

# AVALIAÇÃO DA AÇÃO *IN VIVO* DE *Metarhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF, 1879) SOROKIN, 1883 APLICADO SOBRE *Brachiaria decumbens* INFESTADA COM LARVAS DE *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) (ACARI: IXODIDAE)

VÂNIA R. E. P. BITTENCOURT<sup>1</sup>, THIAGO C. BAHIANSE<sup>2</sup>, EVERTON K. K. FERNANDES<sup>2</sup>, EDSON J. DE SOUZA<sup>3</sup>

**ABSTRACT.-** BITTENCOURT V.R.E.P., BAHIANSE T.C., FERNANDES E.K.K.; SOUZA E.J. DE. [In vivo action *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 sprayed over *Brachiaria decumbens* infested with *Boophilus microplus* larvae (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae).] Avaliação da ação *in vivo* de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 aplicado sobre *Brachiaria decumbens* infestada com larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 12, n. 1, p. 38-42, 2003. Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465 Km 7, Seropédica, Rio de Janeiro, 23890-000, Brazil.

The cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) occurs worldwide. Up today, tick infestation in domestic animals has been treated with the help of chemical acaricides. The present work was aimed at the evaluation of the effect of the fungi *Metarhizium anisopliae* on non fed larvae of *B. microplus*, when fungi was sprinkled direct on pastures. Conidia suspensions were prepared in rice medium, inside polypropylene bags. The concentration was determined by microscopic counting, using a Neubauer chamber. Twelve 1m<sup>2</sup> pasture-beds were prepared, and distributed in four rows, separated from each other in 2m intervals. The inoculum used was 10<sup>9</sup> and 10<sup>7</sup> conidia/ml in the three bioassays. Each pasture-bed was infested with larvae aged fifteen days, and then treated with the suspensions on the next day. Two treatments groups received *M. anisopliae* suspensions and a third treatment group remained as non treated control, receiving distilled water and spreading adhesive. Sixty milliliters were sprinkled on each pasture-bed. Countings were performed at fifteen days intervals for the first and second bioassays, and at weekly intervals for the third bioassay. Based on this data, efficacy rates were assessed. Kruskal-Wallis tests were done. The total reduction rate for the first bioassay was 17.89 when 10<sup>7</sup> concentration was used, and 17.42 for 10<sup>9</sup> conidia/ml. For the second bioassay: 22.53 when 10<sup>7</sup> concentration was used, and 52.26 for 10<sup>9</sup> conidia/ml. For the third bioassay: 37.84 when 10<sup>7</sup> concentration was used, and 53.78 for 10<sup>9</sup> conidia/ml. The results demonstrate that the fungi *M. anisopliae* presents detrimental effects for *B. microplus* larvae in this conditions.

**KEY-WORDS:** Biological control, ticks, *Metarhizium anisopliae*, *Boophilus microplus*, entomopathogenic fungus.

## RESUMO

O carrapato dos bovinos *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) possui uma ampla distribuição mundial. Até o presente momento, a infestação de carrapatos em animais domésticos é controlada principalmente por acaricidas químicos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a ação do fungo

*Metarhizium anisopliae*, em larvas não alimentadas do carrapato *B. microplus*, quando pulverizado nas pastagens. As suspensões de conídios foram preparadas a partir de fungos produzidos em meio de arroz em sacos de polipropileno. As contagens de conídios foram feitas através de contagem direta ao microscópio, com auxílio de câmara de Neubauer. Foram formados 12 canteiros de um metro quadrado, distribuídos em quatro fileiras com dois metros de distância. O inóculo do fungo foi utilizado nas concentrações de 10<sup>9</sup> e 10<sup>7</sup> conídios/ml para os três bioensaios. Cada canteiro foi infestado com larvas com cerca de 15 dias de idade no dia anterior dos tratamentos para todos os ensaios. Dois tratamentos receberam uma das suspensões de *M. anisopliae* e o terceiro tratamento

<sup>1</sup>Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ, Brasil, 23890-000, Pesquisador CNPq

<sup>2</sup>Mestrando do CPGCV /UFRRJ, Bolsistas Capes / FAPERJ.

