezes de eqüinos nas mesmas temperaturas ideais para o desenvolvimento dos estádios pré-parasitários.

SUMMARY

The predatory activity of nematophagous fungi and the development of free-living stages of cyathostominae nematodes are influence by temperature. The effect of different temperatures on the predatory activity of *Arthrobotrys oligospora* and *Arthrobotrys flagrans* on the free-living stages of cyathostominae nematodes were evaluated on an experiment in which initially feces of horses naturally infected were taken from the horses' rectum and homogenized. After that, 150 samples of 4 g each were weighted and put into individual plastic containers. From those, 50 of them received a suspension of 2000 conidia of *A. oligospora* in distilled water per gram of feces, 50 others received a suspension of 2000 chlamydospores of *A. flagrans* in distilled water per gram of feces and the last 50 received only distilled water. After the addition of the conidia, chlamydospores or distilled water, the feces were mixed individually and cultivate during 14 days. Of the 50 samples submitted to each treatment, 20 of them were incubated at 27⁰C (control temperature) and 30 in each one of test temperature (10°C, 15°C, 20°C, 25°C). After the incubation, from each group treated with distilled water or fungi in the control temperature, 10

samples were submitted to extraction of infective larvae (L_3) and 10 samples to the counting of the number of eggs per gram of feces (EPG). From the samples kept in the test temperature, extraction of (L_3) was performed in 10 samples and counting of EPG were performed in other 10 samples. In each group treated with distilled water or fungi, 10 samples were incubated for an additional period of 14 days in the control temperature to verify the effect of the test temperature in the interruption of the development of the free-living stages and/or the fungi. After the additional period of cultivation in the control temperature extraction of L_3 were then performed in each sample. The L_3 recovered were, fixed and preserved in 10% formaline for later quantification. This procedure was repeated for each test temperature. The optimum temperature for egg development was 25°C. At 10°C the number of L_3 recovered was practically none, and at 15°C and 20°C, the percentage of larvae recovered was less than 10%. When these cultures were incubated for an additional period of 14 days at 27°C, they allowed the development of L_3 . In all the cultures inoculated with fungi, when the larvae were present, it had a significant reduction in the number of larvae attributed to the action of fungi. When estimate at 25°C or 30°C, the fungi occasioned reductions above 90%, in the number of L_3 . The samples cultivated at 10°C, 15°C, 20°C, 25°C and 30°C, when incubated for an additional period of 14 days in the control temperature, they kept the reduction percentage of larvae above 90% for *A. oligospora*. However, the same did not occur for *A. flagrans*, which presented a reduction percentage between 47% and 42% when stimulated at 10°C and 20°C, respectively. These fungi showed to be efficient in reducing the number of L_3 when mixed with equine feces and maintained at the optimum temperature for the development of pre-parasite stages of cyathostominae nematodes.

INTRODUÇÃO

Os ciatostomíneos compreendem o grupo mais abundante de vermes em eqüinos e têm na síndrome clínica chamada ciatostomíase larvar uma das manifestações prejudiciais a saúde do animal. A síndrome esta associada à emergência estacional das larvas da parede intestinal e inclui um súbito inicio de uma diarréia crônica, cólica branda, rápida perda de peso, edema de partes dependentes, demora na queda da pelagem de inverno e morte em infecções pesadas (UHLINGER,1991).

higienização das pastagens através da redução do número de larvas infectantes é um dos objetivos do controle das verminoses. O método convencional de controle dos ciatostomíneos tem suporte nos anti-helmínticos e sua utilização estratégica para assegurar uma baixa contaminação da pastagem pelos ovos tem sido incentivado desde a década de 60 com os trabalhos de DRUDGE & LYONS (1966, citado por HERD, 1990), o qual recomendavam o tratamento em doses bimensais. O uso intensivo, entretanto, selecionou populações resistentes destes parasitos, sobretudo aos benzimidazóis (HERD, 1990, BAUER, 1994).

Atualmente, a resistência tornou-se um grande desafio, pois é pouco provável num futuro próximo o surgimento de novos compostos anti-helmínticos devido o processo lento de desenvolvimento, custos muito elevados e a possibilidade de um rápido aparecimento de resistência a novas drogas (GRIMSHAW et al., 1994).

A ecotoxicidade, proveniente dos resíduos anti-helmínticos é outro problema. Cavalos tratados com ivermectin oral na dosagem de 0,2 mg/kg tiveram significativamente um tempo mais longo de degradação das fezes devido as alterações sofridas pela fauna responsável pela degradação do bolo fecal (HERD, STINNER & PURRINGTON, 1993).

Alternativamente, o emprego de organismos vivos, ou parte deles, vem sendo pesquisado com o propósito de reduzir a disponibilidade de larvas nas pastagens, diminuindo conseqüentemente a carga parasitária em outras espécies animais criadas em pastoreio contínuo (GRØNVOLD et al., 1993). Os fungos são os microrganismos mais estudados com este propósito em ruminantes e são considerados uma importante e provável alternativa a ser empregada futuramente em esquemas de controle integrado com o propósito de reduzir ou eliminar aplicações anti-helmínticas (WALLER, 1993).

A redução dos estágios de vida livre de nematódeos ciatostomíneos em fezes de eqüinos tratadas com fungos nematófagos foi examinada recentemente. *Arthrobotrys oligospora* e *Arthrobotrys flagrans*, fungos predadores formadores de armadilhas, mostraram-se eficientes na redução dos estádios pré-parasitários (BIRD & HERD, 1995, CHARLES et al., 1995).

Em fungo nematófagos, de uma maneira geral, os processos morfogênicos, como por exemplo a formação de armadilhas, são influenciados pelas condições ambientais tais como: temperatura, tensão de oxigênio, luz, nível de nutrientes e concentração de larvas (GRØNVOLD, 1989). Em *A. oligospora* a temperatura demonstrou ser importante na produção de armadilhas quando o fungo foi induzido por 50 larvas infectantes de *Ostertagia ostertagi* por centímetro quadrado. O número máximo de 382 armadilhas por centímetro quadrado foi obtido a 20°C, enquanto que a temperaturas inferiores a 5°C e acima de 35°C esse fungo não cresceu. Igualmente, as formas de vida livre dos nematódeos estrongilídeos são afetadas pelos fatores climáticos notadamente a temperatura e umidade que interferem com o desenvolvimento e eclosão dos ovos assim como a sobrevivência e persistências das larvas no meio ambiente (OGBOURNE, 1972, ENGLISH, 1979).

Neste trabalho, serão apresentadas informações sobre a atividade predatória de duas espécies de fungos nematófagos na redução dos estádios de vida livre de nematódeos ciatostomíneos em diferentes temperaturas constantes.

REVISÃO DE LITERATURA

-Introdução

Os fungos nematófagos vivem na matéria orgânica do solo onde desenvolveram relações parasíticas ou predatórias com os nematódeos (BARRON, 1977). De acordo com sua maneira de agir eles foram agrupados em endoparasitas, predadores, oportunistas (parasitas de ovos, cistos e fêmeas sedentárias) e aqueles que produzem metabólitos tóxicos aos nematódeos (SANTOS, 1991).

Os fungos endoparasitas se desenvolvem internamente nos nematódeos após ação germinativa de esporos que os infectam por adesão à parede corporal ou por ingestão. Após o desenvolvimento do fungo dentro do nematódeo, na maioria das espécies somente hifas reprodutivas (tubo de evacuação e conidióforo) saem através da parede corporal para o exterior. Os esporos geralmente são pequenos e quando são longos, são muito finos e com pouca reserva energética (BARRON, 1977).

Os fungos predadores produzem um extensivo sistema hífico no meio ambiente. A

intervalos, ao longo da hifa, são formadas armadilhas que capturam os nematódeos mecanicamente ou por adesão (BARRON, 1977). As armadilhas são categorizadas como: hifas adesivas não modificadas ou não diferenciadas, ramificações hifais anastomosadas formando redes adesivas tridimensionais, ramificações adesivas que algumas vezes formam redes simples e na maioria das vezes bidimensionais, nódulos adesivos, anéis constritores e anéis não constritores (BARRON, 1977).

O relacionamento entre o tipo de armadilha e o nematódeo é variável. Nas hifas adesivas não modificadas a substância adesiva é produzida sobre a superfície da hifa e o nematódeo pode ser capturado em algum ponto. Nas ramificações adesivas os nematódeos são capturados por adesão a um ramo ereto que está coberto com material adesivo, este normalmente anastomosa para formar uma volta adesiva simples ou rede bidimensional, sendo este tipo de armadilha pouco comum. As redes tridimensionais são o tipo mais comum de armadilha. Os nódulos adesivos podem ser sésseis ou pedunculados e somente ele, o nódulo, está coberto com material adesivo. Anéis não constritores são mecanicamente passivos. O nematódeo entra no anel e tenta forçar seu caminho tornando-se então firmemente preso e incapaz de escapar. Já os anéis constritores são mecanicamente ativos. Eles consistem de três células encurvadas e quando o nematódeo entra dentro do anel, as células recebem um estímulo e dilatam em até três vezes o seu tamanho normal. Esse intumescimento oblitera a abertura do anel e o nematódeo é então firmemente preso.

