

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
COMPORTAMENTO E BIOLOGIA ANIMAL

FERNANDA KARINA DE JESUS

EFEITO DA UMIDADE DO SUBSTRATO NA SOBREVIVÊNCIA E NA  
INFECTIVIDADE DE JUVENIS DE VIDA LIVRE DE *Heterorhabditis amazonensis*  
(NEMATODA, HETERORHABDITIDAE)

retalhos em imensa colcha....

Juiz de Fora  
2009

FERNANDA KARINA DE JESUS

EFEITO DA UMIDADE DO SUBSTRATO NA SOBREVIVÊNCIA E NA  
INFECTIVIDADE DE JUVENIS DE VIDA LIVRE DE *Heterorhabditis amazonensis*  
(NEMATODA, HETERORHABDITIDAE)

retalhos em imensa colcha...

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Comportamento e Biologia Animal).

Orientador: Dr. John Furlong.

Juiz de Fora  
2009

Jesus, Fernanda Karina.

Efeito da umidade do substrato na sobrevivência e na infectividade de juvenis de vida livre de *Heterorhabditis amazonensis* (Nematoda, Heterorhabditidae) / Fernanda Karina de Jesus. -- 2009.

42 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2009.

1. Nematóides. 2. Biologia.

CDU 631.467

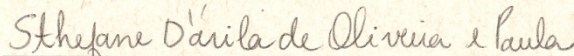
EFEITO DA UMIDADE DO SUBSTRATO NA SOBREVIVÊNCIA E NA  
INFECTIVIDADE DE JUVENIS DE VIDA LIVRE DE *Heterorhabditis amazonensis*  
(NEMATODA, HETERORHABDITIDAE)

retalhos em imensa colcha...

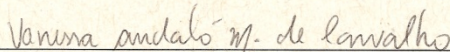
FERNANDA KARINA DE JESUS  
Orientador: Prof. Dr. JOHN FURLONG

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Ciências Biológicas, da Universidade  
Federal de Juiz de Fora, como parte dos  
requisitos para obtenção do Título de  
Mestre em Ciências Biológicas (Área de  
Concentração em Comportamento e  
Biologia Animal).

Aprovada em 19 de fevereiro de 2009.



Profª Dra. Stefane D'ávila de Oliveira e Paula  
Universidade Federal de Juiz de Fora



Profª Dra. Vanessa Andaló Mendes de Carvalho  
Universidade Federal de Lavras



Prof. Dr. John Furlong  
EMBRAPA Gado de Leite Juiz de Fora, MG

À Família que tanto Amo,  
base de minha formação e aprendizado....

AGRADECIMENTOS  
e Reflexão.....

A cada etapa da vida,  
dúvidas e dificuldades  
quedas e arranhões,  
permeiam o caminhar.  
Turbilhões de pensamentos invadem o pensar  
e convidam à refletir e à mudar  
Impulsionam o crescer  
Muito além da ciência, muito além da matéria  
Nessa infinita busca do Aprender....

Aos inomináveis e Amáveis Amigos  
Sempre a encorajar e a mostrar o além das pequenas e transitórias coisas,  
Luz em meu caminhar, amparo em meu crescer. Carinhosa Gratidão.

Aos que auxiliaram palpitando, emprestando material ou ajudando a encontrar artigos escondidos em arquivos por aí.

À CAPES pela bolsa concedida e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Comportamento e Biologia Animal, sobretudo na pessoa do coordenador, pelo apoio.

Ao orientador, pelo auxílio e pela oportunidade a gerar aprendizados.

À professora e constantes orientações! Amizade e auxílio.

Ao convívio com colegas de cá e de acolá. Através do outro enxergamos nós mesmos, e a partir das diferenças, reforçamos valores e sentimentos e nos fortalecemos.

Aos que, gentilmente, aceitaram ler “bagunscritos” e, com gentil atenção, ao ceder parte de seu tempo, cederam experiências e valiosas colaborações.

Á carinhosa ajuda de uma pessoa especial, em cuja companhia a caminhada tornou-se mais leve, as dificuldades menores e as conquistas mais doces.

Enfim, às diversas e variadas mãos, ouvidos e olhos

Que teceram colaborações, ouviram lamentações e ajudaram a visualizar soluções.

