

SELEÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS PARA O BIOCONTROLE DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* EM REGIÕES DE CLIMA TROPICAL

*Thiago Dias SILVA¹, Jéssica Patrícia de OLIVEIRA¹, Bruno de Sousa PEREIRA¹, Emiliane dos Santos BELO¹, Flávia Oliveira ABRÃO¹, Rafael Ícaro Matos VIEIRA¹, Jakcelly Custódio FERREIRA¹, Isabela Luriko Sampaio SHIKASHO¹

¹Instituto Federal Goiano – Campus Ceres. *autor correspondente: thiago.zootecnia@outlook.com.

RESUMO - *Rhipicephalus microplus* é um ectoparasita que gera grandes prejuízos para pecuária devido a espoliação dos bovinos e ao alto custo de controle, que é baseado no uso de produtos químicos, contudo seu uso incorreto causa resistência nesta espécie. Desse modo, objetivou-se isolar, identificar e selecionar cepas eficientes no controle biológico do *R. microplus* para regiões de clima tropical. Amostras de solo e de *Brachiaria brizantha* foram realizadas para isolamento das espécies fúngicas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram coletadas para os bioensaios de taxa de colonização. Foram quantificados $2,0 \times 10^{-3}$ UFC.g⁻¹ e identificados cinco gêneros, sendo que o *Aspergillus* spp. apresentou maior número de isolados em ambos ambientes. A forrageira apresentou maior quantidade de colônias fúngicas.g⁻¹ em relação ao solo. Foram identificadas espécies entomopatogênicas, patogênicas, saprófitas e queratinofílicas com potencial biotecnológico e para uso em programas de controle biológico. *Aspergillus* é o fungo mais prevalente tanto no solo, quanto em forrageiras em regiões de clima tropical. Alta diversidade fúngica é observada nos ecossistemas estudados. *Metarhizium anisopliae* colonizou eficientemente os parasitas com 80% de colonização, diferindo-se estatisticamente dos demais tratamentos (p<0,01). Outros estudos devem ser feitos buscando avaliar outras concentrações dos fungos testados, formas de manipulação, dentre outros bioensaios.

PALAVRAS-CHAVE: bovinocultura leiteira, carrapato, controle biológico, ensaios in vitro

ABSTRACT - *Rhipicephalus microplus* is an ectoparasite that generates great losses for livestock due to the spoliation of cattle and to the high cost of control, which is based on the use of chemical products, however its incorrect use causes resistance in this species. Thus, we aimed to isolate, identify and select efficient strains in the biological control of *R. microplus* for regions of tropical climate. Soil and *Brachiaria brizantha* samples were taken for isolation of the fungus species and engorged females of *R. microplus* were collected for the colonization rate bioassays. 2.0×10^{-3} UFC.g⁻¹ were identified and five genera were identified, and *Aspergillus* spp. presented higher number of isolates in both environments. The forage presented higher number of fungal colonies.g⁻¹ in relation to the soil. Entomopathogenic, pathogenic, saprophytic and keratinophilic species with biotechnological potential and for use in biological control programs were identified. *Aspergillus* is the most prevalent fungus both in soil and in forages in tropical regions. High fungal diversity is observed in the studied ecosystems. *Metarhizium anisopliae* efficiently colonized the parasites with 80% colonization, differing statistically from the other treatments (p <0.01). Other studies should be done seeking to evaluate other concentrations of fungi tested, forms of manipulation, among other bioassays.

KEYWORDS: dairy cattle, tick, biological control, in vitro tests

INTRODUÇÃO

Carrapatos são ectoparasitas caracterizados principalmente por se alimentarem de sangue, independente da família, gênero ou espécie, sendo que a espécie *Rhipicephalus microplus*, é uma das que geram grandes prejuízos para pecuária de corte e leite devido a espoliação dos bovinos e ao alto custo das técnicas atuais de controle (Ramos et al., 2009). As condições climáticas do Brasil contribuem para o desenvolvimento do ectoparasita, permitindo assim que populações de carrapatos se estabeleçam em praticamente todo o território nacional (Kassab et al., 2011).