<sup>3</sup>Doutorando do CPGCV /UFRRJ, Bolsista CNPq.

recebeu apenas água destilada com espalhante adesivo, aplicando-se 60 ml de cada suspensão em cada canteiro. Foram feitas duas contagens com intervalos de 15 dias para os primeiros bioensaios e três contagens com intervalos de uma semana para o terceiro bioensaio. Com estes dados foi calculado o percentual de eficácia. Foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. O percentual de redução total do primeiro bioensaio foi de 17,89 para o tratamento  $10^7$  e de 17,42 para o tratamento  $10^9$ . O percentual de redução total do segundo bioensaio foi de 22,53 para o tratamento  $10^7$  e de 52,26 para o tratamento  $10^9$ . O percentual de redução total do terceiro bioensaio foi de 37,84 para o tratamento  $10^7$  e de 53,78 para o tratamento  $10^9$ . Estes resultados demonstram que este isolado de *M. anisopliae* apresenta efeito deletério sobre as larvas de *B. microplus* nas condições de pastagem avaliadas.

**PALAVRAS-CHAVE:** controle biológico, carrapatos, *Metarhizium anisopliae*, *Boophilus microplus*, fungos entomopatogênicos.

## INTRODUÇÃO

*Boophilus microplus* (Canestrini, 1887), conhecido como o carrapato do boi, possui uma ampla distribuição mundial. Até o presente momento, a infestação de carrapatos em animais domésticos é controlada principalmente por acaricidas químicos. O primeiro agente utilizado no controle microbiano descrito na literatura foi o fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, testado para o controle de uma praga da beterraba. Este fungo tem sido empregado no controle de um grande número de pragas de plantas cultivadas no Brasil, além disso, tem sido testado no controle de espécies das famílias Muscidae, Reduviidae e Culicidae, insetos de importância na saúde pública (ALVES, 1998).

A infecção artificial de ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* pelo fungo *M. anisopliae* causou elevada mortalidade, ocorrendo o desenvolvimento deste fungo na hemolinfa do carrapato e alterações nas seguintes etapas da fase não parasitária: períodos de pré-postura e postura, índice de produção de ovos, período de incubação, período e percentual de eclosão (BITTENCOURT, 1992; BITTENCOURT et al., 1994a, 1994b, 1995a, 1995b). CASTRO et al. (1999) avaliando o efeito do *M. anisopliae* em pastagens sobre larvas de *B. microplus*, afirmam que o efeito acumulado do entomopatógeno na gramínea deve ser melhor avaliado, após verificarem em bioensaio a ocorrência de uma grande variabilidade na patogenicidade ao longo de dois tratamentos consecutivos. Os autores concluíram que uma única pulverização de *M. anisopliae* é insuficiente para eliminar larvas de *B. microplus* de forma estatisticamente significativa, ainda que biologicamente os números observados denotassem uma pequena vantagem dos canteiros tratados em relação aos controles.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a ação do fungo *M. anisopliae*, em larvas não alimentadas do carrapato *B.*

*microplus*, quando pulverizado na pastagem formada por *Brachiaria decumbens*, ao longo de três aplicações sucessivas, visando verificar seu efeito cumulativo.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os testes foram desenvolvidos na Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas W.O. Neitz (EPPWON) do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, localizada no município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro.

O isolado de *M. anisopliae* utilizado no experimento foi obtido do carrapato *B. microplus* e é mantido no Departamento de Entomologia da ESALQ, sob o registro 959. As suspensões de conídios foram preparadas a partir de fungos produzidos em meio de arroz em sacos de polipropileno. As contagens de conídios foram feitas através de contagem direta ao microscópio, com auxílio de câmara de Neubauer (ALVES, 1998). O inóculo do fungo foi utilizado nas concentrações de  $10^9$  e  $10^7$  conídios/ml para todos os bioensaios.

Para a realização dos bioensaios foram formados 12 canteiros de um metro quadrado, distribuídos em quatro fileiras com dois metros de distância em condições naturais. Em cada canteiro foram plantadas cinco mudas de *B. decumbens* e foram manejados de forma que durante a fase experimental a altura da gramínea não ficasse superior a 60 cm.

Os carrapatos foram mantidos em placas de Petri, no interior de câmara climatizada a 27°C e umidade relativa acima de 70% para realizarem postura. Após duas semanas de iniciada a postura, esta foi separada em lotes de 500 miligramas de ovos (10.000 larvas) acondicionados em seringas plásticas e mantidos nas mesmas condições que as fêmeas ingurgitadas, até a ocorrência da eclosão das larvas. Foram utilizadas apenas as seringas com eclosão de 100% de larvas, as demais foram descartadas.

