

# COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA DE DIFERENTES ISOLADOS DOS FUNGOS NEMATÓFAGOS *Arthrobotrys* SPP. E *Duddingtonia flagrans* NA REDUÇÃO DE LARVAS INFECTANTES DE NEMATÓIDES APÓS A PASSAGEM PELO TRATO DIGESTIVO DE OVINOS

DANIELA G. CRUZ<sup>1</sup>; RUDYMILLA C. CORDEIRO<sup>1</sup>; ANTONIO J. O. LOPES<sup>2</sup>; LIANA V. ROCHA<sup>3</sup>; CLÓVIS P. SANTOS<sup>1</sup>

**ABSTRACT:-** CRUZ, D.G.; CORDEIRO, R.C.; LOPES, A.J.O.; ROCHA, L.V.; SANTOS, C.P. [Comparison of the efficacy of different isolates of the nematode-trapping fungi *Arthrobotrys* spp. and *Duddingtonia flagrans* in reducing infective larvae of nematodes after passage through the digestive tract of sheep]. Comparação da eficácia de diferentes isolados dos fungos nematófagos *Arthrobotrys* spp. e *Duddingtonia flagrans* na redução de larvas infectantes de nematóides após a passagem pelo trato digestivo de ovinos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, supl. 1, p. 133-137, 2008. Laboratório de Biologia Celular Tecidual, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Av. Alberto Lamego, 2000, Parque Califórnia, Campos dos Goytacazes, RJ 28013-600, Brasil. E-mail: cps@uenf.br

For oral application in ruminants, nematophagous fungi must have the capacity to survive the passage through the digestive tract and be efficient in reducing infective larvae of nematodes in the faeces. In this work, these capacities were evaluated and compared in Brazilian and Canadian isolates of *Duddingtonia flagrans*, *Arthrobotrys musiformis* and *A. oligospora*. Fungi were cultured in Roux's Bottles with corn grain as a growth media, and a suspension of 700,000 chlamydospores (*D. flagrans*) or conidia (*A. oligospora* and *A. musiformis*) per Kg of body weight was administered orally for three consecutive days to a group of sheep naturally infected with gastrointestinal nematodes. The control group did not receive fungi. The faeces of these animals were collected for 3 days pre and 3 days post-administration of the suspension and the number of eggs per gram of faeces (EPG) and fecal cultivations carried out. Infective larvae (L<sub>3</sub>) were recovered through baermanization, quantified and compared together with the EPG values. Only administration of *D. flagrans* significantly reduced the percentage of L<sub>3</sub> in the fecal cultivations by more than 95%. These results indicate the potential of *D. flagrans* as a biological control agent for sheep nematodes.

**KEY WORDS:** Nematophagous fungi; *Duddingtonia flagrans*; *Arthrobotrys oligospora*; *Arthrobotrys musiformis*; Gastrointestinal nematodes.

## RESUMO

Para poder aplicar oralmente os fungos nematófagos nos ruminantes estes devem apresentar a capacidade de sobreviver após a passagem pelo trato digestivo e manter-se eficaz em reduzir as larvas infectantes dos nematóides nas fezes. Neste trabalho, essas capacidades foram avaliadas e comparadas nos

isolados brasileiros e canadenses de *Duddingtonia flagrans*, *Arthrobotrys oligospora* e *Arthrobotrys musiformis*. Estes foram cultivados em garrafas de Roux, contendo cereal milho e uma suspensão de 700.000 clamidósporos (*D. flagrans*) ou conídios (*A. oligospora* e *A. musiformis*) por kg de peso vivo, e foi administrada oralmente, durante três dias consecutivos, a um grupo de ovinos infectados naturalmente com nematóides gastrintestinais. No grupo controle não foi administrado fungo. As fezes desses animais foram coletadas três dias antes e após a administração da suspensão e processadas para a determinação do número de ovos por grama de fezes (OPG) e para a realização do cultivo fecal. As larvas infectantes (L<sub>3</sub>) foram recuperadas através da baermanização e, posteriormente quantificadas e comparadas juntamente com os valores dos OPG. Apenas a administração de *D. flagrans* reduziu signifi-

<sup>1</sup> Laboratório de Biologia Celular Tecidual, Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Av. Alberto Lamego, 2000, Parque Califórnia, Campos dos Goytacazes, RJ 28013-600, Brazil. E-mail: cps@uenf.br

<sup>2</sup> Fazenda Barra Seca, município de Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil.