Os fungos ovicidas são hábeis para atacar os estágios de ovo, especialmente os contidos em cistos e nódulos localizados nas raízes de plantas. A penetração e colonização de um fungo ovicida, *Verticillium chlamidosporium*, foi estudado em ovos de *Ascaris*

lumbricoides, através da microscopia eletrônica (LYSEK & KRAJCI, 1987; LYSEK & STERBA, 1991). O fungo ovicida forma uma rede abundante de ramificações miceliais nas proximidades dos ovos. Contudo, as cascas dos ovos são penetradas somente por algumas hifas sem que qualquer órgão de penetração especializado seja produzido. Durante a penetração, o complexo quitina-proteína da casca do ovo é danificado, provavelmente pela ação de enzimas. Após a penetração a hifa cresce rapidamente entre as estruturas da casca do ovo e a superfície da larva em desenvolvimento. Em seguida, coloniza a larva ocasionando mortalidade.

Pouco se conhece sobre fungos que produzem metabólitos tóxicos. A maioria dos trabalhos tem sido feitos através de filtrados de cultivos fúngicos onde tem-se verificado ser estes metabólitos efetivos na imobilização de nematódeos, na interferência com o desenvolvimento embrionário e na eclosão de larvas (DALLA PRIA, 1992).

A maioria dos fungos nematófagos, aproximadamente 200 espécies, pertencem a classe Deuteromycetes ou fungos imperfeitos. Esta classe está particularmente representada no grupo de fungos predadores, enquanto outras classes, tal como Basydiomycetes, Zygomycetes, Oomycetes e Chytridiomycetes são encontrados entre os fungos endoparasitas (WALLER & LARSEN, 1993).

-Utilização de fungos nematófagos no controle biológico de nematódeos parasitos de animais

As informações disponíveis com fungos nematófagos direcionados ao controle de nematódeos parasitos de animais são quantitativamente maiores nos grupos predadores. Pouco

se tem estudado com fungos endoparasitos e muito menos com fungos que produzem metabólitos tóxicos e com os oportunistas não existe informação disponível.

Trabalhos com *Drechmeria coniospora*, um endoparasito, demonstraram ser este capaz de infectar e reduzir o número de larvas pré-infectantes de nematódeos trichostrongilídeos (JANSSON, JEYPRAKASH & ZUCKERMAN, 1985, SANTOS & CHARLES, 1995a). Verificou-se que a infecção ocorre pela adesão de conídios na região cefálica, próxima a cavidade bucal e que apenas quando a concentração de conídios adicionados à fezes atingiu 10^8 conídios/g de fezes ocorreu uma redução significativa do número de larvas (SANTOS & CHARLES, 1995a). *D. coniospora*, em um levantamento feito com 94 fungos, esteve entre os três com maior capacidade de quimicamente atrair nematódeos. Além disso, foi capaz de crescer em variados meios de cultivo à base de ágar. Entretanto, esse fungo não cresceu em ágar fezes e nos cultivos onde ocorreu a colonização o desenvolvimento foi lento (WALLER & FAEDO, 1993).

A produção de metabólitos tóxicos por diferentes espécies de fungos nematófagos foi verificada sobre larvas de *Haemonchus contortus* (WALLER & FAEDO, 1993). Algumas espécies produziram metabólitos larvicidas independente da presença das larvas de nematódeos enquanto outras, foram somente induzidas a produzir estas substâncias quando na presença das larvas. Duas espécies de *Arthrobotrys*, *Arthrobotrys cladodes* e *Arthrobotrys cylindrospora*, e uma espécie de *Monacrosporium*, *Monacrosporium cianopagum* produziram substâncias com ação ovicida.

As pesquisas com fungos nematófagos predadores visando-os como possíveis agentes de controle de nematódeos parasitos de animais tiveram início entre as décadas de 30 e 40. Naquela época foi estudada a atividade de quatro fungos predadores em larvas de diferentes espécies de nematódeos de animais (revisado por PANDEY, 1973). Posteriormente, trabalhos esporádicos foram desenvolvidos até meados da década de 80, quando então, uma série de trabalhos foram publicados por pesquisadores dinamarqueses (revisados por GRØNVOLD et al., 1993) utilizando uma espécie de fungo predador denominado *A. oligospora* (isolado ATCC 24927), originalmente isolado do solo de um jardim na Suécia. Uma valiosa contribuição tem sido feita até então com os achados dos dinamarqueses o que tem despertado e incentivado a atenção por parte de pesquisadores de outros países.

A. oligospora produz esporos assexuadamente (conídios) que são uniseptados, de parede delgada e seca. O conídio nasce em grupos em intervalos ao longo do comprimento do conidióforo que é ereto, provavelmente para melhorar a dispersão pelo vento (BARRON, 1977). Uma série de experimentos com a cepa ATCC 24927 deste fungo, usando-se cultivo em fezes e meios a base de ágar, demonstraram sua promissora capacidade predatória. Esse fungo, quando estimulado por larvas de diferentes espécies de nematódeos parasitas de animais ou nematódeos de vida livre, *Panagrellus redivivus* e *Rhabditis wohlgemuthi*, foi capaz de formar armadilhas e prender rapidamente os nematódeos (NANSEN et al., 1986 & NANSEN et al., 1988). A formação de armadilhas tem início entre a terceira e quarta hora pós contato com o fungo e em cerca de 12 a 15 horas a quase totalidade das larvas são presas. Os nematódeos de vida livre e os primeiro e segundo estádios de *Cooperia oncophora* foram imobilizados e mortos logo após serem presos. Contudo, a larva infectante (L₃) de *C.*

oncophora continuou lutando vigorosamente nas armadilhas por mais que 20 horas, possivelmente pela inabilidade do fungo em penetrar a cutícula externa do nematódeo, remanescente da muda anterior (NANSEN et al. , 1986). As larvas infectantes de *Dictyocaulus viviparus* foram mais pobres em induzir armadilhas provavelmente devido a sua baixa motilidade (NANSEN et al. , 1988).

A formação de armadilhas em *A. oligospora* é influenciada pela temperatura, tensão de oxigênio, luz, nível de nutrientes e concentração de larvas (GRØNVOLD, 1989). Quando o fungo foi induzido por 50 L₃ de *O. ostertagi* por cm², o número máximo de 382 armadilhas / cm² foi obtido a 20°C. A produção de armadilhas sob condições anaeróbias foi nula e em atmosfera normal (21 % de O₂) e oxigênio puro, o fungo produziu armadilhas em taxas comparáveis. Um número médio de 191 armadilhas/cm² foi obtido em sete dias, sob luz elétrica de 500 lux, ao passo que na escuridão, 478 armadilhas/cm² foram produzidas. Em concentrações crescentes de agar milho o fungo produziu um micélio de densidade crescente, que foi mais alta na concentração de 2g/l e mais baixa na de 0,2g/l. O fungo produziu também, significativamente poucas armadilhas (entre 100 e 200 armadilhas/cm²) na densidade mais alta de micélio do que na densidade baixa, onde o número ficou entre 600 e 700 armadilhas/cm². Entre 0 a 100 L₃ de *O. ostertagi*/cm², um número crescente de armadilhas por cm² foi produzido com um número crescente de L₃.

O crescimento de *A. oligospora* é influenciado pelo pH. Ele cresce bem na faixa de pH entre cinco e oito, tendo um crescimento ótimo no pH 6 (GRØNVOLD et al., 1985).

A concentração de conídios também exerce influencia na atividade do fungo *A. oligospora*. Quando a concentração de conídios atinge um mínimo de 250 conídios por grama de fezes, as larvas de *C. oncophora* são significativamente presas e reduzidas no número. Na concentração de 2500 conídios por grama de fezes, o grau de destruição larvar excede 99% (GRØNVOLD et al., 1985).

