

MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE CLAMIDÓSPOROS DO FUNGO NEMATÓFAGO *Duddingtonia flagrans*

FLÁVIA BIASOLI DE ARAÚJO¹; DANIEL BORGES SÁVIO²; EMANOELE FIGUEIREDO SERRA³; CLÓVIS DE PAULA SANTOS⁴; RENATA OSÓRIO FARIA⁵; MÁRIO CARLOS DE ARAÚJO MEIRELES⁶

¹Programa de Pós-Graduação em Veterinária- UFPel, Bolsista CAPES-
flaviaaraujo_vet@yahoo.com.br

²Programa de Pós-Graduação de Ciência e Tecnologia Agroindustrial – UFPel, Bolsista CAPES

³Graduanda em Medicina Veterinária, UFPel

⁴Professor Associado da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF)

⁵Professora da Universidade Federal de Pelotas, UFPel

⁶Universidade Federal de Pelotas, UFPel – meireles@ufpel.tche.br

1. INTRODUÇÃO

Os fungos nematófagos têm sido amplamente pesquisados como agentes de biocontrole contra parasitas gastrintestinais de ruminantes. JACKSON; MILLER (2006), acreditam que a utilização de formas de controle biológico com o uso desses fungos, pode representar uma promissora alternativa, pois diminuiria os efeitos deletérios nos animais, no meio ambiente e no homem, causado pelo uso exclusivo de anti-helmínticos.

Diversos estudos têm mostrado que a espessura da parede celular dos clamidósporos de *Duddingtonia flagrans* é capaz de sobreviver à passagem pelo trato gastrintestinal de ruminantes (FAEDO et al., 1997, LARSEN et al., 1998), sendo que existem técnicas que determinam de forma qualitativa e quantitativa a presença ou ausência dessas estruturas fúngicas nas fezes de animais tratados. Essa importante característica de sobrevivência de *D. flagrans* é fundamental, na medida em que se abre a possibilidade de explorar como esse fungo pode ser incorporado para administração nos animais com consequente implementação prática. WALLER; FAEDO (1996), obtiveram resultados bastante positivos quando adicionaram clamidósporos do fungo a formulações minerais. Já WALLER et al. (2001), observaram esporos viáveis nas fezes de ovinos que receberam dispositivos intra-ruminais com liberação controlada de clamidósporos do fungo supracitado. A formulação também pode ser adquirida adicionando o inóculo fúngico a diferentes cereais como milho, sorgo, cevada, arroz dentre outros (SANTOS, 2000).

O presente trabalho teve por objetivo demonstrar a técnica de quantificação de clamidósporos de *D. flagrans* tendo o cereal milho como substrato.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O fungo isolado foi proveniente da cidade de Bagé/RS, pela técnica de espalhamento do solo (DUDDINGTON, 1955) e semeado no Laboratório de Micologia da Universidade Federal de Pelotas, em Potato Dextrose Ágar (PDA) em placas de petri. Após crescimento, quatro quadrados de 1cm² do fungo foram transferidos para garrafas de Roux, previamente autoclavadas, contendo milho triturado, tipo “canjiquinha”, como substrato para crescimento de clamidósporos, na quantidade de 107 gramas para cada 43 mL de água destilada. As garrafas foram acondicionadas em estufa durante 21 dias, a 26,0°C e 80% de umidade,

sendo diariamente agitadas para inclusão do fungo no milho. Após o período, o material foi retirado das garrafas, homogeneizado, para posterior contagem dos clamidósporos produzidos pelo fungo. Uma alíquota de 10 gramas foi retirada e macerada com gral e pistilo em 100 mL de água destilada. A suspensão foi filtrada em uma peneira contendo um tecido sintético com malha de trama de 100 micras. Após homogeneização, foi preenchida uma Câmara de Neubauer e a contagem foi feita nos quadrantes maiores (extremidades), com auxílio de microscópio óptico. A contagem na câmara foi de clamidósporos/mL ao qual se fez à correlação entre o volume utilizado e os gramas para se obter a quantidade de clamidósporos por grama (SANTOS et al., 2001). O valor final, define não só a quantidade quanto concentrações para administrações nos animais.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram observados na câmara de Neubauer, além de clamidósporos, resíduos de substrato de crescimento, sendo que a contagem final foi de 1.100.000 clamidósporos/grama obtendo-se êxito em relação ao elevado número de produção desses esporos tendo o milho como substrato. Segundo PEÑA et al. (2002), doses diárias de um milhão ou mais de clamidósporos de *D. flagrans* por quilo de peso vivo têm sido usadas em testes de campo, contudo, algumas observações mostram que o nível da dose pode ser menor para pequenos ruminantes, corroborando alto valor para o encontrado. LARSEN et al. (1995) e WALLER et al. (2001), relatam que pesquisas foram satisfatórias com produção e quantificação de fungos nematófagos em substratos sólidos como grãos de cereais e o substrato colonizado sendo fornecido posteriormente para animais. Essa técnica de utilização desse microrganismo em substratos sólidos é denominada técnica de secagem e utiliza normalmente as formas de resistência dos fungos (esporos), tendo como princípio a redução da quantidade de água, sendo caracterizada por reduzir o metabolismo das células durante o período de armazenamento (GRAMINHA et al., 2005).