<sup>3</sup> Laboratório de Zootecnia e Nutrição Animal, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, UENF, Av. Alberto Lamego, 2000, Parque Califórnia, Campos dos Goytacazes, RJ 28013-600, Brasil.

cativamente o percentual de L<sub>3</sub> nos cultivos fecais em índice superior a 95%. Esses resultados indicam o potencial de *D. flagrans* como agente de controle biológico de nematóides ovinos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Fungos nematófagos; *Duddingtonia flagrans*; *Arthrobotrys oligospora*; *Arthrobotrys musiformis*; Nematóides gastrintestinais.

## INTRODUÇÃO

Coletivamente, nematóides parasitas de ruminantes domésticos continuam gerando doenças que são os maiores problemas mundiais dos animais de criação, apesar dos eficazes e amplos quimioterápicos disponíveis para o seu controle. O extenso desenvolvimento de resistência anti-helmíntica, particularmente em nematóides parasitas de pequenos ruminantes, e a tendência para direcionar a redução deste controle estão estimulando a pesquisa e o desenvolvimento de métodos alternativos de controle de parasitas (WALLER; THAMSBORG, 2004). Uma das novas potentes ferramentas para o controle estratégico integrado é o controle biológico por meio do fungo nematófago predador *Duddingtonia flagrans* (LARSEN, 2006).

*Duddingtonia flagrans* e *Arthrobotrys oligospora* são as espécies mais estudadas dentre os fungos nematófagos para o biocontrole. Estudos que caracterizam a biologia desses fungos estão determinando a habilidade desses organismos em reduzir os níveis larvais através da atividade predatória em cultivos fecais, bolo fecal e pastagens (GRØNVOLD et al., 1993; LARSEN, 1999; LARSEN, 2000; DIAS et al., 2007).

Dentre as características desejáveis para o controle biológico de nematóides gastrintestinais pelos fungos nematófagos, aresistência ao trato digestivo do hospedeiro animal é muito importante. Desse modo, administrando o fungo oralmente e quando este sobrevive à passagem pelo trato digestivo e se desenvolve nas fezes juntamente com as larvas dos nematóides, aumentam as chances de encontrar e preda os nematóides presentes no bolo fecal (LARSEN, 1999). Essa característica biológica, tanto quanto outras, pode variar consideravelmente entre os isolados da mesma espécie.

Em um estudo sobre fungos nematófagos que ocorrem em fezes decompostas de ruminantes e equinos, no Brasil, foram obtidos dois isolados de *D. flagrans*, um a partir de fezes bovinas e o outro de fezes caprinas, ambos provenientes de municípios localizados no Estado do Ceará, Nordeste do Brasil (SANTOS et al., 1998). O trabalho teve como objetivo verificar a sobrevivência e a eficácia nematófaga dos isolados de *D. flagrans* e *Arthrobotrys* spp. (incluindo isolados canadenses) em reduzir o número de larvas infectantes dos parasitas nas fezes após a passagem pelo trato digestivo de ovinos, com a finalidade de selecionar o isolado brasileiro que é mais promissor para, no futuro, ser empregado no controle dos nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes nas regiões do Norte e Noroeste do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado na fazenda Barra Seca, Campos dos Goytacazes, Região Norte do Estado do Rio de Janeiro e no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da Universidade Estadual do Norte Fluminense. Para o experimento, foram utilizados dez ovinos machos da raça Santa Inês que eram mantidos em um sistema de produção sob regime confinado e isolados dos fungos *D. flagrans* (CG 721 e CG 768), *A. musiformis* (CG 720) e *A. oligospora* (CG 718).