Uma série de experimentos com a cepa ATCC 24927 de *A. oligospora* demonstraram sua eficiência em reduzir larvas no bolo fecal e vegetação ao redor quando misturado às fezes. Em 29 dias, a redução relativa na contaminação da vegetação foi de 96% no ano de 1984 quando se testou 10 gramas de micélio por quilo de fezes e 86% no ano de 1985, quando foi testado a quantidade de 56 gramas de micélio adicionada de meio de crescimento seco por quilo de fezes (GRØNVOLD et al., 1987). A infectividade da vegetação onde foram depositados bolos fecais inoculados com a concentração de 2000 conídios por grama de fezes nos meses de maio, junho e julho de 1986 na Dinamarca, foi reduzida em 48%, 89% e 46%, respectivamente, quando comparado ao controle (GRØNVOLD et al., 1988). O número total de L₃ de *O. ostertagi* determinado em bolos fecais inoculados com fungos na concentração de 0.250 gramas de micélio seco por quilo de fezes no período de 3 de junho a 15 de julho de 1989 foi reduzido em 42% quando comparado ao controle. Já o número de L₃ registrado na vegetação ao redor dos bolos fecais inoculados com fungos no período de 3 de junho a 29 de julho foi reduzido para 50% e durante o último mês quando os campos foram recontaminados, o fungo predador foi responsável pela redução de 71% na infectividade total da vegetação. Os bezerros em pastoreio nestas áreas com bolos fecais inoculados com fungos tiveram significativamente baixas as contagens de ovos por grama de fezes, os níveis de pepsinogênio

plasmático, as cargas de vermes adultos e a média de peso corporal, que foi de 16 kg a mais quando comparado com o grupo de bezerros pastejando em parcelas controles livres de fungos (GRØNVOLD et al., 1989).

A resistência à passagem pelo trato digestivo dos animais é uma característica importante devido à praticidade de utilização no biocontrole e tem sido demonstrado ser possível em algumas cepas de fungos (SOPRUNOV, 1958, GRÜNER et al., 1985, HASHMI & CONNAN, 1989, PELLOILE, 1991, WOLSTRUP et al., 1994). A cepa ATCC 24927 de *A. oligospora* não sobrevive a passagem pelo trato digestivo de bezerros, ovinos e suínos (GRØNVOLD et al., 1993). Resultados semelhantes foram obtidos com *Dactyllela* e outras cepas de *A. oligospora* assim como outras espécies predadoras, quando submetidos a passagem pelo trato digestivo de eqüinos, caprinos, ovinos e bovinos (DESCAZEUX & CAPELLE, 1939, PARNELL & GORDON, 1963, PRYADKO & OSIPOV, 1986, LARSEN et al., 1992, WALLER et al., 1994).

Recentemente, tem sido dada ênfase a seleção de outras espécies e isolados de outros fungos nematófagos, assim como na identificação daqueles fungos resistentes à passagem pelo trato digestivo (CHARLES & MENDOZA-GIVES, 1996). No Canadá, a distribuição de fungos nematófagos em esterco bovino em quatro estágios de decomposição, provenientes de três locais diferentes foi examinado. 18 espécies de fungos foram isoladas de 36 amostras. *A. flagrans* foi a espécie mais comum seguida de *Harposporium anguillulae* e *Myzocyttium* sp. O número maior de espécies e a mais alta prevalência de fungos ocorreu no esterco mais decomposto (MAHONEY & STRONGMAN, 1994). Em um levantamento feito durante 12 meses na Austrália, 1742 amostras de fezes frescas de animais domésticos foram examinadas

para a presença de fungos nematófagos (LARSEN, FAEDO & WALLER, 1994). Destas amostras, 32 isolados de *Arthrobotrys* e 16 de *Duddingtonia flagrans* foram encontrados. Em um outro estudo feito na Austrália, 94 espécies de fungos nematófagos foram testadas *in vitro* para verificar sua habilidade de reduzir larvas em culturas fecais e também para produzir substâncias tóxicas e quimioatraentes para nematódeos. Seis espécies do gênero *Arthrobotrys*, duas do gênero *Geniculifera* e duas do gênero *Monacrosporium* demonstraram serem promissoras (WALLER & FAEDO, 1993). Destas, apenas três espécies (*Arthrobotrys oligospora*, *Arthrobotrys oviformis* e *Geniculifera eudermata*), previamente selecionadas através de um tratamento simulando as condições do rúmen e do abomaso, foram utilizadas em estudos *in vivo* em ovinos contendo uma cânula no abomaso e íleo (WALLER et al., 1994). As dosagens de conídios foram administradas oralmente ou via cânula abomasal e amostras foram tomadas do abomaso, íleo terminal e fezes. Estas amostras foram misturadas a vermiculita e incubadas juntamente com L₃ de *Haemonchus contortus* em placas de petri por 14 dias a 25°C. A viabilidade destas três espécies nestes locais foi demonstrada após crescimento nas placas e predação das larvas. Na Dinamarca, nove entre dez isolados de *Duddingtonia flagrans* (CI3, CI4, CIII1b, CIII2b, CIII3, CIII4, e CIII5), *A. oligospora* (CIII2a) e *A. superba* (CI2 e CCIII1a), previamente selecionados através de uma metodologia que simula o trato digestivo dos ruminantes (LARSEN et al., 1991), foram re-isolados das fezes após a passagem através do trato digestivo de bezerros. A capacidade destruidora de oito dos dez isolados foi entre 61% e 93% nos bioensaios com bolos fecais. Já nas culturas de fezes sete dos isolados reduziram entre 76% e 99% das larvas (LARSEN et al., 1992). No Brasil, estudos visando o levantamento de espécies autóctones de fungos predadores colonizadores do bolo fecal bovino e de cíbalas ovinas e caprinas, assim como das espécies que passam naturalmente pelo trato digestivo de

ruminantes estão em andamento. Mais de 55% dos bolos fecais examinados foram positivos para fungos nematófagos. Espécies endoparasitas assim como as que capturam nematódeos através de modificações hifais foram encontradas. Essas observações demonstram que a colonização dos bolos fecais em ambiente envolve várias espécies de fungos nematófagos sugerindo que o microhabitat dos bolos fecais oferece condições favoráveis ao crescimento de microrganismos a serem utilizados no controle biológico (CHARLES, SANTOS & SAUMELL, 1995). Dois isolados de fungo predador do gênero *Arthrobotrys* foram identificados em fezes frescas de bovinos e ovinos (SANTOS & CHARLES, 1995b).

MATERIAL E MÉTODOS

-Delineamento Experimental

Amostras de fezes foram colhidas diretamente do reto de eqüinos com infecção natural onde havia o predomínio de ovos de nematódeos ciatostomíneos. Após homogeneização, 150 amostras de 4g cada foram pesadas e distribuídas em recipientes plásticos. Dessas, 50 amostras receberam 2.000 conídios/g de fezes de *A. oligospora* diluídos em água destilada, 50 amostras receberam uma suspensão de água destilada contendo 2.000 clamidosporos/g de fezes de *A. flagrans* e 50 amostras receberam apenas água destilada. Após a adição dos conídios, clamidosporos ou água destilada, as fezes foram homogeneizadas individualmente e cultivadas durante 14 dias. Das 50 amostras submetidas a cada tratamento, 20 foram incubadas a 27°C (temperatura controle) e 30 em cada uma das temperaturas teste (10°C, 15°C, 20°C, 25°C e 30°C). Após a incubação, de cada grupo tratado com água destilada ou fungo na temperatura controle, 10 amostras destinaram-se à extração de L₃, através da técnica de Baermann (UENO & GUTIERREZ, 1983), e 10 amostras destinavam-se à contagem do número de ovos por grama de fezes (OPG) através

da técnica modificada por GORDON & WHITLOCK (1939). Das amostras mantidas na temperatura teste, além das 10 amostras para extração das L₃ e das 10 para contagem de OPG, 10 outras amostras de cada grupo tratado com água destilada ou fungo foram incubadas por um período adicional de 14 dias na temperatura controle para verificação do efeito da temperatura teste na interrupção do desenvolvimento dos estádios pré-parasitários e/ou fungos. Após o período adicional de cultivo na temperatura controle, fez-se então a extração das L₃. As L₃ recuperadas foram fixadas e conservadas em formalina a 10%, para posterior quantificação e comparação. Este procedimento foi repetido para cada uma das temperaturas avaliadas (Figura 1).

-Obtenção de Fezes

As fezes foram colhidas diretamente do reto de eqüinos com infecção natural na Estação para Pesquisas Parasitológicas W.O. Neitz do Departamento de Parasitologia Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e transportadas sob refrigeração ao Laboratório de Sanidade Animal da EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite. Estes animais eram mestiços com idade média de dez anos e OPG médio acima de 1000.

-Obtenção dos Fungos

Isolados de *A. oligospora* (número 80 da coleção da Universidade de Guelph, Canadá) e *A. flagrans* (número 126 da coleção da Universidade de Guelph, Canadá, sinônimo de *Trichothecium flagrans* e *Duddingtonia flagrans*) foram repicados e mantidos a temperatura ambiente em placas de petri contendo agar-milho. Os conídios de *A.*

oligospora e os clamidosporos de *A. flagrans*, foram retirados das placas através do pincelamento e lavagem com água destilada e transferidos a um Becker de onde foram retiradas amostras para contagem, usando-se a câmara de Newbauer. Diluições apropriadas em água destilada foram efetuadas para se obter a concentração de 2000 conídios ou clamidosporos/g de fezes.

-Análises estatísticas

Diferenças entre tratamentos foram testadas, quando necessárias, utilizando o teste t (STEEL & TORRIE, 1960).