## RESUMO

O encantamento e o interesse pela biologia da fase juvenil de vida livre de nematóides parasitos motivaram a realização desses estudos. Nematóides entomopatogênicos (NEPs) possuem em seu ciclo de vida tal fase juvenil, semelhante à existente em outros grupos de nematóides parasitos e que difere desses principalmente por possuir simbiose com bactérias. Esses juvenis (JIs) possuem capacidade infectante e de sua sobrevivência, encontro e infecção de novos hospedeiros no ambiente depende a continuidade do ciclo de vida. Porém, há pouca compreensão acerca da interação entre os JIs e as variações nas características do solo, dentre as quais a umidade se destaca pela importância na biologia desses animais. Nesse contexto, objetivou-se estudar a influência da umidade do substrato na sobrevivência e manutenção da infectividade de JIs de *Heterorhabditis amazonensis* Andaló, Nguyen & Moino Jr, 2006, espécie nativa do Brasil. Tal influência foi avaliada em dois estudos independentes. No primeiro, comparou-se, ao longo de 30 dias, a quantidade de JIs vivos recuperados em amostras de terra em dois grupos, um exposto à dessecação através da perda de água por evaporação natural, partindo-se da umidade inicial de 80%, “grupo evaporação” e outro, com umidade constante de 80% ao longo de todo experimento, “grupo controle”. Dentre o observado, destacam-se (1) a conservação da infectividade em todos os JIs recuperados; (2) a acentuada mortalidade nos três primeiros dias em ambos os tratamentos; (3) o fato dessa maior mortalidade ter ocorrido em condições úmidas de substrato e (4) a conservação da umidade no grupo controle ao longo do experimento não refletiu em vantagem significativa para a sobrevivência dos juvenis desse grupo. No segundo estudo, foi realizada uma comparação da quantidade de JIs recuperados ao longo de 30 dias entre três grupos com condições constantes diferentes de umidade do substrato, 100, 75 e 30%. Destacam-se entre os resultados (1) a conservação da infectividade em todos os JIs recuperados, (2) a rápida mortalidade nos três primeiros dias de observação e (3) o fato da condição mais seca do substrato, umidade 30%, ter sido mais favorável à sobrevivência dos JIs. Em ambos os estudos, as umidades utilizadas referem-se a percentagens em relação à umidade de saturação; o substrato utilizado foi previamente esterilizado e completamente seco; as amostras de terra foram mantidas a 25°C, UR90%; testou-se a infectividade dos JIs em larvas do besouro *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1785 e, com base na literatura, foi desenvolvida a técnica utilizada para recuperação dos juvenis. Os resultados encontrados permitiram inferir que condições secas em substrato de granulometria fina são favoráveis à sobrevivência dos JIs, a

acentuada mortalidade nos primeiros três dias parece ser uma característica da espécie e independente da umidade, a compreensão da interferência da umidade sobre a biologia de JIs depende do estudo de sua interação com os demais fatores ambientais presentes no solo e é variável de acordo com a condição resultante dessa interação, de tal forma que a umidade favorável à biologia desses animais varie na razão com que influencie e seja influenciada pelas demais características ambientais disponíveis.

Palavras-chave: Biologia. Ciclo de vida. Juvenis infectantes. Nematóides entomopatogênicos. Umidade.



## ABSTRACT

The present study was motivated by the fascination and interest regarding the biology of the juvenile phase of parasitic nematodes. The juvenile stages of entomopathogenic nematodes (EPNs) are very similar to those of other groups of parasitic nematodes, except for the occurrence of symbiosis between their larvae and bacteria. These juveniles have infective capacity and the continuity of their life cycle depends on surviving at the external environment, finding and infecting new hosts. However, little is known about the interaction of infective juveniles (IJs) of these nematodes and the soil characteristics, among which moisture content stands out for its strong influence on the biology of these animals. Therefore, the aim of this work was to investigate the influence of soil moisture on the survival and persistence of infectivity of IJs of *Heterorhabditis amazonensis* Andaló, Nguyen & Moino Jr, 2006, a native Brazilian specie. This influence was evaluated in two independent studies. The first experiment aimed to compare the number of living IJs recovered from soil samples of two experimental groups. The evaporation group was subjected to natural evaporation after an initial moisture content of 80% and the control group was maintained at constant moisture level of 80%. Among the results were: (1) the continuing infectivity of all the IJs recovered; (2) the high mortality in the first three days in both groups; (3) this high mortality occurred under moist substrate conditions and (4) the fact that the conservation of moisture in the control group during the experiment was not reflected in a significant advantage for the survival of the juveniles in this group. In the second study, the same comparison was made during 30 days for IJs in constant substrate moisture conditions of 100, 75 and 30%. The most notable results were: (1) the persistence of infectivity in all the IJs; (2) the rapid mortality in the first three days of observation, of 88, 79 and 59%, respectively; and (3) the fact that the driest soil condition, of 30%, was most favorable for the survival of the IJs, with significantly higher numbers until the 30<sup>th</sup> day of observation. In both studies, the humidity levels refer to the percentages in relation to the saturation point, and the substrate used was previously sterilized and completely dried and the soil samples were maintained at 25 °C, 90% RH. The infectivity of the larvae recovered at both experiments was tested in larvae of the beetle *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1785. The technique to recover the juveniles was developed based on the literature. The results permit inferring that dry conditions and fine granulometry of soil

are favorable to the survival of IJs of this specie of EPN and the high mortality in the first three days appears to be a characteristic of this specie and does not depend on the substrate's moisture content. Finally, several scenarios may come out from the dynamic interaction between the moisture and other soil conditions. The relative importance of moisture to the biology of these animals possibly will vary at each resulting scenario.