Esses isolados foram inoculados em garrafas de Roux, contendo o meio de cultura cereal milho, e mantido a 25°C na ausência de luz por 21 dias. O número de clamidósporos de *D. flagrans* e conídios de *A. oligospora* e *A. musiformis* obtidos por grama do meio de cultivo foi quantificado por meio da Câmara de Neubauer. E uma suspensão na dose de 700.000 clamidósporos ou conídios por quilograma de peso vivo foi administrada oralmente aos ovinos por três dias consecutivos; os ovinos controles receberam meio de cultivo sem fungo. Foram utilizados dois animais para cada isolado fúngico e controle. As fezes desses animais foram colhidas com 24, 48 e 72 horas pré e pós-administração dos fungos para realizar o número de ovos por grama de fezes (OPG) e as coproculturas. Quatro gramas de fezes de cada animal em duplicata foram usadas para o OPG. Foram feitos dez cultivos fecais de cada animal por intermédio da adição de quatro gramas de fezes em copos plásticos descartáveis de 60 mL de capacidade. Estes copos foram colocados em uma caixa plástica, contendo uma fina camada de água destilada, e coberta com um filme plástico para evitar a perda de umidade durante os 10 dias de incubação a 25 – 27°C. Após a incubação, os cultivos fecais foram baermanizados para recuperar as larvas infectantes, que foram fixadas e preservadas em formalina 10% e, posteriormente, foram quantificadas ao microscópio óptico. A sobrevivência e a eficácia nematófaga desses quatro isolados foram avaliadas comparando-se o percentual médio de larvas infectantes, obtidas a partir dos cultivos fecais de cada animal, no momento da pré e pós-administração do meio de cultivo com fungo (animal tratado) ou sem fungo (animal controle). O percentual médio de larvas infectantes foi obtido pela normalização do número de larvas encontradas a partir dos ovos. O percentual de larvas infectantes recuperadas a partir das coproculturas de cada animal foi analisado. A significância foi avaliada através do teste-*t*, e a significativa diferença ( $P < 0.05$ ) dos valores dos resultados da comparação da pré e pós-administração foi marcada com asterisco.

## RESULTADOS

As médias aritméticas diárias do número de OPG, em cultivos fecais de ovinos no período da pré e pós-administração, variaram entre os grupos com um mínimo de 100 ovos para o grupo que recebeu *A. musiformis* e um máximo de 3.150 ovos para o grupo que recebeu o isolado CG 768 de *D. flagrans* (Tabela 1).