O combate de carrapatos é feito através do controle químico, contudo o uso incoerente desse método favorece a ocorrência de resistência (Farias et al., 2008). Além disso, pode ocorrer a permanência de resíduos nos animais e em seus produtos, e desse modo, alternativas para o controle desse organismo é de suma relevância. Vários inimigos naturais presentes no hospedeiro ou no solo contribuem no controle desse parasita, tais como fungos (Veríssimo, 2013), que, de modo especial, apresentam uma série de fatores favoráveis que os tornam uma excelente escolha para o controle biológico de ectoparasitas. Monteiro (2014) afirma que a facilidade de multiplicação, produção em meios artificiais, dispersão, ausência da poluição ambiental e toxicidade para humanos, fazem deste um agente altamente eficiente no controle de carrapatos.

O uso de químicos em sub e superdosagem, preparos inadequados, aplicações mal realizadas, entre outros fatores faz com que os carrapatos não morram após contato com o produto, fazendo com que estes passem para às gerações posteriores as informações genéticas de resistência àquele produto (Olivo et al.,

2008). Desse modo, torna-se necessário a disponibilidade de métodos alternativos a serem empregados em sistemas integrados de controle. Pesquisas direcionadas a avaliação do potencial dos fungos entomopatogênicos são essenciais para que se conheça a eficiência de diferentes isolados e se possa eleger o mais adequado para sua utilização em programas de biocontrole de carrapatos (Barci et al., 2009). Desse modo o presente estudo tem por objetivo isolar, identificar e selecionar cepas eficientes no controle biológico do *Rhipicephalus microplus* nos trópicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de solo e de *Brachiaria brizantha* foram obtidas aleatoriamente nas dependências do setor de bovinocultura do Instituto Federal Goiano, Campus Ceres. As amostras foram homogeneizadas e submetidas a diluição seriada até diluição 10^{-5} . Desta, retirou-se uma alíquota de um mL e inoculou-se em placa de Petri contendo o meio de cultura Sabouraud e incubadas em estufa a 37°C por até 15 dias.

Além das amostras coletadas, foram utilizadas uma cepa de *Metarhizium anisopliae* (fungo referência no controle biológico de carrapatos adquirida por meio de compra) e cepas de *Aspergillus* spp. oriundos de rúmen de bovinos de corte criados em sistema de pastejo, cedidos pela UFMG. As colônias desenvolvidas foram quantificadas e um representante de cada morfotipo foi repicado. A identificação baseou-se nas características macroscópicas da colônia, como cor, forma e aspecto, bem como nas estruturas microscópicas e reprodutivas, através da técnica de microcultivo (Kern & Blevins, 1999).

Amostras de fêmeas ingurgitadas (teleógenas) da espécie *Rhipicephalus microplus* foram obtidas aleatoriamente de bovinos da região de Ceres-GO e levadas ao laboratório de Microbiologia. Posteriormente, cada indivíduo coletado foi pesado e separado homogeneamente por peso para realização do bioensaio. Cada indivíduo representou uma repetição. Cada cepa fúngica avaliada constituiu um tratamento. As soluções dos isolados fúngicos foram padronizadas em função da escala de Mac Farland 3 e ressuspensos em água destilada estéril e surfactante Tween 20 (Lorenzetti et al., 2012). O tratamento controle (negativo) foi representado por aspersão de água destilada estéril nas unidades experimentais.