Para cada bioensaio realizado foram utilizados os 12 canteiros, e para cada um dos três tratamentos foram utilizados quatro canteiros distribuídos em sorteio. O delineamento experimental usado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições. Cada canteiro foi infestado com 10.000 larvas oriundas de 500 mg de ovos, com cerca de 15 dias de idade, no dia anterior dos tratamentos. Dois tratamentos receberam uma das suspensões de *M. anisopliae* ( $10^7$  e  $10^9$ ) e o terceiro tratamento recebeu apenas água destilada com espalhante adesivo, aplicando-se 60 ml de cada suspensão em cada canteiro, com o auxílio de um pulverizador manual.

Os três bioensaios foram realizados nos mesmos canteiros e em seqüência no período de junho a dezembro de 1999. Para cada bioensaio, sete dias após a aplicação das suspensões, entre oito e nove horas da manhã, foi utilizada uma flanela colocada sobre o canteiro durante 15 minutos, para coletar as larvas vivas (SOUZA & SERRA-FREIRE, 1994). Foram feitas duas contagens com um intervalo de 15 dias para o primeiro e segundo bioensaios e três contagens com intervalos de uma semana para o terceiro bioensaio. Estas contagens foram efetuadas com o auxílio de um contador manual e a

retirada das larvas das flanelas por uma pipeta de vidro acoplada a uma bomba de vácuo.

Com estes dados foi calculado o percentual de eficácia utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ eficácia} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

Onde A = média de larvas vivas no grupo controle e B = média de larvas vivas no grupo tratado

Posteriormente, foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação entre as médias de cada coleta dos três bioensaios.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro bioensaio, na 1ª coleta obtivemos os seguintes valores de eficácia para larvas: 12,66% para a suspensão 10<sup>7</sup> e para o tratamento 10<sup>9</sup> uma eficácia de 16,45%. Na 2ª coleta, após o cálculo do percentual de eficácia obtivemos para o tratamento com a suspensão 10<sup>7</sup> uma eficácia de 24,21% e para o tratamento 10<sup>9</sup> uma eficácia de 18,59%. O percentual de eficácia total do primeiro bioensaio foi de 17,89 para o tratamento 10<sup>7</sup> e de 17,42 para o tratamento 10<sup>9</sup>. Estes resultados demonstram que o fungo *M. anisopliae* apresenta efeito deletério sobre as larvas de *B. microplus* quando pulverizado na pastagem. Após análise estatística não foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as coletas dos diferentes tratamentos deste bioensaio (Tabela 1).

No segundo bioensaio, na 1ª coleta, após o cálculo do percentual de eficácia do fungo entomopatogênico, foi obtido para o tratamento com a suspensão 10<sup>7</sup> uma eficácia de

4,92% e para o tratamento 10<sup>9</sup> uma eficácia de 41,72%. Na 2ª coleta, após o cálculo do percentual de eficácia obteve-se para o tratamento com a suspensão 10<sup>7</sup> uma eficácia de 52,68% e para o tratamento 10<sup>9</sup> uma redução de 70,31%. O percentual de eficácia total do segundo bioensaio foi de 22,53% para o tratamento 10<sup>7</sup> e de 52,26% para o tratamento 10<sup>9</sup>. Como pode ser verificado, os resultados do segundo bioensaio também demonstraram que o fungo *M. anisopliae* apresentou efeito deletério sobre as larvas de *B. microplus*. Na análise estatística foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre o grupo controle e o tratamento com o fungo na concentração de 10<sup>9</sup> na primeira coleta e entre o grupo controle e os dois tratamentos na segunda coleta (Tabela 1).

No terceiro bioensaio, na 1ª coleta, após o cálculo do percentual de eficácia obtivemos para o tratamento com a suspensão 10<sup>7</sup> uma eficácia de 15,57% e para o tratamento 10<sup>9</sup> uma eficácia de 29,64%. Na 2ª coleta, após o cálculo do percentual de eficácia sobre larvas obtivemos para o tratamento com a suspensão 10<sup>7</sup> uma eficácia de 47,35% e para o tratamento 10<sup>9</sup> uma eficácia de 63,23%. Na 3ª coleta, após o cálculo do percentual de eficácia obtivemos para o tratamento com a suspensão 10<sup>7</sup> uma eficácia de 66,23% e para o tratamento 10<sup>9</sup> uma eficácia de 85,71%. O percentual de eficácia total do terceiro bioensaio foi de 37,84 para o tratamento 10<sup>7</sup> e de 53,78 para o tratamento 10<sup>9</sup>. Como pode ser verificado, os resultados do terceiro bioensaio confirmaram os resultados do primeiro e segundo bioensaios, e demonstram que este isolado do fungo *M. anisopliae* apresentou efeito deletério sobre as larvas de *B. microplus*. Na análise dos resultados do teste Kruskal-Wallis verificou-se diferenças significativas na segunda coleta entre o controle e os dois tratamentos com *M. anisopliae*, e na terceira coleta entre os três tratamentos (Tabela 1).