Key-words: Biology. Cycle of life. Entomopathogenic nematodes Infective juveniles. Moisture

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Variação na quantidade de juvenis de vida livre sobreviventes de *Heterorhabditis amazonensis* recuperados ao longo de 30 dias em amostras de terra mantidas sob efeito de dessecação por evaporação natural da água, grupo evaporação, ou sob umidade constante de 80% em relação à saturação, grupo controle, mantidas a 25°C, UR 90%, em câmara climatizada.....23

GRÁFICO 2 - Variação na quantidade de juvenis de vida livre sobreviventes de *Heterorhabditis amazonensis* recuperados em amostras de terra em três diferentes condições de umidade, 100, 75 e 30%, em relação à saturação, ao longo de 30 dias, mantidas a 25°C, UR90%, em câmara climatizada.....33

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Perda de água e variação na umidade do substrato em amostras de terra contendo juvenis de vida livre de *Heterorhabditis amazonensis* expostas à ação de evaporação natural ao longo de 30 dias mantidas a 25°C, UR 90% em câmara climatizada.....21

TABELA 2 - Relação do percentual e média de juvenis de vida livre sobreviventes de *Heterorhabditis amazonensis* recuperados ao longo de 30 dias em amostras de terra mantidas sob efeito de dessecação por evaporação natural da água, grupo evaporação, ou sob umidade constante de 80% em relação à saturação, grupo controle, mantidas a 25°C, UR 90% em câmara climatizada.....22

TABELA 3 - Relação do percentual e média de juvenis de vida livre sobreviventes de *Heterorhabditis amazonensis* recuperados ao longo de 30 dias em amostras de terra em três umidades, 100, 75 e 30%, em relação à umidade de saturação, mantidas a 25°C, UR 90% em câmara climatizada.....32

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>12</b>
<b>2 EFEITO DA DESSECAÇÃO NATURAL DO SUBSTRATO NA SOBREVIVÊNCIA E NA INFECTIVIDADE DE JUVENIS DE VIDA LIVRE DE <i>Heterorhabditis amazonensis</i> (NEMATODA, HETERORHABDITIDAE) .....</b>	<b>17</b>
<b>3 EFEITO DA UMIDADE DO SUBSTRATO NA SOBREVIVÊNCIA E NA INFECTIVIDADE DE JUVENIS DE VIDA LIVRE DE <i>Heterorhabditis amazonensis</i> (NEMATODA, HETERORHABDITIDAE).....</b>	<b>28</b>
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>37</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>38</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>41</b>

## 1- INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A motivação para a busca e delimitação desse estudo nasceu de antigo interesse e encantamento pela biologia de juvenis de vida livre de nematóides parasitos e a curiosidade em tentar entender como essa fase do ciclo de vida se comporta no meio ambiente e reage às variações ambientais, tais como luminosidade e umidade.

Tentando dosar curiosidade e trabalho prático, dentro das possibilidades disponíveis, intentou-se estudar aspectos da ecologia comportamental de juvenis de vida livre de *Heterorhabditis amazonensis* Andaló, Nguyen & Moino Jr, 2006 (Rhabditida:Heterorhabditidae). Das diversas tentativas frustradas e dentre alguns estudos realizados, dois serão aqui relatados.

Referem-se ao estudo da influência da umidade do substrato na sobrevivência e manutenção da infectividade de juvenis de vida livre de *H. amazonensis*. Tal influência foi avaliada de duas formas, na primeira os juvenis foram expostos à variação de umidade decorrente de dessecação natural do substrato e, na segunda, foi realizada uma comparação entre três condições constantes diferentes de umidade do substrato.

Tais estudos, em relação ao tanto já existente e, sobretudo, em relação à imensidão do porvir, são como pequeninos retalhos imersos na composição de imensa e interminável colcha, frouxamente alinhavada, livre ao rearranjo de seus retalhos e ao acréscimo de mais alinhavos.

A breve revisão que se segue tem o simples intuito de situar o assunto estudado e delinear um pouco do que se tem realizado e conhecido na área. Mostrar alguns dos inúmeros retalhos previamente incorporados a essa colcha.

E os singelos estudos aqui apresentados, mais do que responder ou colaborar para a compreensão da ecologia comportamental de juvenis de vida livre frente às variações de umidade do solo, vislumbram suscitar idéias para novas buscas, novas curiosidades, para o surgimento de novos retalhos...

Uma breve sinopse sobre o contexto histórico...

O primeiro relato de associação entre nematóides e insetos data do século XVI, referido como “vermes emergindo de gafanhotos”. Durante o século XVIII, sobretudo pelo impulso causado pelo uso do microscópio, estudos e observações acerca de tal associação foram sendo ampliados. E foi no início do século XX, em 1923, que a primeira espécie de nematóide entomopatogênico, *Steinernema kraussei* (Steiner, 1923) (= *Aplectana kraussei*), foi isolada e descrita (STOCK, 2005).

Porém, foi a partir de 1930 que nematóides entomopatogênicos (NEPs) das famílias Steinernematidae (Chitwood & Chitwood, 1937) e Heterorhabditidae (Poinar, 1976) passaram a ser mais estudados, após trabalho de Glaser e Fox infectando larvas de baratas japonesas com *Steinernema glaseri* (Steiner, 1929) a partir de cultivo *in vitro* e uso em campo (SMART JR, 1995).

