

EFEITO NEMATICIDA DE *Bacillus* spp. EM NEMATÓIDES de OVINOS

SINOTT, M. C.^{1*}; CORRÊA, T. G.²; LEITE, F. P. L.³

Resumo

A busca para um eficiente controle dos parasitas gastrintestinais ovinos se faz necessária para que o avanço da ovinocultura no Brasil prossiga. Os métodos utilizados atualmente já não são eficazes, pois esses parasitos estão cada vez mais resistentes aos fármacos tradicionais, seja pela utilização do mesmo principio ativo por muito tempo ou pela administração errônea de subdoses. O controle biológico é uma prática comum na agricultura e pode vir a ser uma alternativa à problemática enfrentada na pecuária brasileira. No presente trabalho, foi estudada a ação nematicida de *Bacillus* spp. em larvas jovens de *Haemonchus* sp . Esse trabalho foi realizado através da montagem de coproculturas (pelo método de Robert O' Sullivan) com a exposição dos ovos desse nematóide à ação de cepas bacterianas selecionadas da bacterioteca do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia-UFPel, repicadas em meio apropriado e temperatura apropriadas e com um alto grau de esporulação . Como Resultados acabou-se obtendo uma redução do número de larvas do terceiro estágio, em até 83,3%, em relação aos grupos controle, pela exposição das amostras fecais ao *Bacillus circulans* por 7 dias. Esse resultado mostram que o controle biológico pode vir a ser uma alternativa para a problemática das parasitoses dos rebanhos ovinos.

1. Introdução

A necessidade do combate às parasitoses é uma realidade do cenário da pecuária mundial. Os prejuízos causados por essas enfermidades estão além da queda na produção, mas abrangem também um aumento de custos com antihelmínticos cada vez mais fortes e aplicados em intervalos de tempo cada vez menores, e torna necessária uma busca por técnicas de manejo, que antes não eram habituais para o produtor. Juntamente há, com o uso

¹ Graduanda em Medicina Veterinária, UFPel

² Médico Veterinário, MC, Doutorando em Veterinária, UFPel

³ Médico Veterinário, Dr., Prof. Adjunto, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, UFPel

desregrado desses fármacos, o desenvolvimento de resistência por parte desses parasitas, o que torna mais difícil a solução desse problema.

Dos nematóides mais importantes na ovinocultura sulina está indubitavelmente na frente da lista o tricostrongilídeo conhecido por *Haemonchus sp*, possuindo elevada prevalência nos rebanhos e alta patogenicidade (Dargie e Allonby, 1975). Esse é um parasito hematófago e as infecções por ele causadas, quando maciças, são marcadas por anemia severa e prostração além de serem de difícil controle, pois o parasita faz hipobiose, e adquiriu resistência à maioria dos fármacos utilizados.

A busca para solucionar essa problemática envolve o estudo do controle biológico, realizado por *Bacillus spp*, pois esses já exercem importante papel no controle às pragas agrícolas (Rodrigues et al) (Schepf et al., 1998)

O presente estudo está fundamentado na avaliação do poder nematicida de *Bacillus spp* sobre formas jovens de *Haemonchus sp*.

2. Materiais e Métodos

2.1 Parasitas

As amostras fecais foram colhidas da ampola retal de cordeiros de mesma idade, condição corporal, ambiente e infectados com aproximadamente 95% de *Haemonchus sp*. Essas amostras foram submetidas à análise do percentual de infecção através da técnica de Gordon & Whitlock (1939) que consiste na contagem do número de ovos contidos em um grama de fezes (OPG) através de pesagem de 2g de fezes ovinas e a homogeneização dessas com 58mL de solução de NaCl supersaturada, tamisação da mistura e posterior visualização e contagem no microscópio óptico de 1mL do preparado na câmara de McMaster. Foram aceitas amostras que continham um número superior a 2000 ovos por grama. Esse material serviu como base para a montagem dos experimentos.