Quando avaliamos os resultados de forma geral, segundo a porcentagem de eficácia total, houve redução quando comparou-se os grupos tratados ao grupo controle em todos os bioensaios, principalmente o grupo tratado com suspensão 10<sup>9</sup> conídios/ml, e na análise estatística dos dados verificou-se que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos em algumas coletas e entre bioensaios (Tabela 1). Castro et al. (1999), em um experimento nas mesmas condições, verificaram que não houve diferença estatística entre as concentrações utilizadas e o grupo controle, havendo grande variabilidade na patogenicidade do fungo, embora o segundo ensaio tenha apresentado uma recuperação decrescente de acordo com as concentrações, onde observou-se que o controle apresentou maior número de larvas, seguido dos grupos tratados porém os autores não realizaram bioensaios seguidos como os do presente trabalho, não avaliando o efeito cumulativo dos dois tratamentos nos canteiros com suspensão de *M. anisopliae*. No presente trabalho foi observado haver efeito cumulativo do fungo entomopatogênico na realização dos três bioensaios sucessivos, visto que os resultados verificados nos grupos tratados com *M. anisopliae* mostraram haver diferenças significativas entre as diferentes coletas (Tabela 1).

Tabela 1. Número médio e desvio padrão de larvas não alimentadas de *Boophilus microplus* recuperadas de canteiros tratados com *Metarhizium anisopliae* isolado 959 com as concentrações de 10<sup>7</sup> e 10<sup>9</sup> conídios/ml e do grupo controle por coleta e bioensaio.

Bioensaios	Coleta	Controle	10E7	10E9
1	1	924 ± 114 a	807 ± 110 a	772 ± 79 a
	2	764 ± 79 a	579 ± 93 a	622 ± 83 a
	Média	844	693	697
2	1	894 ± 178 a	850 ± 157 a	521 ± 113 b
	2	522 ± 114 b	247 ± 29 c	155 ± 34 c
	Média	708	548,5	338
3	1	1002 ± 193 a	846 ± 154 a	705 ± 187 a
	2	737 ± 165 a	388 ± 92 c	271 ± 55 c
	3	539 ± 143 b	182 ± 67 d	77 ± 25 e
	Média	759,33	472	351
Média		770,44	571,17	462

Médias seguidas pela mesma letra numa mesma linha ou coluna não diferem entre si  $P < 0,05$

Tabela 2. Dados climáticos médios colhidos na Estação Meteorológica da PESAGRO, Seropédica, RJ no o período de realização do experimento.

Mês	Méd. Máx.	Méd. Mín.	Méd. mês	U.R. sidade	Pluvio- chuva	Σ horas
Jun 99	24,0	12,3	17,7	78,3	19,4	14:45
Jul 99	24,1	12,1	17,4	83,0	13,9	12:00
Ago 99	24,7	9,0	16,1	66,3	0,0	00:00
Set 99	27,3	12,4	19,2	61,7	15,5	11:35
Out 99	25,2	15,0	19,7	67,0	37,9	20:50
Nov 99	26,4	16,0	20,8	69,7	105,3	46:35
Dez 99	28,7	18,2	22,9	72,7	195,4	70:00

Ainda com relação ao efeito de fungos entomopatogênicos sobre carrapatos em gramíneas, Kaaya et al. (1996) trabalharam com *Beauveria bassiana* e *M. anisopliae* na concentração de  $10^9$  conídios/ml e observaram que houve mortalidade de 100%, 76-95% e 36-64% em larvas, ninfas e adultos de *Rhipicephalus appendiculatus*, respectivamente. Estes resultados foram bem superiores ao do presente trabalho que pode ter como causa a diferença entre as espécies de carrapato e de cepas de entomopatogênicos.

Os dados climáticos colhidos no período de realização do experimento podem ser observados na Tabela 2. Estes dados mostram que no período de realização do experimento os dados de temperatura e umidade relativa mantiveram-se na média durante todo o período. Os dados relativos a pluviosidade tiveram um aumento nos meses de novembro e dezembro, porém esta elevação não foi a um nível que pudesse causar efeito deletério sobre as larvas na pastagem.