No Brasil, a primeira espécie de NEPs descrita ocorreu em 1937, *Heterorhabditis hambletoni* (Pereira, 1937) (= *Rhabditis hambletoni*), e foi o primeiro relato da presença desses animais na América do Sul (STOCK, 2005). Mais recentemente, podem-se citar outras duas espécies que foram descobertas e descritas no país, *Heterorhabditis baujardi* Phan, Subbotin, Nguyen e Moens, 2003 e *H. amazonensis*.

Nas últimas décadas, o acentuado impacto negativo gerado pelo uso descontrolado e exagerado de bases químicas, tem motivado a busca por alternativas para o controle das chamadas “pragas agrícolas”. Dentre essas alternativas tem-se destacado o controle biológico (NEVES et al., 1999; SAMISH, 2000).

Dentro desse contexto, os NEPs passaram a ser vistos com grande interesse comercial, já que estudos têm demonstrado grande eficácia desses animais contra variados grupos de artrópodos (HAZIR et al., 2003; LEWIS et al., 2006; MARTIN JR., 1997; SAMISH, 2000; SAMISH et al., 2001; SAMISH; REHACEK, 1999; VASCONCELOS et al., 2004). Tal fato é responsável pelo crescimento exponencial de publicações relacionadas a esse grupo após a década de 90 (STOCK, 2005).

Porém, a imensa maioria dos trabalhos publicados com NEPs é focada em sua atuação patogênica sobre os hospedeiros, assim, embora ofereçam respostas sobre o potencial desses animais como controladores biológicos, não provêm informações sobre sua biologia básica, ademais sobre seu comportamento e ecologia, sobretudo diante das adversidades do meio. Tais informações seriam essenciais para viabilizar sua utilização.

A pouca compreensão acerca da ação dos fatores ambientais sobre os juvenis de vida livre no solo e a importância desse entendimento para o uso racional e o sucesso dos NEPs

como biocontroladores são questões relevantes e recorrentes na literatura (a citar KUNG et al., 1990; LEWIS et al., 2006; SHAPIRO-IAN et al., 2002; STOCK, 2005).

A problemática atual com relação à viabilização prática dos NEPs como agentes de biocontrole tem motivado o interesse por maior compreensão acerca da biologia desses animais, sobretudo da sua fase de vida livre, o juvenil infectante.

Um olhar sobre a biologia....

Os gêneros *Steinernema* Travassos, 1927 e *Heterorhabditis* Poinar, 1976 teriam origens independentes há 375 milhões de anos, durante o Paleozóico. O ancestral de *Steinernema* spp. seria terrestre enquanto o de *Heterorhabditis* spp. da areia de ambiente marinho, segundo trabalhos de POINAR 1983 e 1993 citados na revisão de ADAMS e NGUYEN (2001).

O ciclo de vida desses animais inclui um estágio juvenil de vida livre, o qual possui mobilidade e não se alimenta, distinguindo-se pela presença de cutícula adicional, retida do segundo estágio juvenil, que lhe confere aumento de resistência contra variações ambientais, tais como dessecação, traumas mecânicos e altas temperaturas (HAZIR et al., 2003). Tal estágio é comumente referido na literatura como “fase ou larva dauer” (do inglês *enduring* ou *non aging*) e é a fase infectante do ciclo (GREWAL et al., 2002).

Os juvenis infectantes (JIs) de NEPs diferenciam-se das demais espécies de nematóides parasitos por apresentarem simbiose com bactérias dos gêneros *Xenorhabdus*, em Steinernematidae e *Photorhabdus*, em Heterorhabditidae e tais bactérias são as responsáveis pela morte rápida, 24 a 48 horas, dos hospedeiros por septicemia (LEWIS et al. 2006). Em tal associação mutuamente benéfica os nematóides disponibilizam proteção contra o ambiente externo, penetração na hemocele e inibição das proteínas antibacterianas liberadas pelo hospedeiro. Já as bactérias matam rapidamente o hospedeiro, inibem a ação de outros microorganismos e transformam tecidos do hospedeiro em alimento disponível (HAZIR et al., 2003).

O desenvolvimento dos NEPs envolve três fases, ovo, juvenil e adulto, sendo que a fase juvenil compreende quatro estágios, dos quais o terceiro inclui o infectante. Após infectar o hospedeiro, o juvenil alcança a hemocele e libera a bactéria simbiote. A proliferação bacteriana somada à decomposição dos tecidos do hospedeiro disponibilizam alimento para o crescimento e multiplicação dos nematóides que podem ter, em média, 2 a 3 gerações. Com a escassez do alimento, cessa a multiplicação e novos JIs emergem do hospedeiro para o ambiente (MARTIN JR, 1997).