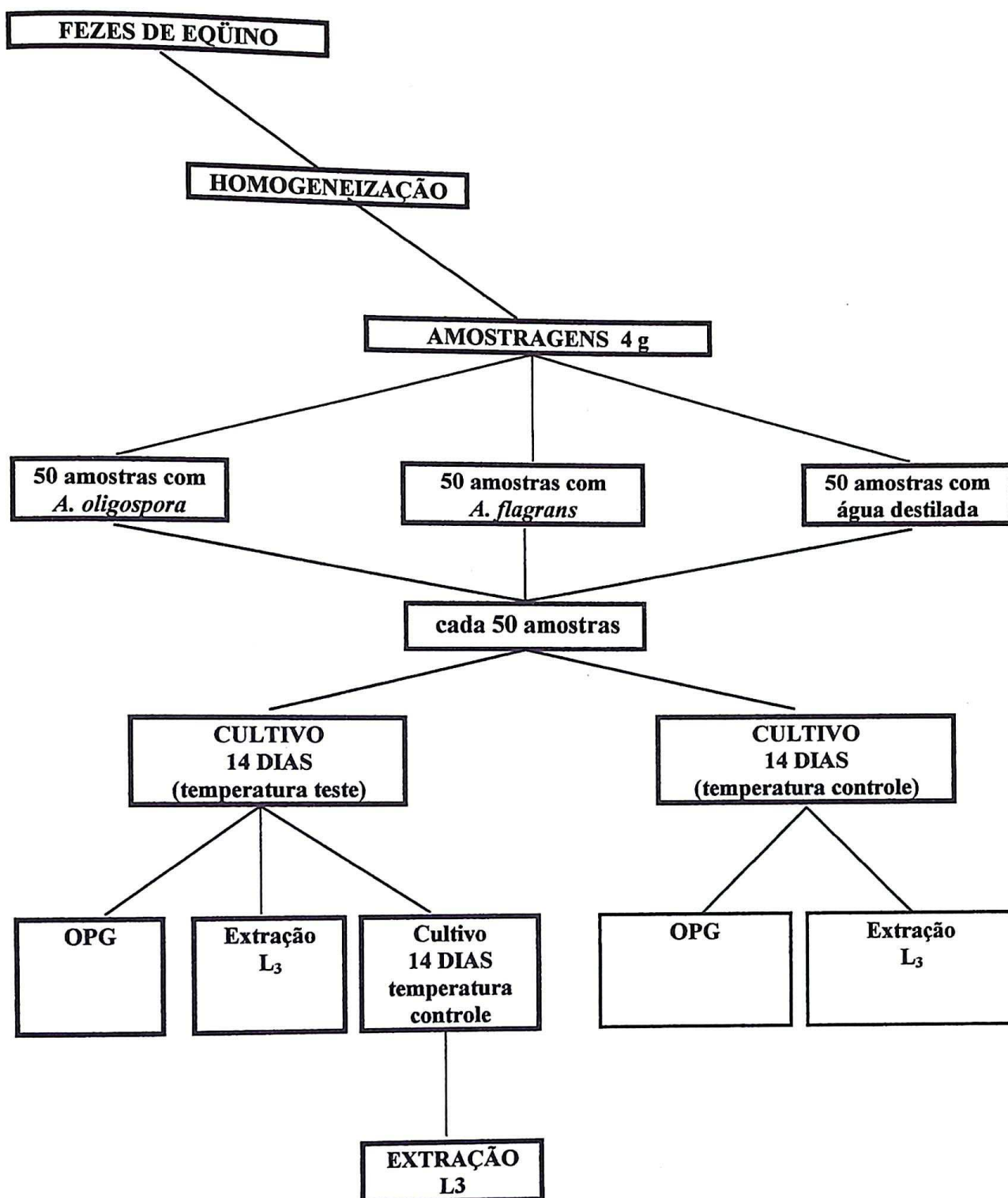


Figura 1 - Delineamento experimental utilizado para demonstração do possível efeito de diferentes temperaturas na atividade predatória de *A. oligospora* e *A. flagrans* em estádios larvares pré-parasitários de ciatostomíneos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A temperatura influenciou o desenvolvimento dos ovos. A 10°C ele foi praticamente interrompido já que o número de L₃ recuperadas foi praticamente nulo (Figura 2) e o OPG médio das fezes cultivadas por 14 dias foi 1112 ovos por grama de fezes, enquanto nos cultivos mantidos a 27°C, esse número foi de 301 (Tabela 1). O mesmo ocorreu nas temperaturas de 15°C e 20°C (Figuras 3 e 4, Tabela 1) onde o percentual obtido foi inferior a 10%. Quando estes cultivos foram incubados por um período adicional de 14 dias à 27°C ocorreu o desenvolvimento até L₃ (Figuras 2, 3, 4 e 5). A temperatura ótima de desenvolvimento de ovo até L₃ foi de 25°C (Figura 5). RUPASINGHE & OGBOURNE (1978) verificaram que as temperaturas de 38°C e 8°C eram as limites para a eclosão dos ovos de ciatostomíneos em ágar fezes. Contudo, as larvas não atingiam o estágio infectante nessas temperaturas limites. Quando os ovos dos nematódeos eram adicionados a fezes de coelhos o estágio infectante foi atingido em números maiores a 20°C e a 25°C e em números progressivamente menores em temperaturas mais altas e mais baixas.

Em todos os cultivos contendo fungos, quando as larvas estavam presentes, houve uma

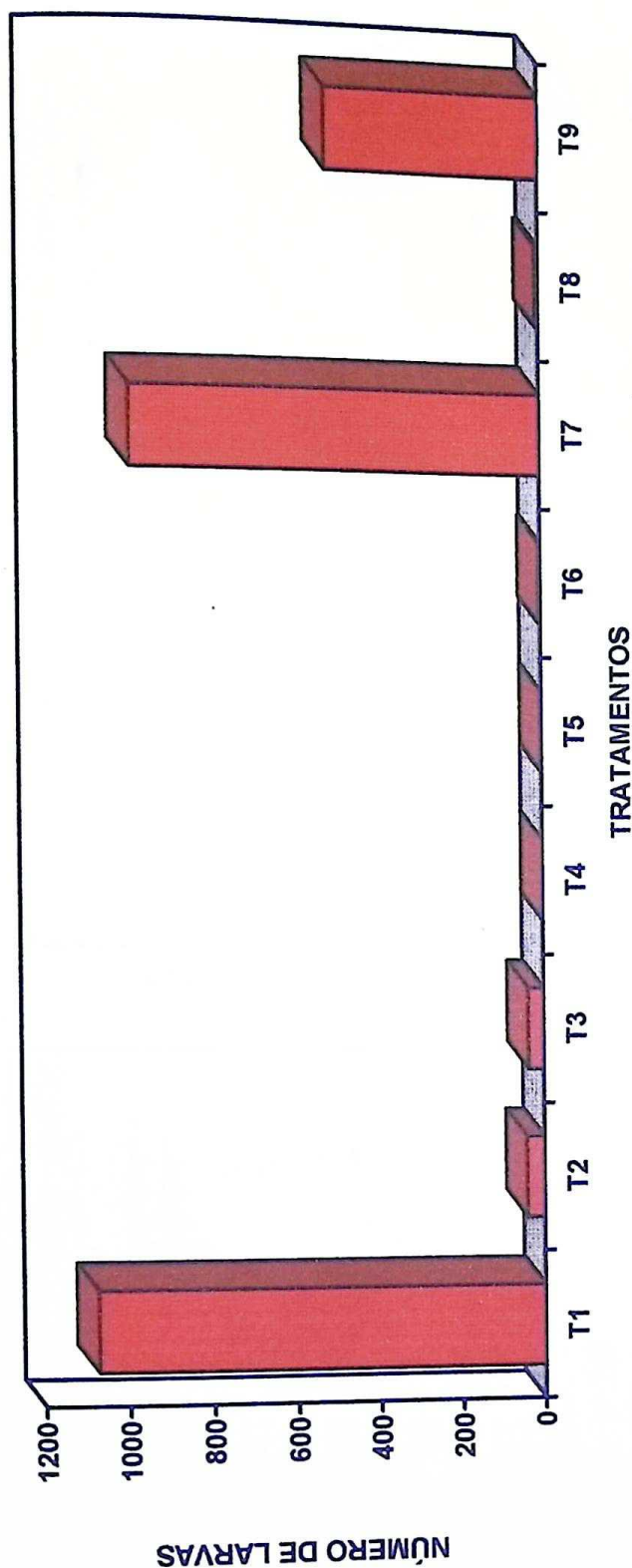


Figura 2- Número médio de larvas infectantes de nematódeos ciatostomíneos recuperadas em cultivos submetidos a temperatura de 10°C e 27°C.