O percentual médio de larvas infectantes obtidas nas

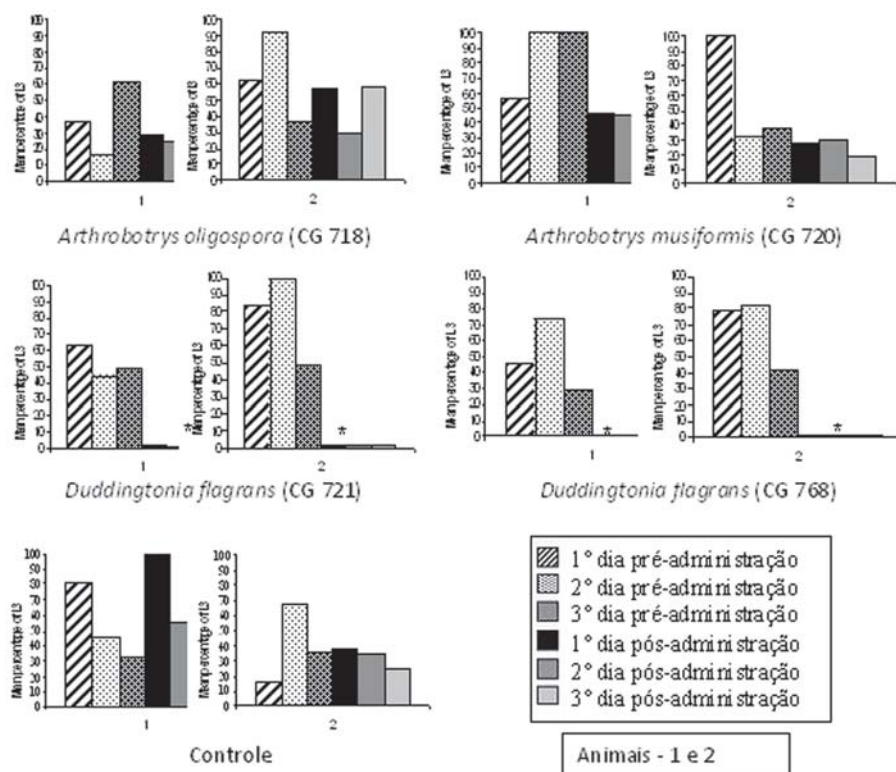


Figura 1. Percentual médio de larvas infectantes por grama de fezes após administração dos isolados de fungos nematófagos. \* Diferença significativa ( $P < 0.05$ ) dos valores da pré-administração calculados por meio do Teste-t.

Tabela 1. Número médio de ovos por grama de fezes em cultivos fecais de ovinos pré e pós-administração dos isolados de fungos nematófagos.

Dias / Animais	<i>A. oligospora</i> (CG 718)		<i>A. musiformis</i> (CG 720)		<i>D. flagrans</i> (CG 721)		<i>D. flagrans</i> (CG 768)		Controle	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
1º pré-admin	1500	1350	450	450	1600	700	1600	950	400	1100
2º pré-admin	2150	1300	450	1150	1200	450	1600	900	650	450
3º pré-admin	2050	1250	100	1300	1500	1100	1350	1500	800	950
1º pós-admin	2300	1250	400	1700	2200	1300	2100	1550	500	750
2º pós-admin	1450	650	850	1650	2100	1400	2850	1850	800	1100
3º pós-admin	2050	350	200	1050	2000	850	3150	1300	800	1100

coproculturas, durante os seis dias experimentais, indica que apenas os isolados CG 721 e CG 768 (ambos de *D. flagrans*) reduziram significativamente o número de larvas infectantes após a passagem pelo trato gastrointestinal dos ovinos (Figura 1).

Nenhuma diferença significativa foi encontrada no percentual de larva infectante após o uso de *A. oligospora* e *A. musiformis*, enquanto CG 721 e CG 768 de *D. flagrans* apresentaram uma redução significativa de 98%, 99%, 97% e 98%, 99%, 99%, respectivamente.

## DISCUSSÃO

De acordo com as condições avaliadas neste estudo, o fungo nematófago *D. flagrans* (isolado CG 721 e CG 768) foi

eficiente no controle da população de nematóides nos cultivos fecais. As doses contendo 700.000 clamidósporos de *D. flagrans* administradas aos animais, durante três dias consecutivos, reduziram significativamente as populações larvais nos cultivos fecais com índices superiores a 95%. Entretanto, as mesmas doses de conídios de *A. oligospora* e *A. musiformis* não apresentaram redução significativa do número de larvas infectantes. Este estudo mostra que os clamidósporos são mais resistentes aos processos digestivos dos ruminantes quando comparados com os conídios. Segundo Faedo et al. (1997), este fato deve-se à maior espessura da parede celular do clamidósporo comparada com a dos conídios.