A família Heterorhabditidae distingue-se, principalmente, pelo fato de seus juvenis infectantes possuírem um dente quitinoso na região anterior do corpo, o que possibilita a penetração no hospedeiro através da cutícula, além das vias através da boca, espiráculo e ânus. Além disso, essa família se diferencia por apresentar, na primeira geração, adultos hermafroditas e capazes de autofecundação (ADAMS e NGUYEN, 2001).

Com relação a essa família é interessante destacar que a presença de uma geração hermafrodita pode ser uma vantagem reprodutiva, uma vez que um único juvenil pode ser capaz de dar continuidade ao ciclo, não havendo necessidade de busca e encontro de parceiros (HAZIR et al., 2003). Por outro lado, a alta taxa endogâmica, consequência dessa característica, tem sido relacionada à diminuição da variabilidade genética e ao surgimento de diferenças gênicas significativas nas espécies desse grupo. Características importantes como a longevidade e a capacidade em tolerar estresse ambiental dos JIs, têm apresentado forte diferença entre populações de uma mesma espécie isolada em regiões geográficas próximas umas das outras (GREWAL et al., 2002).

Pertencente a essa família, pode-se destacar *H. amazonensis* por ser espécie nativa do Brasil, isolada em região de floresta no norte do Amazonas, cujo hospedeiro natural ainda não é conhecido. O JI dessa espécie tem tamanho corporal entre 567 e 612  $\mu\text{m}$  (ANDALÓ et al., 2006).

Ainda não há informações publicadas sobre *H. amazonensis*, embora se saiba que trabalhos estão sendo desenvolvidos sobre essa espécie. Da mesma forma, tampouco se encontram disponíveis informações acerca da descrição da localidade onde a espécie foi isolada, tais como as características físico-químicas do solo.

Estudos acerca da biologia dos NEPs ainda são incipientes, sobretudo no que tange à ecologia e ao comportamento. Os insucessos obtidos em algumas das tentativas de aplicação prática desses animais como biocontroladores e a pouca persistência que têm demonstrado no solo, têm, recentemente, despertado a atenção para a importância de estudos que visem a busca pelo entendimento sobre os fatores que governam a ocorrência natural e a atividade dos JIs no solo (ALEKSEEV et al., 2006; BARBERCHECK;DUNCAN, 2004; LEWIS et al., 2006; WILSON;GAUGLER, 2004).

#### Considerações sobre a ecologia...

A similaridade do estágio juvenil dos NEPs com o de outros grupos de nematóides parasitos, aliado às facilidades de criação e manutenção desses animais e ao grande número de espécies, o que facilita estudos comparativos, faz desses animais bons modelos para o estudo

da biologia parasitária (LEWIS et al., 2006; STOCK, 2005), sobretudo para a compreensão da ecologia comportamental de juvenis de vida livre.

A ecologia comportamental da fase de vida livre de nematóides parasitos é influenciada pela interação de diversos fatores ambientais os quais afetam a dinâmica populacional desses animais e podem delimitar a distribuição local e global dos parasitos e das doenças causadas por eles (BUSH et al., 2001). Porém, compreender de que forma essas variáveis ambientais interferem em parâmetros como a sobrevivência, a migração e a capacidade infectante desses animais ainda é um desafio a ser superado.

Dentre esses fatores a umidade do solo é frequentemente ressaltada como o fator mais importante sobre a biologia desses animais (KUNG et al., 1990; PUZA;MRACEK, 2005) e, embora venha sendo alvo de estudos (ALEKSEEV et al., 2006; BHATNAGAR;BARETH, 2003; GLAZER et al., 2001; HAZIR et al., 2003; WALLACE, 1958), a pouca compreensão acerca da ação dessa variável sobre a fase de vida livre de NEPs ainda é uma realidade destacada na literatura. Além disso, a enorme quantidade de espécies existentes exige estudos específicos, dadas as variações intrínsecas na biologia de cada espécie.

O estudo sobre diferenças na sensibilidade, tolerância e resposta comportamental dos NEPs às variações ambientais no solo, como a umidade, além de ser fundamental para o conhecimento da biologia básica desses animais, disponibiliza respostas para ações práticas como prever efeitos de mudanças climáticas sobre populações de parasitos e realizar atividades de manejo (ADAMS;NGUYEN, 2001), bases necessárias se pretende-se viabilizar o uso eficaz de NEPs como agentes de controle biológico (KUNG et al., 1990; SHAPIRO-IIAN et al., 2002; WILSON;GAUGLER, 2004).

Dessa forma, ampliar o entendimento sobre aspectos da biologia de juvenis de vida livre é de fundamental necessidade, não apenas para disponibilizar bases para aplicações práticas desses potenciais biocontroladores no ambiente através de um manejo racional e harmônico, mas, sobretudo, devida a importância intrínseca do conhecimento acerca da biologia desses animais. Nesse sentido, tentando colaborar para a construção desse entendimento desenvolveram-se os estudos aqui apresentados acerca da ação da umidade do substrato na sobrevivência e conservação da infectividade de juvenis de vida livre de *H. amazonensis*.