- T₁-Fezes+água destilada/ 14 dias de cultivo/ 27°C (controle)
- T₂-Fezes+2000 conídios de *Arthrobotrys oligospora* por grama de fezes/ 14 dias de cultivo/ 27°C
- T₃-Fezes+2000 clamidósporos de *Arthrobotrys flagrans* por grama de fezes/ 14 dias de cultivo/ 27°C
- T₄-Fezes+água destilada/14 dias de cultivo/10°C (controle)
- T₅-Fezes+2000 conídios de *Arthrobotrys oligospora* por grama de fezes/ 14 dias de cultivo/ 10°C
- T₆-Fezes+2000 clamidósporos de *Arthrobotrys flagrans* por grama de fezes/ 14 dias de cultivo/ 10°C
- T₇-Fezes+água destilada/ 14 dias de cultivo/ 10°C+14 dias de cultivo adicional/ 27°C(controle)
- T₈-Fezes+2000 conídios de *Arthrobotrys oligospora* por grama de fezes/ 14 dias de cultivo/ 10°C+14 dias de cultivo adicional/ 27°C
- T₉-Fezes+2000 clamidósporos de *Arthrobotrys flagrans* por grama de fezes/ 14 dias de cultivo/ 10°C+14 dias de cultivo adicional/ 27°C

Tabela 1 - Número médio de ovos por grama de fezes (OPG) em cultivos de fezes eqüinas tratadas e não tratadas (controles) com conídios de *Arthrobotrys oligospora* ou clamidiosporos de *Arthrobotrys flagrans* após 14 dias de cultivo em diferentes temperaturas constantes.

TEMPERATURA	OPG MÉDIO APÓS 14 DIAS DE CULTIVO	
	CONTROLES	TRATADOS
10°C	301	1112
15°C	287	528
20°C	540	2045
25°C	297	333
30°C	293	185

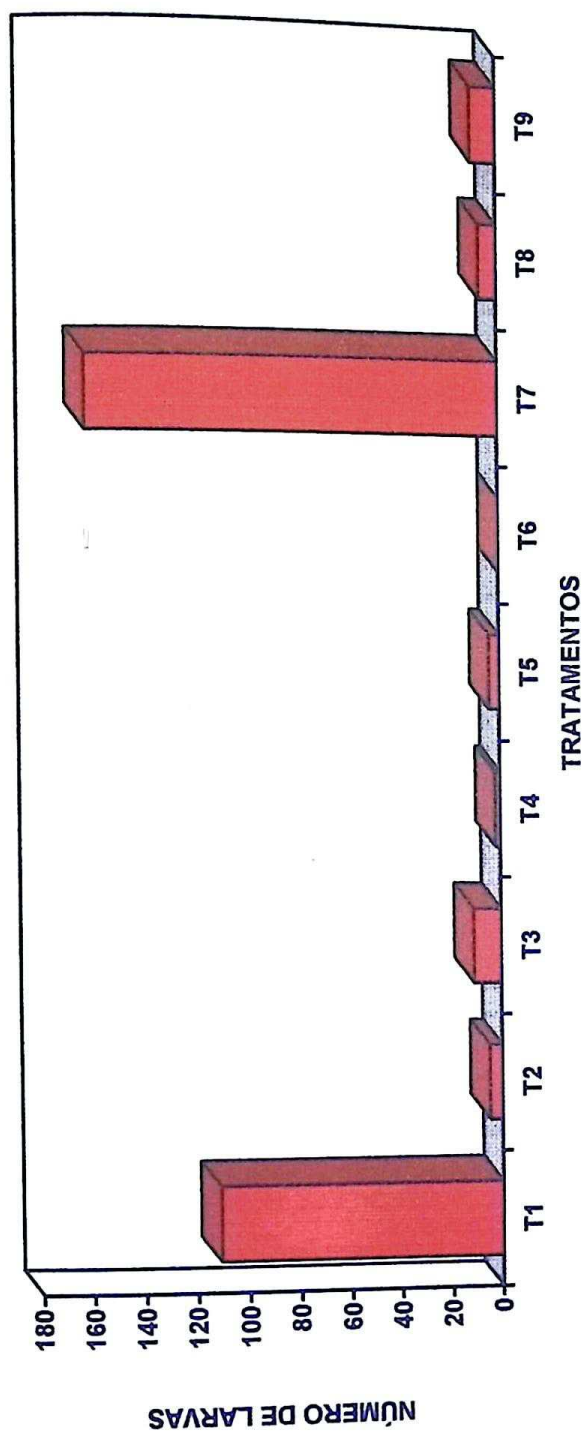


Figura 3- Número médio de larvas infectantes de nematódeos ciatostomíneos recuperadas em cultivos submetidos a temperatura de 15°C e 27°C.

T₁-Fezes+água destilada/ 14 dias de cultivo/ 27°C (controle)

T₂-Fezes+2000 conídios de *Arlhrobotrys oligospora* por grama de fezes/ 14 dias de cultivo/ 27°C

T₃-Fezes+2000 clamidopóros de *Arlhrobotrys flagrans* por grama de fezes/ 14 dias de cultivo/ 27°C

T₄-Fezes+água destilada/14 dias de cultivo/15°C (controle)

T₅-Fezes+2000 conídios de *Arlhrobotrys oligospora* por grama de fezes/ 14 dias de cultivo/ 15°C

T₆-Fezes+2000 clamidopóros de *Arlhrobotrys flagrans* por grama de fezes/ 14 dias de cultivo/ 15°C

T₇-Fezes+água destilada/ 14 dias de cultivo/ 15°C+14 dias de cultivo adicional/ 27°C(controle)

T₈-Fezes+2000 conídios de *Arlhrobotrys oligospora* por grama de fezes/ 14 dias de cultivo/ 15°C+14 dias de cultivo adicional/ 27°C

T₉-Fezes+2000 clamidopóros de *Arlhrobotrys flagrans* por grama de fezes/ 14 dias de cultivo/ 15°C+14 dias de cultivo adicional/ 27°C

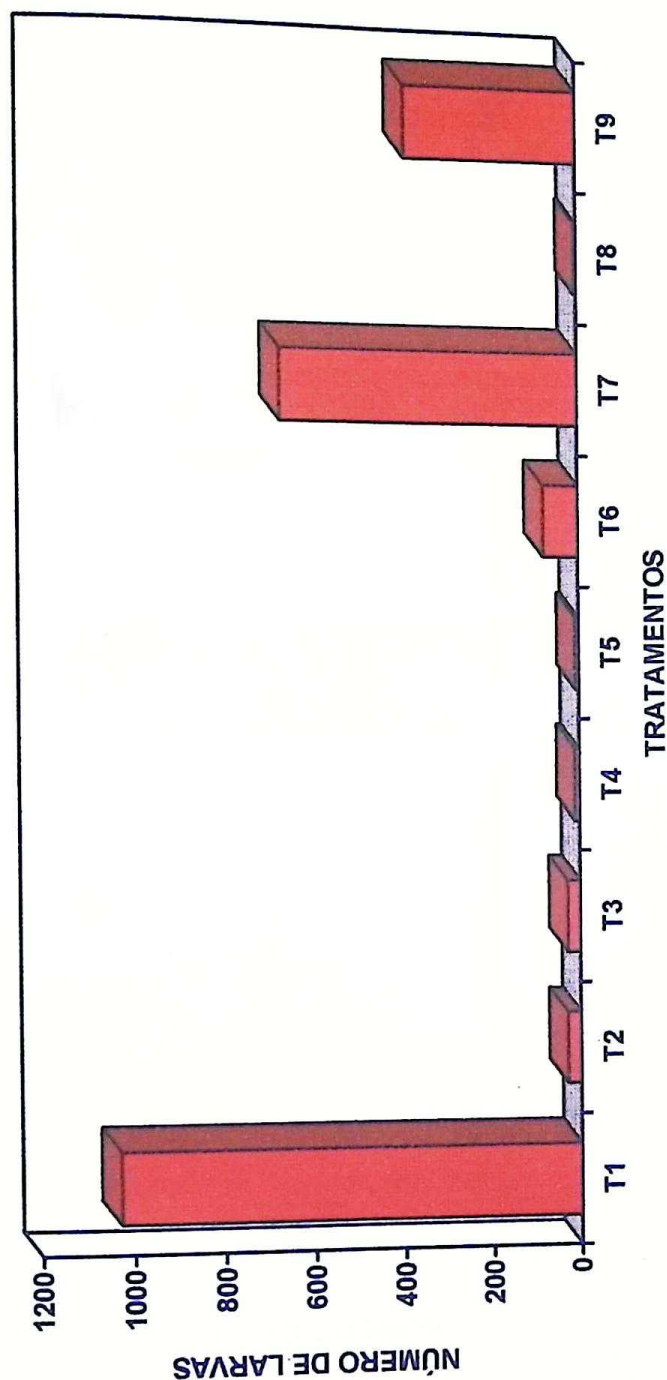


Figura 4- Número médio de larvas infectantes de nematódeos ciatostomíneos recuperadas em cultivos submetidos a temperatura de 20°C e 27°C.

