

AValiação DA VIABILIDADE DE DUAS ESPÉCIES DE FUNGOS PREDADORES DO GÊNERO *Monacrosporium* SOBRE CIATOSTOMÍNEOS APÓS A PASSAGEM PELO TRATO GASTRINTESTINAL DE EQUINOS EM FORMULAÇÃO DE ALGINATO DE SÓDIO

RAFAELA C. L. ASSIS¹; JACKSON V. ARAÚJO^{2*}

ABSTRACT:- ASSIS, R.C.L.; ARAÚJO J.V. [Predatory viability of isolates fungi of two species of the genus *Monacrosporium* on infective cyathostome larvae after passage through the gastrointestinal tract of equines in sodium alginate formulation.] Avaliação da viabilidade de duas espécies de fungos predadores do gênero *Monacrosporium* sobre ciatostomíneos após a passagem pelo trato gastrointestinal de equinos em formulação de alginato de sódio. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 12, n. 3, p. 109-113. Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570-000, Brazil. E-mail: jvictor@ufv.br

Two isolates of predator fungi of *Monacrosporium*, *M. sinense* SF-470 and *M. appendiculatum* CGI, were evaluated *in vivo* regarding the capacity of supporting passage through the gastrointestinal tract of equines without losing the ability to entrap infective cyathostome larvae. One hundred grams of pellets with the isolates SF-470 and CGI were managed orally, separately to two equines. Two equines received orally 100g of pellets without fungi. Collected fecal samples 12, 18, 24, 48, 72 and 96 hours after the treatments were allocated in Petri dishes and performed faecal cultures with charcoal at 25°C during fifteen days. At the end of the experiment, there was significant reduction ($P<0.05$) of the average number of nematodes larvae recovered of the Petri dishes and the faecal cultures around 70% when compared with the control animals. Such evidences confirm the transit of these fungi pellets by the digestive tract of the equines without loss of the predatory viability.

KEY WORDS: Biological control; *Monacrosporium* sp.; *M. sinense*; *M. appendiculatum*; nematophagous fungi.

RESUMO

Dois isolados de fungos predadores de nematóides, *Monacrosporium sinense* SF 470 e *M. appendiculatum* CGI, foram avaliados *in vivo* quanto a capacidade de suportar a passagem pelo trato gastrointestinal de equinos, sem perda da viabilidade predatória sobre larvas infectantes de ciatostomíneos, em formulação de pellets em matriz de alginato de sódio. Os isolados fúngicos SF 470 e CGI foram administrados por via oral, separadamente, a dois equinos na forma de pellets em dose única de 100 gramas. Outros dois animais, denominados de controle, receberam a mesma quantidade em dose única de pellets sem nenhum isolado fúngico. Amostras fecais, coletadas às 12, 18, 24, 48, 72 e 96 horas após a administração dos pellets foram alocadas em placas de

Petri e acondicionadas em coproculturas com carvão vegetal; estas amostras permaneceram incubadas a 25°C por 15 dias. Ao final do experimento, comprovou-se que os isolados de fungos nematófagos, *M. sinense* (SF470) e *M. appendiculatum* (CGI), permaneceram viáveis após a passagem pelo trato gastrointestinal de equinos. Houve redução do número médio de larvas infectantes de ciatostomíneos recuperadas das placas e das coproculturas em torno de 70%, quando comparado ao grupo controle ($P<0,05$), confirmando a viabilidade da formulação dos pellets e a capacidade predatória preservada dos isolados após a passagem pelo trato gastrointestinal de equinos.

PALAVRAS-CHAVE: Controle biológico, *Monacrosporium* sp., *M. sinense*, *M. appendiculatum*, fungos nematófagos.

INTRODUÇÃO

Os equinos são hospedeiros de uma grande variedade de helmintos. Dentre estes, os mais importantes e frequentes são nematóides, principalmente os ciatostomíneos. Os ciatostomíneos, ou pequenos estrongilídeos, causam anemia,

¹Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000, Viçosa, MG.

²Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000, Viçosa, MG; pesquisador do CNPq. E-mail: jvictor@ufv.br

perda de apetite, diminuição de resistência, além de distúrbios intestinais e, dependendo do grau da infecção, podem levar os animais à morte (HERD, 1990). O controle das verminoses em equinos geralmente é feito utilizando-se anti-helmínticos, os quais não têm sido totalmente eficazes no controle destes nematóides devido à sua ação restrita aos parasitos adultos. Além disso, o aparecimento de resistência aos benzimidazóis, a baixa possibilidade da formulação de um novo composto químico de maior eficiência; e a ecotoxicidade de alguns compostos despertaram o interesse no desenvolvimento de novas práticas de controle das nematodioses gastrintestinais que interfiram na infestação de pastagens e que possam contribuir para um menor uso de anti-helmínticos (BIRD; HERD, 1995).

O controle biológico aparece então, particularmente através da utilização de fungos nematófagos como uma alternativa altamente promissora (ARAÚJO et al., 1998).

Estes fungos são os mais amplamente estudados organismos usados no controle biológico de nematóides parasitos de animais domésticos e quase todos reduzem efetivamente a população de parasitas em laboratório e nas pastagens (WALLER; LARSEN, 1993). Vários fungos nematófagos vem sendo isolados de fezes de equinos. No entanto, pouca atenção vem sendo dada ao controle de larvas de ciatostomíneos, pois a maioria dos trabalhos utilizando fungos predadores no controle biológico foram realizados em ruminantes (LARSEN et al., 1994). Espécies do fungo predador de nematóides *Monacrosporium* spp. têm eficácia comprovada sobre fitonematóides, nematóides de vida livre e nematóides parasitas de bovinos, caprinos e equinos (ARAÚJO et al., 1992; GOMES et al., 1999; CASTRO, 2000; OLIVEIRA et al. 2002; MELO et al., 2003).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade da passagem dos fungos *Monacrosporium sinense* (DRECHSLER, 1937) (isolado SF 470) e *M. appendiculatum* (DRECHSLER, 1937) (isolado CGI) através do trato gastrintestinal de equinos, suas resistências e viabilidades após a passagem, observando-se suas capacidades predatórias sobre larvas infectantes de ciatostomíneos.

MATERIAL E MÉTODOS

Dois isolados de fungos predadores de nematóides oriundos do Brasil, *M. sinense* (SF 470) e *M. appendiculatum* (CGI), foram mantidos em tubos de ensaio contendo 2% de Corn-Meal-Agar (CMA 2%) a 4°C.

Micélio de cada isolado fúngico foi obtido em meio líquido de GPY (glicose, peptona sódica e extrato de levedura) depois de sete dias de incubação a 25°C, no escuro e sob agitação de 120 rpm. Pellets de alginato de sódio foram confeccionados como descrito por Walker e Connick (1983) e modificado por Lackey et al. (1993).

Quatro equinos mestiços, de aproximadamente 1 ano de idade, do sexo masculino, naturalmente infectados e provenientes da região de Viçosa, foram mantidos em baias da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram aleatoriamente

separados, tendo um animal controle e um tratado nos testes de cada isolado fúngico. Após exames de ovos por grama de fezes (OPG) de acordo com Gordon e Whitlock (1939) e confirmação da infecção helmíntica, os equinos receberam capim autoclavado *ad libitum* por 3 dias antes do início dos tratamentos. Os animais controle receberam uma administração única, via oral, de 100 gramas de pellets de alginato de sódio sem fungo. Um animal recebeu tratamento de 100 gramas de pellets do isolado SF 470 de *M. sinense* e o outro 100 gramas de pellets de *M. appendiculatum* (CGI) em administração única.

Amostras fecais foram coletadas diretamente do reto de cada animal às 12, 18, 24, 48, 72 e 96 horas após a administração oral. Dois gramas de fezes foram removidos das amostras de cada animal e acondicionadas em placas de Petri com 9 cm de diâmetro contendo 20 ml de agar-água 2%. Destas mesmas amostras foram separadas 20 gramas de fezes, as quais foram utilizadas para coprocultura em carvão vegetal. De cada horário estabelecido foram realizadas cinco repetições de placas e cinco repetições de coprocultura nos testes de cada animal. Placas e coproculturas foram incubadas em estufa a 25°C e no escuro durante 15 dias. Após este período, realizou-se a coleta das larvas com auxílio do funil de Baermann com água a 42°C por 6 horas. Após, o número de larvas foi quantificado. Diariamente, as placas foram observadas para pesquisa de conídios e conidioforos característicos dos isolados testados e analisados segundo a chave de classificação proposta por Liu e Zhang (1994).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e de regressão linear, a nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com Waller e Larsen (1993), a aplicação de fungo no biocontrole de nematóides auxilia o controle químico e deveria ser administrado não somente quando há um prognóstico de uma grande infestação da pastagem por ovos e larvas de helmintos, mas também, quando há condições melhores para o crescimento do fungo no meio ambiente, prevenindo dessa maneira o parasitismo clínico e perdas na produtividade, além de fornecer um número suficiente de larvas a permitir que esses animais desenvolvam uma imunidade adquirida naturalmente.