A eficácia total após os três bioensaios foi de 25,86% para o tratamento  $10^7$  e de 40,03% para o tratamento  $10^9$ . Na Figura 1, observamos o percentual de eficácia por tratamento em cada bioensaio. Nesta podemos visualizar que ocorreu um aumento gradativo neste percentual ao longo dos três

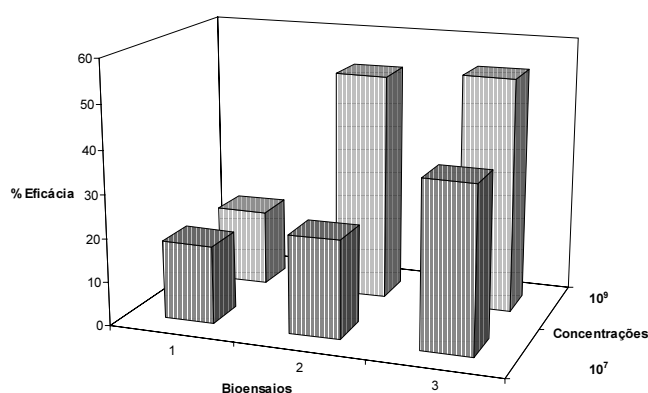


Figura 1. Percentual de eficácia do tratamento realizado em canteiros infestados com larvas de *Boophilus microplus* e tratados com *Metarhizium anisopliae* nas concentrações  $10^7$  e  $10^9$  conídios/ml em três bioensaios.

bioensaios sucessivos utilizando os mesmos canteiros para tratamentos iguais. Castro et al. (1999) questionam o efeito acumulado do entomopatôgeno na gramínea, visto que os canteiros não foram os mesmos para os dois ensaios realizados, o que pode ter causado as diferenças observadas. Os autores concluíram que uma única pulverização de *M. anisopliae* foi insuficiente para eliminar larvas de *B. microplus* de forma estatisticamente significativa, ainda que biologicamente os números observados denotassem uma pequena vantagem dos tratados.

Foi verificado haver eficácia do isolado 959 do fungo *M. anisopliae* nos bioensaios quando comparado com o grupo controle. Apesar desta eficácia apresentar baixa ação controladora sobre o carrapato *B. microplus* quando pulverizado no campo e a prática de pulverização apresentar dificuldades de manejo, o fungo *M. anisopliae* pode em breve ser utilizado em programas estratégicos de controle deste ectoparasita.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, S.B. Controle Microbiano de Insetos. 2º ed. Piracicaba, SP, FEALQ, 1998, 407p.
- BITTENCOURT, V.R.E.P. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). Itaguaí, 1992. 105p. Tese (Doutorado) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1992.
- BITTENCOURT, V.R.E.P., MASSARD C.L. & LIMA A.F. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, em ovos e larvas do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). *Revista Universidade Rural - Série Ciências da Vida*, v. 16, p. 32-38, 1994a.
- BITTENCOURT, V.R.E.P., MASSARD C.L. & LIMA A.F. Ação do *Metarhizium anisopliae* sobre a fase não parasitária do ciclo biológico do *Boophilus microplus*. *Revista da Universidade Rural - Série Ciências da Vida*, v. 16, p. 39-45, 1994b.
- BITTENCOURT, V.R.E.P., MASSARD C.L. & LIMA A.F. Dinâmica da infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). *Revista Universidade Rural - Série Ciências da Vida* v. 17, p. 83-88, 1995a.
- BITTENCOURT, V.R.E.P., MASSARD C.L., LIMA A.F. & VIEGAS E.C. Isolamento e produção do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, a partir de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). *Revista Universidade Rural - Série Ciências da Vida* v. 17, p. 55-60, 1995b.
- CASTRO, A.B.A.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; DAEMON, E. & VIEGAS, E.C. Efeito do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, aplicado sobre *Brachiaria decumbens* infestada com larvas não alimenta-

- das de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) Acari: Ixodidae). *Revista Universidade Rural - Série Ciências da Vida*, v. 21, n. 1-2, p. 95-102, 1999.
- KAAYA, G.P., MWANGI E.N. & OUNA 1996. E.A. Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 67, p. 15-20.
- SOUZA, A.P. & SERRA FREIRE, N.M. Variação sazonal da fase não parasitária de *Amblyomma cajennense* e *Boophilus microplus* no município de Paracambi, Estado do Rio de Janeiro. *Revista Universidade Rural., Série Ciências da Vida*, v. 16, p. 57-65, 1994.

Recebido em 12 de março de 2003.

Aceito para publicação em 14 de agosto de 2003.