T₁-Fezes+água destilada/ 14 dias de cultivo/ 27°C (controle)

T₂-Fezes+2000 conídios de *Arhrobotrys oligospora* por grama de fezes/ 14 dias de cultivo/ 27°C

T₃-Fezes+2000 clamidósporos de *Arhrobotrys flagrans* por grama de fezes/ 14 dias de cultivo/ 27°C

T₄-Fezes+água destilada/14 dias de cultivo/20°C (controle)

T₅-Fezes+2000 conídios de *Arhrobotrys oligospora* por grama de fezes/ 14 dias de cultivo/ 20°C

T₆-Fezes+2000 clamidósporos de *Arhrobotrys flagrans* por grama de fezes/ 14 dias de cultivo/ 20°C

T₇-Fezes+água destilada/ 14 dias de cultivo/ 20°C+14 dias de cultivo adicional/ 27°C(controle)

T₈-Fezes+2000 conídios de *Arhrobotrys oligospora* por grama de fezes/ 14 dias de cultivo/ 20°C+14 dias de cultivo adicional/ 27°C

T₉-Fezes+2000 clamidósporos de *Arhrobotrys flagrans* por grama de fezes/ 14 dias de cultivo/ 20°C+14 dias de cultivo adicional/ 27°C

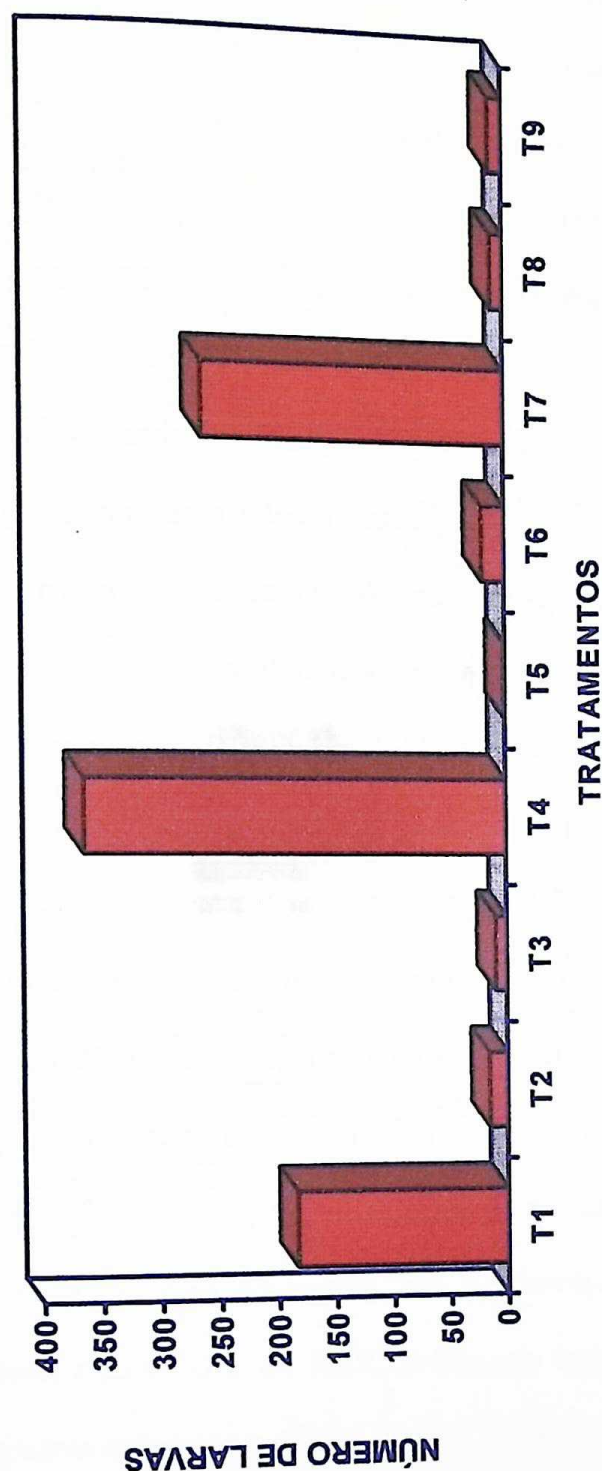


Figura 5- Número médio de larvas infectantes de nematódeos ciatostomíneos recuperadas em cultivos submetidos a temperatura de 25°C e 27°C.

T₁-Fezes+água destilada/ 14 dias de cultivo/ 27°C (controle)

T₂-Fezes+2000 conídios de *Arthrobotrys oligospora* por grama de fezes/ 14 dias de cultivo/ 27°C

T₃-Fezes+2000 clamidósporos de *Arthrobotrys flagrans* por grama de fezes/ 14 dias de cultivo/ 27°C

T₄-Fezes+água destilada/14 dias de cultivo/25°C (controle)

T₅-Fezes+2000 conídios de *Arthrobotrys oligospora* por grama de fezes/ 14 dias de cultivo/ 25°C

T₆-Fezes+2000 clamidósporos de *Arthrobotrys flagrans* por grama de fezes/ 14 dias de cultivo/ 25°C

T₇-Fezes+água destilada/ 14 dias de cultivo/ 25°C+14 dias de cultivo adicional/ 27°C (controle)

T₈-Fezes+2000 conídios de *Arthrobotrys oligospora* por grama de fezes/ 14 dias de cultivo/ 25°C+14 dias de cultivo adicional/ 27°C

T₉-Fezes+2000 clamidósporos de *Arthrobotrys flagrans* por grama de fezes/ 14 dias de cultivo/ 25°C+14 dias de cultivo adicional/ 27°C

redução do número de larvas através da ação predatória dos fungos. Ao serem estimulados à 25°C (Figura 5), a 27°C (Figura 2, 3, 4, 5, 6) ou 30°C (Figura 6) os fungos atingiram percentuais acima de 90% de redução do número de L₃. Os cultivos mantidos à 10°C, 15°C, 20°C, 25°C e 30°C quando incubados por um período adicional de 14 dias à temperatura de 27°C, mantiveram percentuais de redução larvar superior a 90% para o fungo *A. oligospora* (Figura 2, 3, 4, 5 e 6), o mesmo não ocorrendo para *A. flagrans*, que apresentou percentuais de 47% e 42% quando estimulado a 10°C (Figura 2) e 20°C (Figura 4), respectivamente. Neste caso, provavelmente a relação conídio:ovo aliado à temperatura de crescimento do fungo estejam relacionados a estes resultados. Experimentos conduzidos com os mesmos isolados incubados entre 26°C e 28°C demonstraram reduções significativas em concentrações de 1 conídio por cada ovo (BIRD, 1995). Neste trabalho, utilizou-se conídios ou clamidosporos por grama de fezes. Após conversão para conídio por cada ovo, apenas nas temperaturas de 10°C e 20°C encontramos ser esta relação abaixo de 1. Nas demais temperaturas esta relação esteve entre 1,5 a 2 conídios ou clamidosporos por cada ovo (Tabela 2). Contudo, ao comparar-se os controles(27° C) das temperatura de 10° C e 20° C, observa-se que estes têm esta relação, inferior a 1 porém, reduziram mais que 90% das L₃. Dessa forma, a temperatura de crescimento do fungo também foi importante. Em experimentos conduzidos por Larsen (1991) , *A. flagrans* apresentou taxa de desenvolvimento mais lento em temperaturas inferiores a 25°C. O autor verificou que sete isolados diferentes do fungo demonstraram crescimento radial ótimo a 30°C. A 10°C, 15°C e 20°C o crescimento radial destes isolados quando comparado a um isolado de *A. oligospora* e dois de *A. superba* foi sempre menor. Somente a 25°C os isolados de *A. flagrans* atingiram níveis semelhantes de