A capacidade dos fungos predadores em combater os nematóides pode ser avaliada pela recuperação das  $L_3$  nos cultivos fecais. O percentual de redução indica a eficácia do fungo em controlar as larvas presentes no material fecal (FONTENOT et al., 2003). Os percentuais de redução de *A. musiformis* e de *A. oligospora* não foram significativos, quando comparados com os resultados dos isolados CG 721 e CG 768 de *D. flagrans*. No entanto, os isolados de *A. musiformis* reduziram eficientemente o número de  $L_3$ , quando administrado oralmente em grandes concentrações (200 gramas de cereais/animal). A presença desse fungo nas fezes ocasionou uma redução de até 99% na contagem de larvas infectantes nas coproculturas efetuadas com fezes colhidas no terceiro dia após a ingestão do fungo Santos et al. (1996).

Waller et al. (1994) demonstraram *in vivo*, que os conídios



de *Arthrobotrys* spp. são capazes de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal de ovinos. Todavia, a redução das larvas nas fezes estava relacionada com a concentração conidial e, desse modo, grandes números foram requeridos para mostrar uma maior efetividade. Os esporos fúngicos ou mesmo o micélio sobrevivem ao trato gástrico, mas são menos tolerante à passagem pelo intestino dos ruminantes. Para os isolados de *Arthrobotrys* testados neste experimento, doses acima das administradas seriam necessárias para se verificar atividade predatória.

Os ovos dos nematóides são eliminados juntamente com as fezes do animal parasitado. Entretanto, a liberação dos ovos não é uniforme e, dessa forma, o número de ovos eliminados varia de um dia para o outro e até mesmo durante o próprio dia. Diversos fatores podem explicar essa variação, entre eles: o número de parasitas adultos colonizando o trato gastrointestinal, a imunidade do hospedeiro, a idade do hospedeiro, a espécie de parasita, o estágio de infecção, o parto e a consistência das fezes (CHARLES; FURLONG, 1992; HANSEN; PERRY, 1994; UENO; GONÇALVES, 1998). Dessa forma, a flutuação do número de ovos, observada neste trabalho, é normal em relação à consequência de alguns desses fatores citados acima.

Os fungos nematófagos utilizados no presente trabalho pertencem ao grupo dos predadores, isto é, eles somente exercem ação nos estágios larvais de vida livre. Assim, o esperado era verificar uma redução no número de larvas seguida de uma administração fúngica. Isso pôde ser observado pela comparação do número médio de OPG com o número médio de larvas obtidas das coproculturas. Somente *D. flagrans* foi capaz de reduzir o número de larvas infectantes nos três dias pós-administração, embora ainda houvesse ovos presentes.

Um experimento realizado por Bird (1995) quando um fungo foi inoculado diretamente nas fezes de equinos, demonstrou que a relação entre o número de conídios e ovos de nematóides influenciou a eficácia do fungo. Apenas com igual concentração ou acima de um esporo por ovo, reduções acima de 91% foram alcançadas pelos fungos *D. flagrans* e *A. oligospora*. Como o número de ovos de nematóides gastrintestinais flutuou durante a excreção, o inóculo administrado para o animal deve ter sido suficiente para causar uma redução significativa. Neste estudo, foi possível verificar que esta dose de 700.000 estruturas administradas por quilograma de peso vivo foi reduzido acima de 95%, obtendo uma média de OPG acima de 3000. Desse modo, pode-se pressupor indiretamente que foi obtida uma razão de um esporo por ovo.

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram estudos anteriores que também compararam a eficácia dos isolados de *D. flagrans* e *Arthrobotrys* reduzindo larvas infectantes de nematóides. Nas observações fortalecem a possibilidade de, num futuro próximo, usar *D. flagrans* como um agente de controle biológico, cujo benefício seria reduzir o número de administrações anuais de drogas anti-helmínticas. Isso poderia prolongar a vida útil dessas drogas anti-helmínticas, reduzindo a sua resistência e também a presença de resíduos químicos nos tecidos

dos animais. Esse aspecto é de fundamental importância, em virtude do aumento da constante pressão, por parte dos consumidores, por alimentos sem resíduos químicos.