2.2 Preparação dos *Bacillus*

As bactérias selecionadas foram recuperadas através do repique em meio Brian Heart Infusion (BHI) agar, postas em estufa à temperatura de 35°C

por 24h. Após esse tempo foi realizada a coloração de Gram para certificar-se da pureza do inóculo. Esse material foi inoculado em meio BHI líquido dentro de balões haletados com capacidade volumétrica de um litro, porém com 20% de sua capacidade (200mL) e posto em agitador orbital a temperatura de 30°C a velocidade de 150 rpm durante 48h afim de que haja esporulação. Ao término desses 2 dias realizou-se coloração de Gram e de Esporos em todas as amostras recuperadas. Esse material serviu como base para a montagem dos experimentos.

2.3 Montagem do Experimento

Foram realizadas coproculturas através da técnica de Roberts e O'Sullivan (1950) modificada pela adição de 4g de fezes ovinas processadas e de 2 mL dos cultivos bacterianos previamente preparados.

Os experimentos foram realizados em triplicata e ao grupo controle foi adicionado água.

Essas amostras foram postas em BOD à temperatura de 28°C e umidade de 60% durante 7 dias. Após esse período foi feita a virada das amostras e recolhidas as larvas, para viabilizar a contagem total e calcular a redução dos grupos tratados em relação ao grupo controle. A fórmula utilizada no cálculo da percentagem de redução foi: $R=100(1-T/C)$ onde R representa a redução, C representa o número de larvas no grupo controle e T equivale ao número de larvas contadas nos diferentes tratamentos

Com bactéria que se mostrou mais eficaz nesses primeiros estágios, foram montados experimentos com diluições de 1/10 e 1/100 e com o cultivo puro, tendo também como controle negativo a água e, no final do sétimo, dia realizada a contagem total das larvas

3. Resultados

As bactérias utilizadas foram: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, *Bacillus thuringiensis* var. *osvaldocruzi*, *Bacillus thuringiensis* var. *morrisoni*, *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* e *Bacillus circulans*.

A bactéria que se mostrou mais eficiente na redução do número de larvas foi o *B. circulans*, chegando a um percentual de 83,3% de redução larval em relação

ao grupo controle. a bactéria que menos se mostrou eficiente foi o *Bacillus thuringiensis var. morrisoni* não havendo redução do número de larvas em relação ao grupo controle.

As outras bactérias se comportaram da seguinte forma: *Bacillus thuringiensis var. israelensis* reduziu 80,6% , *Bacillus thuringiensis var. osvaldocruzi* reduziu 78,2%, *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* reduziu 65,7%, conforme Gráfico 1.

Nos experimentos em que ocorreram as diluições a redução das amostras tratadas ficou: em 90% no cultivo puro, 63% na diluição de 1:10 e 24% na diluição de 1/100., conforme Gráfico 2. Após esse processo foram semeadas as amostras de *Bacillus circulans* utilizadas nas coproculturas e a quantidade de UFC contidas em 1mL do cultivo puro era de 2×10^8 UFC/mL