A ação da umidade foi avaliada, no capítulo 1, em substrato exposto a dessecação por evaporação natural da água e, no capítulo 2, três diferentes condições de umidade, 100, 75 e 30%, em relação à saturação, foram estudadas. Ambos ao longo de 30 dias, mantidas a 25°C, UR90% em câmara climatizada.

## **2 - EFEITO DA DESSECAÇÃO NATURAL DO SUBSTRATO NA SOBREVIVÊNCIA E NA INFECTIVIDADE DE JUVENIS DE VIDA LIVRE DE *Heterorhabditis amazonensis* (NEMATODA, HETERORHABDITIDAE)**

Nematóides entomopatogênicos (NEPs) possuem em seu ciclo de vida um estágio juvenil infectante de vida livre (JI), o qual possui mobilidade e não se alimenta, distinguindo-se pela presença de cutícula adicional que lhe confere aumento de resistência contra variações ambientais (HAZIR et al., 2003). Tal estágio está presente no ciclo de variados grupos de nematóides parasitos e é comumente referido na literatura como “fase ou larva dauer”, (do inglês *enduring* ou *non aging*) cuja longevidade está associada à capacidade de tolerar estresse ambiental (GREWAL et al., 2002).

Devido à similaridade desse estágio juvenil dos NEPs com o de outros grupos de nematóides parasitos, aliado às facilidades de criação e manutenção desses animais em condições de laboratório, esse grupo pode ser considerado bom modelo para o estudo da biologia parasitária (LEWIS et al., 2006), sobretudo para a compreensão de aspectos da biologia de juvenis de vida livre.

Porém, juvenis de NEPs, das famílias Heterorhabditidae Poinar, 1976 e Steinernematidae Chitwood & Chitwood, 1937, diferenciam-se das demais espécies de nematóides parasitos especialmente por apresentarem simbiose com bactéria, a qual é a responsável pela morte do hospedeiro (SMART JR, 1995). Além disso, esses nematóides são considerados potenciais agentes para o controle biológico de diversos artrópodos (HAZIR et al., 2003; MARTIN JR., 1997) o que tem despertado grande interesse para o estudo desses animais.

*Heterorhabditis amazonensis* Andaló, Nguyen & Moino Jr, 2006 (Rhabditida:Heterorhabditidae), é espécie nativa do Brasil, isolada em região de floresta no norte do Amazonas (ANDALÓ et al., 2006). Informações acerca das características ambientais do local onde a espécie foi isolada, como as características físico-químicas do solo, não estão disponíveis. Além disso, embora se saiba que a espécie venha sendo alvo de estudos, ainda não há publicações referentes a ela além de sua descrição.

A ecologia comportamental da fase de vida livre de nematóides parasitos é influenciada pela interação de diversos fatores ambientais os quais afetam a dinâmica populacional desses animais e podem delimitar a distribuição local e global dos parasitos e das doenças causadas por eles (BUSH et al., 2001).

Dentre esses fatores, a umidade do solo é frequentemente relatada como o fator mais importante sobre a biologia desses animais (KUNG et al.,1990; PUZA & MRACEK, 2005; WALLACE, 1958). Porém, ainda que relevante, o conhecimento acerca da ação da umidade sobre a biologia de juvenis de vida livre ainda é pouco compreendida (KUNG et al., 1990; LEWIS et al., 2006; PUZA;MRACEK, 2005).

Especificamente dentre os NEPs, a maior parte dos trabalhos referentes a esse grupo está focada em sua ação patogênica sobre os hospedeiros (LEWIS et al., 2006; STOCK, 2005) dessa forma, se respondem sobre o potencial desses organismos como biocontroladores, pouco ou nada informam sobre aspectos de sua biologia.

Nesse sentido, há carência de estudos que visem colaborar para o conhecimento da biologia básica desses animais, tão fundamental para a compreensão e elucidação da relação e interação desses animais frente aos fatores ambientais no solo.

Dessa forma, na tentativa de colaborar para a elucidação da influência da umidade do solo sobre juvenis de vida livre, esse trabalho objetivou estudar a ação da variação da umidade do substrato, através da perda de água por evaporação natural, sobre a longevidade e conservação da infectividade de juvenis de *H. amazonensis*.

## MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi desenvolvido nas dependências do prédio de Pós Graduação em Biologia e Comportamento Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora, no período entre agosto e outubro de 2008.

Avaliaram-se a sobrevivência e a conservação da infectividade de juvenis de *H. amazonensis* recuperados ao longo de 30 dias a partir de amostras de terra sob efeito de dessecação através de evaporação natural.

Foram utilizados JIs recém-emergidos decorrentes de multiplicação *in vivo* em larvas do besouro *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1785 (Coleoptera: Tenebrionidae). A multiplicação teve início a partir de JIs obtidos junto ao Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora, MG.

A criação de *T. molitor* foi realizada em condição ambiente, ao abrigo de luz intensa, em potes plásticos contendo estopa de algodão e cama formada por farelo de pão. Os animais foram mantidos com pão de farinha de trigo (“pão francês” ou “pão de sal”) e, ocasionalmente, rodela de chuchu (*Sechium edule*) foram colocadas por 1 ou 2 dias para manutenção da umidade.