A partir do quinto dia após a administração dos pellets com fungos, via oral, foram observadas, nas placas de Petri, conídios típicos que comprovaram a presença dos fungos em todas as placas referentes às coletas realizadas após 24 horas de administração dos pellets. Não foi detectada a presença de fungos nematófagos nas placas pertencentes aos animais controle.

Os equinos utilizados no presente experimento apresentaram OPG médio idêntico de 750. Esta intensidade coincidente de parasitismo desejada na metodologia foi determinada pelo método modificado de Gordon e Whitlock (1939), porém, como todo exame microscópico quantitativo, ele é incapaz de expressar a real infecção do hospedeiro, prestando-se apenas para determinar a intensidade da parasitose.

Tabela 1. Valores médios e desvio padrão do número de larvas infectantes de ciatostomíneos recuperadas das fezes de equinos em placas de Petri com meio de cultura agar-água 2% amostradas nos tempos de 12, 18, 24, 48, 72 e 96 horas após o tratamento com o fungo predador *Monacrosporium sinense* (isolado SF 470) e do animal controle.

Tempo (horas)	Tratamento					
	12	18	24	48	72	96
SF 470	24,6±1,79	21,60±1,65	13,20±2,03	11,80±1,94	12,60±1,48	12,00±1,63
Controle	30,20±2,37	24,00±1,85	16,20±2,71	23,20±1,32	28,00±1,29	37,40±1,99

Tabela 2. Valores médios e desvio padrão do número de larvas infectantes de ciatostomíneos recuperadas das coproculturas em carvão vegetal do equino tratado com o fungo predador *Monacrosporium sinense* (isolado SF 470) e do animal controle.

Tempo (horas)	Tratamento					
	12	18	24	48	72	96
SF 470	48,60±2,13	30,80±2,09	26,00±2,74	25,40±1,91	23,60±2,18	21,40±1,76
Controle	42,40±1,98	40,00±2,25	44,20±2,23	46,80±3,40	50,60±2,79	64,20±2,85

Tabela 3. Valores médios e desvio padrão do número de larvas infectantes de ciatostomíneos recuperadas das fezes de equinos em placas de Petri com meio de cultura agar-água 2% amostradas nos tempos 12, 18, 24, 48, 72 e 96 horas após o tratamento com o fungo predador *Monacrosporium appendiculatum* (isolado CGI) e do animal controle.

Tempo (horas)	Tratamento					
	12	18	24	48	72	96
CGI	88,00±2,11	68,40±2,63	49,20±2,47	35,00±2,08	37,00±1,74	25,20±1,29
Controle	92,00±2,07	94,00±2,38	83,00±3,16	87,80±2,17	74,40±2,537	6,40±1,95

Tabela 4. Valores médios e desvio padrão do número de larvas infectantes de ciatostomíneos recuperadas das coproculturas em carvão vegetal do equino tratado com o fungo predador *Monacrosporium appendiculatum* (isolado CGI) e do animal controle.

Tempo (horas)	Tratamento					
	12	18	24	48	72	96
CGI	119,20±2,35	108,60±2,77	90,40±3,06	71,40±1,82	42,60±1,39	30,80±1,25
Controle	101,60±2,19	102,40±2,73	119,80±2,05	114,80±1,26	105,60±2,71	96,80±2,12

Os valores médios do número de larvas infectantes recuperadas das placas de Petri incubadas com dois gramas de fezes do animal tratado (que recebeu pellets de *M. sinense*) e do animal controle estão representados na Tabela 1. Ao longo do experimento, o número médio de larvas do animal controle apresentou-se maior em relação ao do tratado; com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Esta diferença ao final do experimento foi de 67,92%.