Outros pesquisadores quantificaram clamidósporos de *D. flagrans* em cereais com desfecho favorável. JOBIM et al. (2006), obtiveram concentração de $1,6 \times 10^6$ clamidósporos grama⁻¹ de sorgo após processo de fermentação a seco em sorgo estéril, demonstrando crescimento do fungo nesse cereal. CRUZ et al. (2008), também quantificaram clamidósporos de *D. flagrans* em cultivo de milho em garrafas de Roux, ao qual administraram 700.000 clamidósporos/Kg/peso vivo, em ovinos. SANTURIO et al. (2009) também utilizaram cereal para crescimento, ao qual colônias de *D. flagrans* cresceram sobre grãos de arroz.

4. CONCLUSÕES

A técnica para contagem de clamidósporos mostrou-se eficiente, pois estes se incorporaram ao milho como substrato, e ao final, puderam ser observados na Câmara de Neubauer e posteriormente contabilizados. Diante do valor numérico obtido, pôde ser demonstrado que esse método pode ser seguramente utilizado para definir as concentrações de fungo a serem administradas em animais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DUDDINGTON, C. L. Notes on the technique of handling predacious fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 38, n.2, p. 97-103, 1955.

CRUZ, D.G.; CORDEIRO, R.C.; LOPES, A.J. O; ROCHA, L.V.; SANTOS, C.P. 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, p. 133-137, 2008.

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* spp. **Veterinary Parasitology**, v.72, p.149–155, 1997.

GRAMINHA, E. B. N.; MONTEIRO, A. C.; SILVA, H. C.; OLIVEIRA, G. P.; COSTA, A. J. Controle de nematóides parasitos gastrintestinais por *Arthrobotrys musiformis* em ovinos naturalmente infestados mantidos em pastagens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.40, n.9, p.927-933, 2005.

JACKSON, F.; MILLER, J. E. Alternative approaches to control – Quo vadit? **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 139, p. 371-384, 2006.

JOBIM, M. B.; SANTURIO, J. M.; DE LA RUE, M. L. *Duddingtonia flagrans*: controle biológico de nematodeos de bovinos a campo. **Ciência Rural**, v.38, p. 2256-2263, 2008.

LARSEN M., NANSEN P., WOLSTRUP J., GRØNVOLD J., HENRIKSEN S.A. & ZORN A. Biological control of trichostrongylosis in grazing calves by means of the fungus *Duddingtonia flagrans*. **Veterinary Parasitology**, p.321-330, 1995.

LARSEN, M., FAEDO, M., WALLER, P.J., HENNESSY, D.R. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: studies with *Duddingtonia flagrans*. **Veterinary Parasitology**, v.76, p.121–128, 1998.

PEÑA, M.T.; MILLER, J.E.; FONTENOT, M.E.; GILLESPIE, A.; LARSEN, M. Evaluation of *Duddingtonia flagrans* in reducing infective larvae of *Haemonchus contortus* in feces of sheep. **Veterinary Parasitology**, v.103, p. 259-265, 2002.

SANTOS, C.P. **Isolamento, identificação, produção massal de fungos nematófagos e avaliação de características biológicas do fungo *Duddingtonia flagrans***. 2000. 80f. Tese (Doutorado). Seropédica: UFRJ, 2000.

SANTOS, C.P.; PADILHA, T.; RODRIGUES, M.L. A. Predatory activity of *Arthrobotrys oligospora* and *Duddingtonia flagrans* on pre-parasitic larval stages of cyathostominae under different constant temperatures. **Ciência Rural**, v.31, n.5, p. 839-842, 2001.

SANTURIO, J.M.; ZANETTE, R.A.; ALEKSANDRO, A.S.; DE LA RUE, M.; MONTEIRO, S.G.; ALVES, S.H. Improved method for *Duddingtonia flagrans* chlamyospores production for livestock use. **Veterinary Parasitology**, v.164, p.344–346, 2009.

WALLER, P. J. FAEDO, M. The prospect for biological control of the free-living stages of nematode parasite of livestock. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 26, p. 915-925, 1996.

WALLER, P.J.; FAEDO, M.; ELLIS, K. The potential of nematophagous fungi to, control the free-living stages of nematodes parasites of sheep: towards the development of a fungal controlled release device. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 102, p. 321-330, 2001.