A multiplicação dos nematóides foi realizada em placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo duas folhas de papel filtro umedecidas com 1,5 ml de água destilada contendo JIs de *H. amazonensis* e cerca de 10 larvas de *T. molitor*. As placas foram vedadas com filme PVC e mantidas a 25°C, UR90% por 72 horas. Após esse período as larvas mortas foram retiradas e mantidas em placas de Petri de 9 cm de diâmetro por cerca de 10 dias até serem colocadas em armadilhas para recuperação da próxima progênie de *H. amazonensis*. Tal armadilha consistiu em uma placa de Petri de 15 cm de diâmetro contendo em seu centro uma placa de Petri de 5 cm de diâmetro coberta com papel filtro e umedecida com cerca de 5ml de água destilada. Tais armadilhas ficaram vedadas com filme PVC, a 25°C, UR90% até emergência dos juvenis após cerca de 18 dias, desde a morte das larvas, quando foram coletados e utilizados no experimento. As técnicas descritas são modificações de WHITE, 1927.

Para o estudo, foram utilizados potes plásticos de 2,5 cm de diâmetro com capacidade para 30 ml, contendo 10 g de terra umedecida com seis mililitros de água destilada e adicionada de 1000 JIs diluídos em 0,18 ml de água destilada distribuída uniformemente na superfície da terra, com auxílio de uma seringa plástica com capacidade para 0,5 ml.

A terra utilizada foi obtida comercialmente\*, completamente seca por 72 horas em estufa à 120°C, tempo no qual não mais se observou variação de peso indicando estabilização na perda de água, e peneirada em malha de um milímetro. O pH foi aferido em phmômetro obtendo-se o valor de 5.9.

A quantidade de água utilizada corresponde a 80% da capacidade de saturação da terra nas condições do experimento, o que foi testado previamente. Tal teste foi realizado adicionando-se, gradualmente, água destilada nos potes com 10g de terra até fina película de água formar-se na superfície, indicativo de saturação do substrato. A partir da quantidade de água necessária para a saturação, umidade 100%, foi calculada, por proporção, a umidade referente a 80%.

Foram realizadas três repetições para cada dia de observação. Utilizou-se um grupo controle, cujos potes ficaram tampados e vedados com filme PVC para evitar a perda de água, conservando-se a condição úmida do solo. Os potes do grupo exposto à perda de água, chamado “grupo evaporação”, ficaram destampados. Ambos foram mantidos a 25°C, UR 90% em câmara climatizada.

---

\* Terra vegetal Boa Vista® - consiste em solo próximo à superfície, contém matéria orgânica em decomposição

Todos os potes, de ambos os grupos, tiveram sua massa aferida no dia 0, tida como massa inicial, e, novamente, no dia de observação. A diferença entre essas duas medidas foi atribuída à perda de água. As observações ocorreram nos dias 0, 3, 6, 9, 12, 20 e 30.

Para recuperação dos juvenis desenvolveu-se, em estudos preliminares e baseada nos princípios das técnicas de Baerman (descrita em UENO;GONÇALVES,1988) e DONALD, 1967, a seguinte técnica a qual se mostrou mais eficaz na recuperação do maior número de nematóides. A terra de cada pote foi colocada e envolvida em gaze de algodão com 8 dobras, cortada no tamanho 10x15 cm, amarrada com barbante e presa com esparadrapo em funis de plástico com capacidade para 250 ml, o qual foi completado com água aquecida à temperatura de 27°C até cobrir o fundo da gaze. Após 24 horas, toda água do funil foi transferida para cálice de sedimentação e nova água (2ª água) foi colocada nos funis, a qual passou pelo mesmo procedimento e análise da “1ª água”, descrita a seguir.

As amostras permaneceram nos cálices de sedimentação por 24 horas, após o que o sobrenadante foi descartado e cerca de 7 ml de sedimento mais 3 ml de água destilada utilizada para lavar o cálice foi transferido para tubos de vidro com capacidade de 10 ml, onde permaneceram por 12 horas em sedimentação. Depois desse período, descartou-se o sobrenadante até restar apenas 1 ml de sedimento a partir do qual, após homogeneização, efetuou-se a contagem dos juvenis através de alíquotas de 0,05 ml montadas em lâminas e analisadas em microscópio de campo claro. A quantidade de juvenis vivos encontrados para 0,05 ml foi extrapolada para 1 ml, cujo valor foi considerado o total de sobreviventes da amostra.

O total de juvenis recuperados, em cada dia de observação, foi obtido através da média entre as três repetições, sendo que o total de cada repetição corresponde ao somatório dos juvenis recuperados na 1ª e na 2ª água.