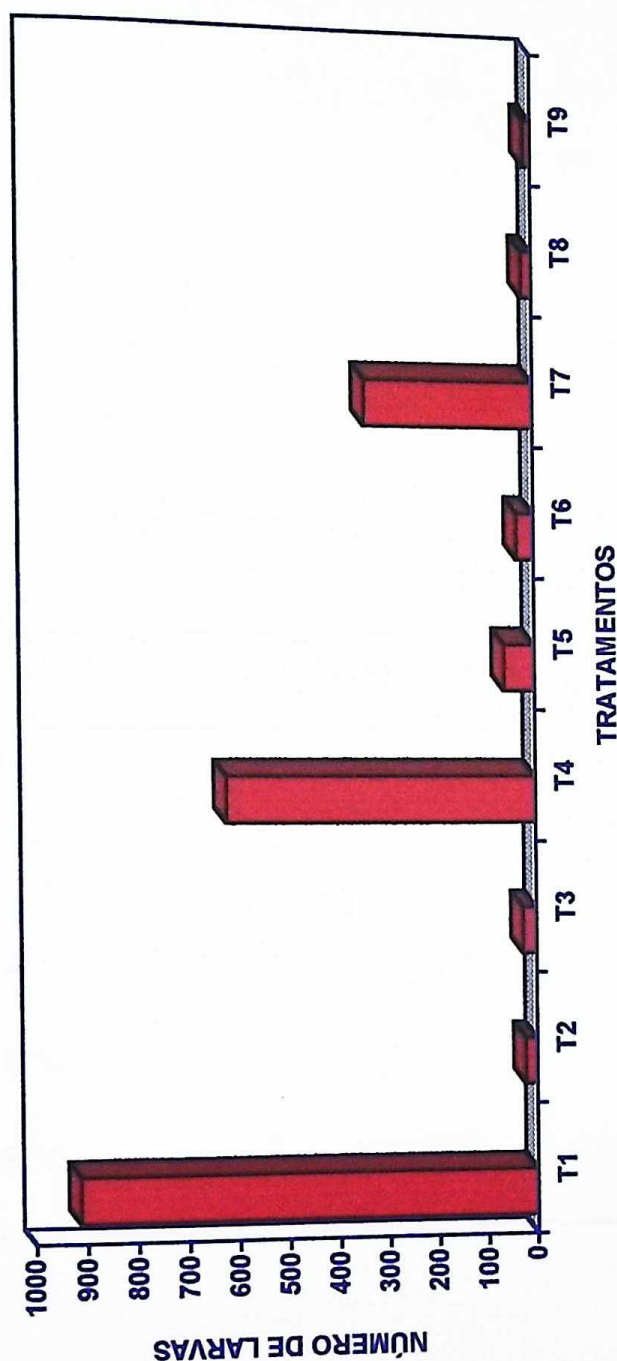


Figura 6- Número médio de larvas infectantes de nematódeos ciatostomíneos recuperadas em cultivos submetidos a temperatura de 30°C e 27°C.

T₁ - Fezes+água destilada/ 14 dias de cultivo/ 27°C (controle)

T₂ - Fezes+2000 conídios de *Arthrobotrys oligospora* por grama de fezes/ 14 dias de cultivo/ 27°C

T₃ - Fezes+2000 clamidósporos de *Arthrobotrys flagrans* por grama de fezes/ 14 dias de cultivo/ 27°C

T₄ - Fezes+água destilada/14 dias de cultivo/30°C (controle)

T₅ - Fezes+2000 conídios de *Arthrobotrys oligospora* por grama de fezes/ 14 dias de cultivo/ 30°C

T₆ - Fezes+2000 clamidósporos de *Arthrobotrys flagrans* por grama de fezes/ 14 dias de cultivo/ 30°C

T₇ - Fezes+água destilada/ 14 dias de cultivo/ 30°C+14 dias de cultivo adicional/ 27°C(controle)

T₈ - Fezes+2000 conídios de *Arthrobotrys oligospora* por grama de fezes/ 14 dias de cultivo/ 30°C+14 dias de cultivo adicional/ 27°C

T₉ - Fezes+2000 clamidósporos de *Arthrobotrys flagrans* por grama de fezes/ 14 dias de cultivo/ 30°C+14 dias de cultivo adicional/ 27°C

Tabela 2 - Concentração de conídios de *Arthrobotrys oligospora* e clamidosporos de *Arthrobotrys flagrans* por cada ovo de ciatostomíneos em cultivos de fezes.

TEMPERATURA	OPG MÉDIO INICIAL	RELAÇÃO CONÍDIO , CLAMIDOSPOROS/OVO
10°C	2165	0.92
15°C	1033	1.94
20°C	3000	0.67
25°C	1200	1.67
30°C	1270	1.57

desenvolvimento as outras espécies. Neste experimento, nas temperaturas de 10°C e 20°C, *A. flagrans* foi então submetido a temperaturas abaixo das ideais de crescimento. Assim, a relação conídio/ovo juntamente com a temperatura de crescimento do fungo provavelmente influenciaram na taxa de eficiência do fungo.

A taxa de crescimento micelial, bem como, a produção de armadilhas e atividade predatória varia entre os isolados de uma mesma espécie. *A. oligospora* (isolado ATCC 24927) e *Arthrobotrys conoides* (isolado CBS 109.52) cresceram a 30°C (GRØNVOLD, 1989). A cepa ATCC 24927 não produziu armadilhas após estímulo de L₃ de *O. ostertagi* na temperatura de 30°C, apesar do fungo ter crescido nesta temperatura. *D. flagrans* (= *A. flagrans*), isolados CI3, CI4, CIII1b, CIII2b, CIII3, CIII4 e CIII5, cresceu otimamente a 30°C enquanto *A. oligospora* (isolados CIII2a) demonstrou crescimento ótimo a 25°C e não cresceu a 30°C (LARSEN, 1991). Isolados de *Arthrobotrys* do México não cresceram em 30°C. Nas temperaturas de 18°C e 25°C, *A. oligospora* (isolado Montecillo) teve 35, 87% e 27,71% de atividade predatória enquanto *A. conoides* (isolado S-25) teve 92,17% e 90,40% de atividade predatória, respectivamente (MENDOZA-DE-GIVES et al., 1994).

Neste estudo, os isolados de *A. oligospora* e *A. flagrans* demonstraram-se ativos na temperatura de 30°C (Figura 6) ao reduzir eficazmente (redução acima de 90%) o número de larvas pré-parasíticas de ciatostomíneos de eqüinos.

Apesar das condições de cultivo não terem sido idênticas aos trabalhos descritos acima, uma variação entre isolados em relação a temperatura parece ocorrer. A variação entre isolados de um mesmo fungo tem sido demonstrado, com relação a resistência de esporos à

passagem pelo trato digestivo de animais domésticos (Waller et al., 1994). É possível, portanto, que estas variações possam ocorrer em relação a outros caracteres de cada isolado fúngico.

CONCLUSÕES

Os fungos nematófagos *A. oligospora* e *A. flagrans* são eficientes na redução do número de larvas infectantes de nematódeos ciatostomíneos quando adicionados às fezes de eqüinos e mantidos nas temperaturas ideais para o desenvolvimento dos estádios pré-parasitários.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARRON, G.L. **The nematode-destroying fungi**. Canadian Biological Publications Ltd. Ontário, Canada. 1977. 140p.
- BIRD, J. **Effect of nematophagous fungi on the development of infective larvae of common endoparasites of horses, sheep and cattle**. The Ohio State University. Phd Thesis. 1995
- BIRD, J., HERD, R.P. In vitro assessment of two species of nematophagous fungi (*Arthrobotrys oligospora* and *Arthrobotrys flagrans*) to control the development of infective cyathostome larvae from naturally infected horses. **Veterinary Parasitology**, v. 56, p. 181-187, 1995.
- BAUER, C. Anthelmintic resistance in nematode of horses. In: COLES, G. C., BORGSTEEDE, F.H.M., GEERTS, S. (eds.). **Anthelmintic resistance in nematodes of farm animals**. Brussels: European Commission, 1994, p. 17-29.
- CHARLES, T.P., MENDOZA-DE GIVES, P. Controle microbiano das formas de vida livre dos nematódeos trichostrongilídeos: uma alternativa para a higienização das pastagens. In: CHARLES, T.P. **Controle da verminose em ruminantes**. Coronel Pacheco: EMBRAPA- CNPGL, 1996 (no prelo).

- CHARLES, T.P., RODRIGUES, M. L. de A., SANTOS, C. de P. Redução do número de larvas de *Cyathostominae* em fezes de eqüinos tratados com conídios de *Arthrobotrys oligospora*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 47, p. 87-89, 1995.
- CHARLES, T.P., SANTOS, C. DE P., SAUMELL, C. Fungos nematófagos colonizadores do bolo fecal bovino: observações preliminares. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Suplemento 4, P. 110, 1995.
- DALLA PRIA, M. Controle biológico de *Meloidogyne incognita*, raça 3, pelos fungos *Verticillium chlamydosporium* e espécies de *Monacrosporium*, isolados ou combinados. Viçosa, UFV, Tese Mestrado, 1992. 101p
- DESCAZEUX, J. & CAPELLE, C. Contribution à l'étude des champions prédateur de larves de nématodes parasites des animaux domestiques. **Bull. Acad. Vétérinaire Fr.**, v. 12, p. 284-288, 1939.
- ENGLISH, A.W. The epidemiology of equine strongylosis in Southern Queensland. 1. The bionomics of the free- living stages in faeces and on pasture. **Australian Veterinary Journal**, v. 55, p. 299-304, 1979.
- GORDON, H. McL., WHITLOCK, H. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal Counc. Sci. Ind. Res. Aust.**, v.12, n.1, p.50-52. 1939.
- GRIMSHAW, W.T.R. Anthelmintic resistance - a pharmaceutical company perspective. In: COLES, G. C., BORGSTEEDE, F.H.M., GEERTS, S. (eds.). **Anthelmintic resistance in nematodes of farm animals**. Brussels: European Commission, 1994, p. 181-183.