Os valores médios do número de larvas infectantes recuperadas das coproculturas incubadas com 20 gramas de fezes do animal tratado (que recebeu pellets de *M. sinense*) e do controle estão representados na Tabela 2. Ao longo do experimento, o número médio de larvas do animal controle apre-

sentou-se maior em relação ao do tratado; com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) a exceção do tempo de 12 horas de coleta. Esta diferença ao final do experimento foi de 66,67%.

Os valores médios do número de larvas infectantes de ciatostomíneos recuperadas das placas de Petri incubadas com dois gramas de fezes do animal tratado (que recebeu pellets de *M. appendiculatum*) e do animal controle estão representados na Tabela 3. Ao longo do experimento, o número médio de larvas do animal controle apresentou-se maior em relação ao do tratado; com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Esta diferença ao final do experimento foi de 67,02%.

Os valores médios do número de larvas infectantes de ciatostomíneos recuperadas das coproculturas do animal tratado (que recebeu pellets de *M. appendiculatum*) e do controle estão representados na Tabela 4. Ao longo do experimento, o número médio de larvas de ciatostomíneos do animal controle apresentou-se maior em relação ao do tratado; com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) a exceção dos horários de 12 e 18 horas. Esta diferença ao final do experimento foi de 68,19%.

Os fungos *M. sinense* e *M. appendiculatum* apresentaram capacidade em predação larvas infectantes de ciatostomíneos de equinos após a passagem pelo trato gastrointestinal, não perdendo assim a sua viabilidade e foram eficientes, principalmente, nos horários de coleta a partir de 24 horas.

Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre a eficiência predatória sobre larvas infectantes de ciatostomíneos ao se comparar a redução média do número de larvas dos animais tratados com os diferentes isolados fúngicos.

O coeficiente de regressão linear calculado através das análises das médias do animal tratado foi de -0,73 para o isolado *M. sinense* SF 470 e de -0,56 para o isolado *M. appendiculatum* CGI. O valor negativo indica a existência de correlação inversa entre as variáveis, comprovando a viabilidade da capacidade predatória dos isolados após a passagem pelo trato gastrointestinal dos equinos, pela redução do número de larvas infectantes recuperadas das fezes.

Baseado nos resultados do presente estudo, os isolados de *M. sinense* e *M. appendiculatum* apresentam-se como agentes promissores para o controle biológico de ciatostomíneos de equinos. A administração oral de pellets aos animais resultou em controle de praticamente 70% do número de larvas infectantes destes nematóides durante 15 dias de incubação das fezes.

O uso do fungo nematófago no controle biológico de animais parasitados por helmintos pode reduzir a contaminação das pastagens, agindo diretamente nas larvas presentes no meio ambiente. Em outros experimentos, Araújo et al. (1999; 2000) já haviam comprovado a eficiência de outros isolados do gênero *Monacrosporium* em testes de passagem através do trato gastrointestinal de bezerros sem haver perda de viabilidade para predação larvas infectantes de nematóides de bovinos. Rédua (2002) comprovou que um isolado de *M. thaumasium* resistiu a passagem pelo trato gastrointestinal de equinos sem perda da viabilidade para predação larvas infectantes de ciatostomíneos. Rodrigues et al. (1999) avaliaram a capacidade predatória de *M. thaumasium* sobre as larvas infectantes de ciatostomíneos *in vitro* e observaram 99% de redução no número de larvas. Os fungos predadores *Arthrobotrys robusta*, *A. musiformis* e *M. thaumasium* demonstraram capacidade de redução das larvas de terceiro estágio de ciatostomíneos de equinos *in vitro* (CASTRO, 2000).

O presente estudo foi o primeiro a utilizar os fungos *M. sinense* e *M. appendiculatum* no biocontrole de ciatostomíneos de equinos.