## CONCLUSÕES

Os clamidósporos dos isolados CG 721 e CG 768 (*D. flagrans*) apresentaram maior resistência aos processos digestivos dos ruminantes em comparação aos conídios do *A. oligospora* e *A. musiformis*. Os resultados da redução de larvas infectantes de nematóides sugerem que apenas os isolados CG 721 e CG 768 predaram eficazmente as larvas infectantes após a passagem pelo trato digestivo dos ovinos. Os resultados deste estudo demonstram que o controle biológico dos nematóides gastrintestinais com *D. flagrans* é uma alternativa promissora ao controle químico.

**Agradecimentos:-** Agradecemos à Faperj, CNPq e aos Drs. Renato Augusto DaMatta e Richard Ian Samuels pelos comentários e revisão deste manuscrito e Dr. Alexandre Pio Viana por revisar as análises estatísticas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIRD, J. *Effect of nematophagous fungi on the development of infective larvae of common endoparasites of horses, sheep and cattle*. 1995. 95f. Columbus. Tese (Doutorado) - The Ohio State University, Columbus, 1995.
- CHARLES, T.P.; FURLONG, J. *Doenças parasitárias dos bovinos de leite*. Coronel Pacheco: Embrapa-CNPGL, 1992. 134 p.
- DIAS, A.S.; ARAÚJO, J.V.; CAMPOS, A.K.; BRAGA, F.R.; FONSECA, T.A. Application of a formulation of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in the control of cattle gastrointestinal nematodiosis. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, v.23, n.9, p. 1245-1252, 2007.
- FAEDO, M.; LARSEN, M.; WALLER, P.J. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: Comparison between Australian isolates of *Arthrobotrys* spp. and *Duddingtonia flagrans*. *Veterinary Parasitology*, v. 72, n.2, p.149-155, 1997.
- FONTENOT, M.E.; MILLER, J.E.; PENA, M.T.; LARSEN, M.; GILLESPIE, A. Efficiency of feeding *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to grazing ewes on reducing availability of parasitic nematode larvae on pasture. *Veterinary Parasitology*, v.118, n.3-4, p.203-213, 2003.
- 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, n.1-4, p.311-325, 1993.
- HANSEN, J.; PERRY, B. The epidemiology, diagnosis and control of helminth parasites of ruminants. *International Laboratory for Research on Animal Diseases*, Nairobi, Kenya, 1994. p.171.

- LARSEN, M. Biological control of helminths. *International Journal for Parasitology*, v.29, n.1, p.139-146, 1999.
- LARSEN, M. Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious micro fungi. *Parasitology*, v.120, n.2, p.121-131, 2000.
- LARSEN, M. Biological control of nematode parasites in sheep. *Journal Animal Science*, v. 84, n.13, p.133-139, 2006.
- SANTOS, C. de P.; PADILHA, T., SAUMELL, C.A. Efficacy of *Arthrobotrys musiformis* in reducing infective larvae of trichostrongylid nematodes in fecal cultures after passage through bovine gastrointestinal tract. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5, 1996. Foz do Iguaçu. *Anais...* Foz do Iguaçu: Embrapa-CNPSO, 1996. p.65.
- SANTOS, C. de P.; SAUMELL, C. A.; PADILHA, T.; LARSEN, M. Nematophagous fungi in decomposing ruminant and equine feces in Brazil. In: INTERNATIONAL CONFERENCE NOVEL APPROACHES TO THE CONTROL OF HELMINTHS PARASITES OF LIVESTOCK, 2, 1998. *Abstracts ...* Baton Rouge: World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, 1998. 59p.
- UENO, H.; GONÇALVES, P. C. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes., 4 ed. Tóquio: JICA, 1998.143p.
- 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*, v.51, n.3-4, p. 289-299, 1994.
- WALLER, P. J.; THAMSBORG, S. M. Nematode control in 'green' ruminant production systems. *Trends in Parasitology*, v.20, n.10, p. 493-497, 2004

Recebido em 30 de abril de 2008.

Aceito para publicação em 14 de setembro de 2008.