- GRØNVOLD, J. Transmission of infective larvae of *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia oncophora* (Trichostrongylidae:Nematoda). The Royal Veterinary and Agricultural University. Copenhagen. PhD Thesis. 93p. 1989.
- GRØNVOLD, J., KORSHOLM, H., WOLSTRUP, J., NANSEN, P., HENRIKSEN, S.A. Laboratory experiments to evaluate the ability of *Arthrobotrys oligospora* to destroy infective larvae of *Cooperia* species, and to investigate the effect of physical factors on the growth of the fungus. **Journal of Helminthology**, v. 59, p. 119-125, 1985.
- GRØNVOLD, J. WOLSTRUP, J., HENRIKSEN, S.A., NANSEN, P. 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**, v. 61, p. 65-71, 1987.
- GRØNVOLD, J., NANSEN, P., HENRIKSEN, S.A., THYLIN, J., WOLSTRUP, J. The capability of the predacious fungus *Arthrobotrys oligospora* (Hyphomycetales) (Trichostrongylidae) in cow pats and herbage during the grazing season in Denmark. **Journal of Helminthology**, v. 62, p. 271-280, 1988.
- GRØNVOLD, J., HENRIKSEN, S.A., NANSEN, P., WOLSTRUP, J., THYLIN, J. 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**, v. 63, p. 115-126, 1989.
- GRØNVOLD, J., WOLSTRUP, J., NANSEN, P., HENRIKSEN, S.A., LARSEN, M., BRESCIANI, J. Biological control of nematode parasites in cattle with nematode-

trapping fungi: a survey of Danish studies. **Veterinary Parasitology**, v.48, p.311-325, 1993.

GRÜNER, L., PELOILLE, M., SAUVÉ, C., CORTET, J. Survie et conservation de la activite predatrice vis-à- vis de nématodes trichostrongylides après ingestion par des avins de troms hyphomycetes prédateurs. **Comptes rendus de l academic des science**, n. 14, v. 300, p. 525-528. 1985.

HASHMI, H.A., CONNAN, R.M. Biological control of ruminant trichostrongylids by *Arthrobotrys oligospora* predaceous fungus. **Parasitology Today**, v. 5, p. 28-30, 1989.

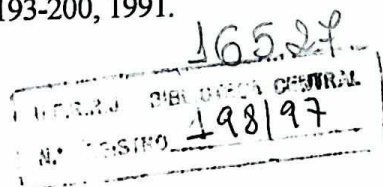
HERD, R. P. Equine parasite control-problems associated with intensive anthelmintic therapy. **Equine Veterinary Education**, v. 2, p. 41- 47, 1990.

HERD, R.P., STINNER, B.R., PURRINGTON, F.F. Dung dispersal and grazing area following treatment of horses with a single dose of ivermectin. **Veterinary Parasitology**, v. 48, p. 229-240, 1993.

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

LARSEN, M. **Studies on the capability of microfungi to destroy animal parasitic nematodes**. The Royal Veterinary and Agricultural University. Copenhagen. PhD Thesis. 1991.

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



- LARSEN, M., WOLSTRUP, J., HENRIKSEN, S.A., GRØNVOLD, J., NANSEN, P. In vivo passage through calves of nematophagous fungi selected for biocontrol of parasitic nematodes. **Journal of Helminthology**, v. 66, p. 137-141, 1992.
- LARSEN, M., FAEDO, M., WALLER, P. J. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: Survey for the presence of fungi in the fresh faeces of grazing livestock in Australia. **Veterinary Parasitology**, v. 53, p. 275-281, 1994.
- LYSEK, H., KRAJSI, D. Penetration of ovicidal fungus *Verticillium chlamydosporium* through the *Ascaris lumbricoides* egg-shells. **Folia Parasitologica**, v. 34, p. 57-60, 1987.
- LYSEK, H., STERBA, J. Colonization of *Ascaris lumbricoides* eggs by the fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard. **Folia Parasitologica**, v. 38, p. 255-259, 1991.
- MAHONEY, J.C., STRONGMAN, D.B. Nematophagous fungi from cattle manure in four states of decomposition at three sites in Nova Scotia, Canada. **Micologia**, v. 86, p. 371-375, 1994.
- MENDOZA-DE GIVES, P., ZAVALA-MEJIA, E., HERRERA-RODRIGUEZ, D., QUIROZ-ROMERO, H. In vitro trapping capability of *Arthrobotrys* spp. on infective larvae of *Haemonchus contortus* and *Nacobbus aberrans*. **Journal of Helminthology**, v. 69, p. 223-229, 1994.
- NANSEN, P.; GRØNVOLD, J., HENRIKSEN, S.A., WOLSTRUP, J. Predacious activity of the nematode-destroying fungus, *Arthrobotrys oligospora* on preparasitic larvae of *Cooperia oncophora* and on soil nematodes. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, v. 53, p. 237-243, 1986.

- NANSEN, P., GRØNVOLD, J., HENRIKSEN, S. A., WOLSTRUP, J. Interactions between the predacious fungus *Arthrobotrys oligospora* and third-stage larvae of a series of animal-parasitic nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 26, p. 239-337, 1988.
- OGBOURNE, C. P. Observation on the free-living stages of strongylid nematodes of the horse. **Parasitology**, v. 64, p. 461-477, 1972.
- PANDEY, V. S. Predatory activity of nematode trapping fungi against the larvae of *Trichostrongylus axei* and *Ostertagia ostertagi*: A possible method of biological control. **Journal of Helminthology**, v. 47, p. 35-38, 1973.
- PARNELL, I. W., GORDON, H. M. L. Predacious fungi: a possible method of biological control of parasitic nematodes. **Journal of Helminthology**, v. 37, p. 339-342, 1963.
- PELLOILE, M. Selection of nematode-trapping fungi for use in biological control. **Bulletin SROP**, v. 14, n. 2, p. 13-17, 1991.
- PRYADKO, E. I., OSIPOV, P. P. Trials of nematophagous fungi in fields conditions. **Biologicheskaya**, v. 1, p. 30-33, 1986.
- RUPASINGHE, D., OGBOURNE, C. P. Laboratory studies on the effect of temperature on the development of free-living stages of some strongylid nematodes of the horse. **Z. Parasitenkunde**, v. 55, p. 249-253, 1978.
- SANTOS, C. de P., CHARLES, T. P. Efeito da aplicação de conídios de *Drechmeria coniospora* em cultivos de fezes contendo ovos de *Haemonchus contortus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 47, p. 123-128, 1995a.

- SANTOS, C. de P., CHARLES, T.P. Seleção de fungos nematófagos resistentes à passagem pelo trato digestivo de ruminantes. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Suplemento 4, p. 111, 1995b.
- SANTOS, M. A. dos. **Deteção, identificação e avaliação do potencial antagonista de fungos nematófagos presentes em solos do Brasil**. Tese Mestrado. Viçosa, UFV, 1991. 97p.
- SOPRUNOV, F.F. **Predacious hyphomycetes and their application in the control of pathogenic nematodes**. Ashkhabad 1958. Israel Program for Scientific Translation, Jerusalem, 1966, 292p.
- STEEL, R.G.D., TORRIE, J. H. **Principles and procedures of statistics with special reference to the biological sciences**. New York: McGraw-Hill, 1960, 481p.
- UENO, H., GUTIERREZ, V.C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. Tóquio: Japan International Cooperation Agency, 1983. 176 p.
- UHLINGER, A.C. Equine small strongyles: epidemiology, pathology, and control. **Compendium on Continuing Education for the Practitioners Veterinarians**, v. 13, p. 863-869, 1991.
- WALLER, P.J., FAEDO, M. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of sheep: Screenings studies. **Veterinary Parasitology**, v. 49, p. 285-297, 1993.
- WALLER, P. Towards sustainable nematode parasite control of livestock. **Veterinary Parasitology**, v. 48, p. 295-309, 1993.

- WALLER, P. J., LARSEN, M. The role of nematophagous fungi in the biological control of nematodes parasites of livestock. **International Journal Parasitology**, v. 23, p. 539-546, 1993.
- WALLER, P. J.; LARSEN, M.; FAEDO, M. & HENNESSY, D. R. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: in vitro and in vivo studies. **Veterinary Parasitology**, 51: 289- 299, 1994.
- WOLSTRUP, J., GRØNVOLD, J., HENRIKSEN, S. A., NANSEN, P., LARSEN, M., BOGH, H.O., ILSOE, B. An attempt to implement the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* in biological control of trichostrongyle infections of first year grazing calves. **Journal of Helminthology**, v. 68, p. 175-180, 1994.