Cinco teleógenas foram armazenadas individualmente no interior de placas de petri e banhadas com 10 μL do inóculo padronizado para cada fungo. Após aspersão, as placas seguiram para estufa BOD a 26°C e fotofase de 12h. A cada cinco dias até o 30º dia após tratamento realizou-se leituras para determinação da capacidade de colonização e antagonismo do inóculos. Os carrapatos mortos foram quantificados e a taxa de colonização foi medida de forma qualitativa por observação visual (-, +, ++, +++) (metodologia adaptada de Loureiro et al., 2005) e taxa de mortalidade para cada tratamento.

Foi adotado delineamento inteiramente ao acaso (DIC). Aplicando-se análise exploratória para todas as variáveis analisadas. Variáveis não paramétricas foram comparadas pelo teste de Kruskal-wallis ($P=0,05$). Todas as análises foram realizadas no pacote estatístico ASSISTAT 7.7 Beta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A forrageira estudada apresentou $1,75 \times 10^4$ UFC's.g⁻¹, maior quantidade em relação ao solo que foi de 3×10^3 UFC's.g⁻¹, diferindo-se estatisticamente ($P<0,05$). Entre os fatores que podem contribuir para a baixa microbiota fúngica nas amostras de solo, de acordo com Klich (2002), estão a variedade florística reduzida, fatores abióticos e manejo inadequado das áreas exploradas.

Durante o experimento foram quantificados em média $2,0 \times 10^3$ UFC.g⁻¹ e identificados fungos dos gêneros *Aspergillus* (5 em *B. brizantha* e 4 no solo), *Gliocadium*, *Paecilomyces*, *Trichoderma*, *Trichophyton*, sendo todos com um único exemplar em *B. brizantha* e *Scedosporium* (1 no solo), em que o *Aspergillus* apresentou maior prevalência. Em relação à capacidade de colonização de teleógenas (Tabela 1), apenas o *M. anisopliae* colonizou eficientemente os parasitas com 80% de colonização ($P<0,01$).

Tabela 1: Massa de fêmeas em gramas (MF), taxa de colonização de fêmeas ingurgitadas (TC) e taxa de mortalidade (TM) de *R. microplus* submetidas ao tratamento com os respectivos isolados fúngicos

Isolados	Origem	MF	TC (%)	TM (%)
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Comercial	1,07	80 a	80 a
<i>Aspergillus fumigatus</i> (R1)	Rúmen	1,03	4 b	60 b
<i>Aspergillus</i> spp. (F1)	Forrageira	1,02	20 b	20 b
<i>Aspergillus</i> ssp. (S1)	Latossolo	1,04	7 b	60 b
<i>Aspergillus terreus</i> (S2)	Latossolo	1,04	20 b	40 b
<i>Aspergillus</i> spp. (F2)	Forrageira	1,02	7 b	20 b
<i>Aspergillus terreus</i> (F3)	Forrageira	1,08	8 b	0 b
<i>Aspergillus terreus</i> (R2)	Rúmen	1,03	0 b	20 b
<i>Aspergillus</i> spp. (S3)	Latossolo	1,08	6 b	60 b
<i>Trichoderma</i> ssp. (F4)	Forrageira	1,09	18 b	0 b

<i>Scedosporium prolificans</i> (S4)	Latossolo	1,08	7 b	20 b
<i>Aspergillus terreus</i> (F5)	FORAGEIRA	1,06	0 b	20 b
<i>Trichophyton</i> spp. (F6)	FORAGEIRA	1,06	0 b	0 b
<i>Aspergillus</i> ssp. (R3)	RÚMEN	1,04	0 b	0 b
<i>Aspergillus terreus</i> (F7)	FORAGEIRA	1,07	0 b	0 b
Controle negativo	H2O	1,05	0 b	0 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis ($\alpha=5\%$).

Não se notou a penetração em aberturas naturais do carrapato (aparelho bucal, espiráculos respiratórios, orifício genital e anal), como descrito em insetos infectados por diversas espécies de fungos, corroborando assim com os resultados encontrados por Garcia et al. (2004). Nesse sentido a penetração via tegumento torna-se uma característica interessante na escolha de fungos que tenha potencial no controle de artrópodes sugadores (Garcia et al., 2004). O tempo para que ocorra a germinação e penetração no corpo do hospedeiro também são características importantes para a escolha das linhagens.