Gráfico 1: % de Redução de Larvas em Fezes Inoculadas com Bacillus

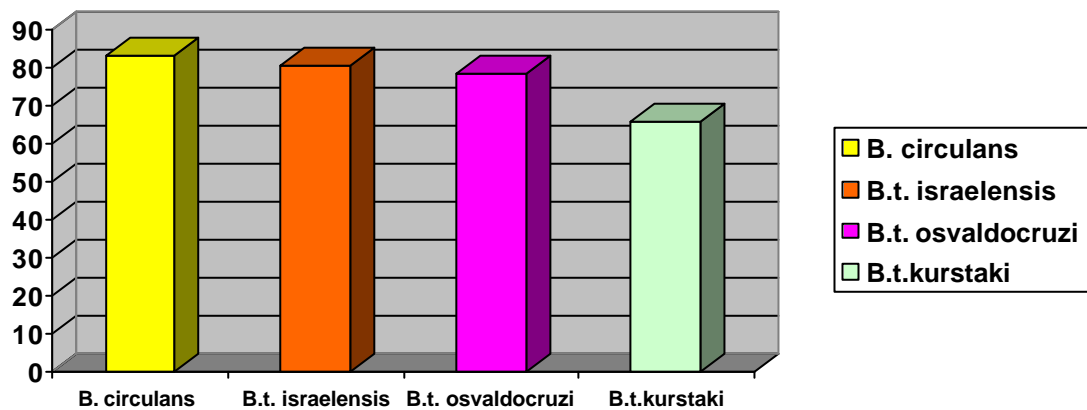
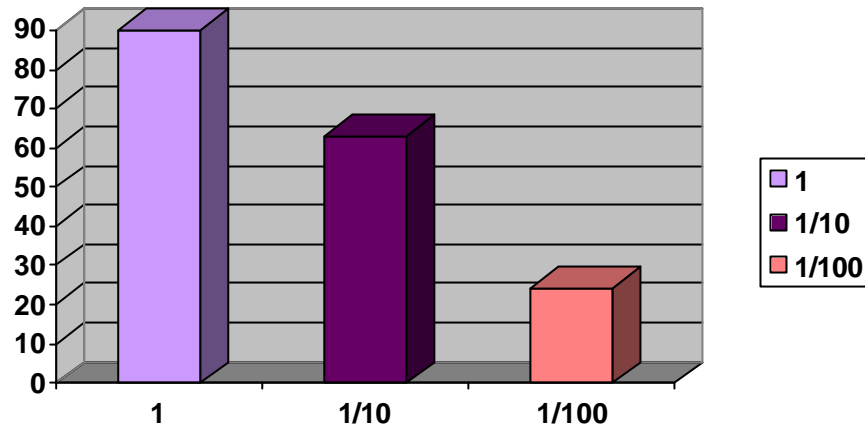


Gráfico 2 : % de Redução X Grau de Concentração do Cultivo de *Bacillus circulans*



4.

Discussão

Os resultados mostraram que a redução do número de larvas deve-se à ação das nematotoxinas liberadas quando há a esporulação do *Bacillus circulans*, atingindo as larvas jovens do nematóide em questão (L1 2 L2) , pois essas ainda se alimentam, e ao ingerirem a toxina,acabam morrendo.

A proposta do trabalho está fundamentada na limpeza dos campos uma vez que ataca larvas jovens e essas se encontram fora do seu hospedeiro, nas pastagens. Isso reduziria ao número de formas infectantes do parasito, não havendo o fechamento do seu ciclo biológico.

Os resultados mostram também que esse tipo de biocontrole pode ser viável para coadjuvar ou até substituir o emprego dos fármacos tradicionais no controle da hemoncose.

Há ainda a necessidade de uma pesquisa detalhada das nematotoxinas em questão para obter maior especificidade de ação. Também é preciso avaliar o impacto ambiental que a liberação dessas substâncias trará para o ecossistema em que for empregado.

5. Referências Bibliográficas

BLUTHGEN, A and HEESCHEN, W. H.. Parasiticides. **International Dairy Feed**, v. 97, p. 35-44,1997.

CIORDIA, H., BIZZEL, W. E. A preliminary report on the effects of *Bacillus thuringiensis var. thuringiensis* BERLINER on the development of the free-living stages of some cattle nematodes. **Journal of Parasitology**, v.47, (abstract), p. 41. 1961.

O'GRADY, R.J. AKHURST, A.C. KOTZE The requirement for early exposure of *Haemonchus contortus* larvae to *Bacillus thuringiensis* for effective inhibition of larval development **Veterinary Parasitology** (2007)

ROBERTS, F. H. S. and O'SULLIVAN, J. P. Methods for eggs counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Agriculture Records**.,v.1, p. 99-102, 1950.

RODRIGUES, I.B., TADEI, W.P., DIAS, J.M.C.S. Studies on the *Bacillus sphaericus* larvicidal activity against malaria vector species in Amazonia. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.93, p. 441-444, 1988.

SCHNEPF, E., CRICKMORE, N., VAN RIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J., FEITELSON, J., ZEIGLER, D.R., DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and Its Crystal Proteins. **Microbiology and Molecular Biology Review** , v.62, p. 775-806, 1998.