CONCLUSÃO

Os isolados de fungos nematófagos, *Monacrosporium sinense* (SF 470) e *M. appendiculatum* (CGI), permanecem viáveis após a passagem pelo trato gastrointestinal de equinos sem perda da capacidade em predação larvas infectantes de ciatostomíneos e apresentam-se como uma boa ferramenta para serem utilizados no controle biológico destes helmintos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, J.V.; SANTOS, M.A.; FERRAZ, S.; MAGALHÃES, A.C.M. 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*, v. 44, n. 6, p. 521-526, 1992.
- ARAÚJO, J.V.; GOMES, A.P.S.; GUIMARÃES, M.P. Biological control of bovine gastrointestinal nematode parasites in southeastern Brazil by the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys robusta*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 7, n. 2, p. 117-122, 1998.
- ARAÚJO, J.V.; STEPHANO, M.A.; SAMPAIO, W.M. Passage of nematode-trapping fungi through the gastrointestinal tract of calves. *Veterinarisk Arhiv*, v. 69, n. 2, p. 69-78, 1999.
- ARAÚJO, J.V.; SAMPAIO, W.M.; VASCONCELLOS, R.S.; CAMPOS, A.K. Effects of different temperatures and mineral salt on "pellets" of *Monacrosporium thaumasium* – a nematode-trapping fungus. *Veterinarisk Arhiv*, v. 70, n. 4, p. 181-190, 2000.
- 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, n. 3, p. 181-187, 1995.
- CASTRO, A.A. *Avaliação de fungos Deuteromycetos sobre as fases pré-parasíticas de Cyathostominae (Nematoda – Strongylidae)*. 2000, 115 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2000.
- DRECHSLER, C. Some Hyphomycetes that prey on free-living terricolous nematodes. *Mycologia*, v. 29, n. 5, p. 447-552, 1937.
- GOMES, A.P.S.; ARAÚJO, J.V.; RIBEIRO, R.C.F. Differential *in vitro* pathogenicity of the genus *Monacrosporium* for phytonematodes, free-living nematodes and parasitic nematodes of cattle. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 32, n. 1, p. 79-83, 1999.
- GORDON, H.M.; WHITLOCK, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *Journal of Council Science Industry Research*, v. 12, n. 1, p. 50-52, 1939.
- HERD, R. P. Equine parasite control – Additions to

- antihelminthic associated problems. *Equine Veterinary Education*, v. 2, n. 1, p. 86-91, 1990.
- LACKEY, B.A.; MULDOON, A.E.; JAFFE, B.A. Alginate pellet formulation of *Hirsutiella rossiliensis* for biological control of plant-parasitic nematodes. *Biological Control*, v. 3, n. 2, p. 155-160, 1993.
- 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 fresh of grazing livestock in Australia. *Veterinary Parasitology*, v. 53, n. 7, p. 275-281, 1994.
- LIU, X.Z.; ZHANG, K.Q. Nematode-trapping species of *Monacrosporium* with special reference to two new species. *Mycological Research*, v. 98, n. 7, p. 862-868, 1994.
- MELO, L.M.; BEVILAQUA, C.M.L.; ARAÚJO, J.V.; MELO, A.C.F.L. Atividade predatória do fungo *Monacrosporium thaumasium* contra o nematóide *Haemonchus contortus*, após passagem pelo trato gastrointestinal de caprinos. *Ciência Rural*, v. 33, n. 1, p. 169-171, 2003.
- OLIVEIRA, C.R.; SICILIANO, S.; ARAÚJO, J.V.; MUJICA, F.; RODRIGUES, M.L.A. Avaliação da passagem do fungo *Monacrosporium thaumasium* pelo trato gastrointestinal de equinos. *Ciência Animal*, v. 12, n. 2, p. 133-137, 2002.
- RÉDUA, C.R.O. *Avaliação do fungo Monacrosporium thaumasium sobre nematóides strongilídeos de equinos*. 2002, 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2002.
- RODRIGUES, M.L.A.; CASTRO, A.A.; ANJOS, D.H.S.; ARAÚJO, M.M.; OLIVEIRA, C.R.C.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; ARAÚJO, J.V. Avaliação da capacidade predatória de *Monacrosporium thaumasium* (NF 34^A) sobre larvas infectantes de Cyathostominae (observações preliminares). In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11, 1999, Salvador. *Anais...* Salvador: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1999. p. 164.
- WALKER, H.L.; CONNICK, Jr. Sodium Alginate for production and formulation of mycoherbicides. *Weed Science*, v. 31, n. 8, p. 333-338, 1983.
- WALLER, P.J.; LARSEN, M. The role of nematophagous fungi in the biological control of nematode parasites of livestock. *International Journal for Parasitology*, v. 23, n. 8, p. 539-546, 1993.

Recebido em 26 de setembro de 2003.

Aceito para publicação em 9 de dezembro de 2003.