A colonização do carrapato ocorreu entre 48 e 72h após a infecção sendo caracterizada pela presença de estruturas fúngicas sobre o parasita. Logo após a morte das fêmeas ingurgitadas, observou-se os primeiros pontos de crescimento do fungo externamente, sendo possível visualizar o micélio fúngico sobre o cadáver. A conidiogênese iniciou-se entre o 8º e 10º dia após a infecção sendo que o tratamento com o *M. anisopliae* houve grande produção de conídios, já nos demais tratamentos observou-se pouca formação de conídios.

CONCLUSÕES

Nas condições deste experimento, *Aspergillus* é o fungo mais prevalente tanto no solo, quanto em forrageiras em regiões de clima tropical. Alta diversidade fúngica é observada no ecossistema estudado. *M. anisopliae* é antagonista à fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, sendo assim o agente efetivo no biocontrole de carrapatos bovinos em regiões tropicais.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Federal Goiano – Campus Ceres (PIPECTI).

REFERÊNCIAS

- BARCI, L.A.G.; ALMEIDA, J.E.M.; NOGUEIRA, A.H.C.; PRADO, A.P. **Determinação da CL90 e TL90 do isolado IBCB66 de Beauveria bassiana (Ascomycetes: Clavicipitaceae) para o controle de Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae).** Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v.18, p.34-39, 2009.
- BARROS-BATTESTI, D.M.; ARZUA, M.; BECHARA, G.H. **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies.** São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, 2006, 223p.
- FARIAS, N.A.; RUAS, J.L.; SANTOS, T.R.B. **Análise da eficácia de acaricidas sobre o carrapato Boophilus microplus, durante a última década, na região sul do Rio Grande do Sul.** Ciência Rural, v.38, n.6, p.1700-1704, 2008.
- GARCIA, M.V.; MONTEIRO, A.C.; SZABO, M.P.J. **Colonização e lesão em fêmeas ingurgitadas do carrapato Rhipicephalus sanguineus causadas pelo fungo Metarhizium anisopliae.** Ciência Rural, v.34, n.5, p.1513-1518, 2004.
- KASSAB, S.O.; FONSECA, P.R.B.; ROSSONI, C.; BARBOSA, R.H.; LOUREIRO, E.S. **Isolados de fungos entomopatogênicos no controle do Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae).** Revista Verde, v.6, n.3, p.222-225, 2011.
- KLICH, M.A. **Biogeography of Aspergillus species in soil and litter.** Mycologia, v.94, n.1, p.21-27, 2002.
- MONTERIO, C.M.O. **Controle de Rhipicephalus microplus (ACARI: IXODIDAE) com nematoides entomopatogênicos: aplicação em formulação inseto cadáver e compatibilidade com outros agentes de controle.** 2014, 198 f. (Tese de doutorado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - Instituto de Veterinária Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Seropédica – RJ, 2014.
- OLIVO, C.J.; CARVALHO, N.M.; SILVA, J.H.S.; VOGEL, F.F.; MASSARIOL, P.; MEINERZ, G.; AGNOLIN, C. MOREL, A.F.; VIAU, L.V. **Óleo de citronela no controle do carrapato de bovinos.** Ciência Rural, v.38, n.2, p.406-410, 2008.
- RAMOS, J.A.G.; OLIVEIRA, R.R.; BECHTLUFFT, M.P. **Perfil de proteínas de ovo de carrapato Boophilus microplus.** SynThesis Revista Digital FAPAM, v.1, n.1, p.274-281, 2009.
- VERÍSSIMO, C.J. **Fatores que afetam a fase de vida livre de carrapatos. In: Controle de carrapatos nas pastagens.** Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, p.11-26, 2013.