A infectividade dos juvenis recuperados foi testada utilizando-se larvas de *T. molitor*. Em cada grupo, controle e evaporação, os juvenis recuperados em cada uma das três repetições foram homogeneizados e utilizados na proporção aproximada de 200 juvenis para cada larva de *T. molitor* com cerca de 0,14g, proporção baseada em experiência prévia. A aplicação se deu individualmente em placas de Petri de 5 cm de diâmetro contendo duas folhas de papel filtro umedecidas com 1ml de água destilada. A menor proporção utilizada para teste de infectividade foi de 80 juvenis para uma larva de aproximadamente 0,08 g.

A mortalidade foi observada após 72 horas de aplicação e as larvas mortas foram colocadas em armadilhas para observação da emergência dos juvenis, após cerca de 15 a 20 dias, para confirmação de infecção. Tais armadilhas foram feitas utilizando-se placa de Petri

de 5 cm de diâmetro em cujo centro colocou-se esparadrapo impermeável formando uma elevação sobre a qual depositou-se papel filtro cortado no diâmetro de 3cm para acomodação da larva morta. As larvas foram acomodadas individualmente, cada armadilha recebeu 4 ml de água destilada, foi tampada, vedada com filme PVC e mantida a 25°C, UR90% até emergência dos juvenis.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o teste de ANOVA, para dados paramétricos, seguido pelo teste de Tukey quando as diferenças foram significativas, e o teste de Mann-Whitney, para os não paramétricos, ambos segundo o Programa BioStat 5.0, versão disponível gratuitamente e com grau de liberdade de 0,05.

## RESULTADO

Não houve perda de água nas amostras do grupo controle ao longo de todo experimento. A perda de água e conseqüente variação na umidade do substrato, no grupo evaporação, estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Perda de água e variação na umidade do substrato em amostras de terra contendo juvenis de vida livre de *Heterorhabditis amazonensis* expostas à ação de evaporação natural ao longo de 30 dias mantidas a 25°C, UR 90% em câmara climatizada

Dia	0	3	6	9	12	20	30
Perda água - ml	-	1	2	3	4	5	5
Umidade terra - %*	80	67	53	40	27	13	13

\*Em relação à umidade de saturação, 100%

A quantidade recuperada de JIs no dia “0” foi considerada como o total existente nas amostras e as percentagens de recuperação dos demais dias de observação foram calculadas a partir desse valor. Dos cerca de 1000 juvenis que se calculou estarem presentes nas alíquotas adicionadas às amostras, atingiu-se uma recuperação mínima acima de 80% e sem diferença significativa entre os tratamentos, o que denota boas eficácia e sensibilidade da técnica utilizada para recuperação dos juvenis.

Ainda com relação à técnica utilizada, observou-se que a maioria, em torno de 90% ou mais, da recuperação dos juvenis vivos ocorreu nas primeiras 24 horas, ou seja, na “1ª água” utilizada.

Os testes de infectividade realizados foram 100% eficazes, ou seja, todas as larvas de *T. molitor* foram mortas com liberação de nova progênie, indicando a conservação da infectividade dos juvenis recuperados ao longo de todo experimento.

A quantidade média de juvenis recuperados em cada dia de observação, bem como seu percentual em relação ao dia “0” e o desvio-padrão correspondente podem ser visualizados na Tabela 2.

Tabela 2: Relação do percentual e média de juvenis de vida livre sobreviventes de *Heterorhabditis amazonensis* recuperados ao longo de 30 dias em amostras de terra mantidas sob efeito de dessecação por evaporação natural da água, grupo evaporação, ou sob umidade constante de 80% em relação à saturação, grupo controle, mantidas a 25°C, UR 90% em câmara climatizada.

Grupos		Dias de observação						
		0	3	6	9	12	20	30
Evaporação	%	100	20.4	2.1	0	0	0	0
	M	933,33 a	190,00 b	20,00 c	0 d	0	0	0
	DP	(±115,47)	(±26,46)	(±34,64)	(±0)			
Controle	%	100	25	8.9	3.1	0	0	0
	M	866,67 a	216,67 b	76,67 c	26,67 d	0	0	0
	DP	(±115,47)	(±15,28)	(±66,58)	(±46,19)			

M: média; DP: desvio padrão

Letras iguais nas mesmas colunas indicam valores equivalentes estatisticamente,  $p > 0,05$ .

Não houve diferença significativa das médias de juvenis recuperados nos dois tratamentos ao longo de todo experimento, dia 0 ( $F=0.5$ ,  $p=0.5220$ ); dia 3 ( $F=2.2857$ ,  $p=0.2045$ ); dia 6 ( $F=1.7151$ ,  $p=0.2609$ ); dia 9 ( $Z(U)= 0.6547$ ,  $p= 0.5127$ ). Não mais se recuperaram JIs vivos a partir do dia 9 no grupo evaporação e a partir do dia 12 no grupo controle.

A maior taxa de mortalidade dos juvenis de *H. amazonensis*, em ambos os grupos, ocorreu logo nos três primeiros dias, tendo sido de 80% no grupo evaporação e 75% no grupo controle. Período no qual a umidade mínima no grupo evaporação esteve próxima a 70%, conforme indicado na Tabela 1.



A variação do número de sobreviventes ao longo do experimento pode ser visualizada no Gráfico 1.

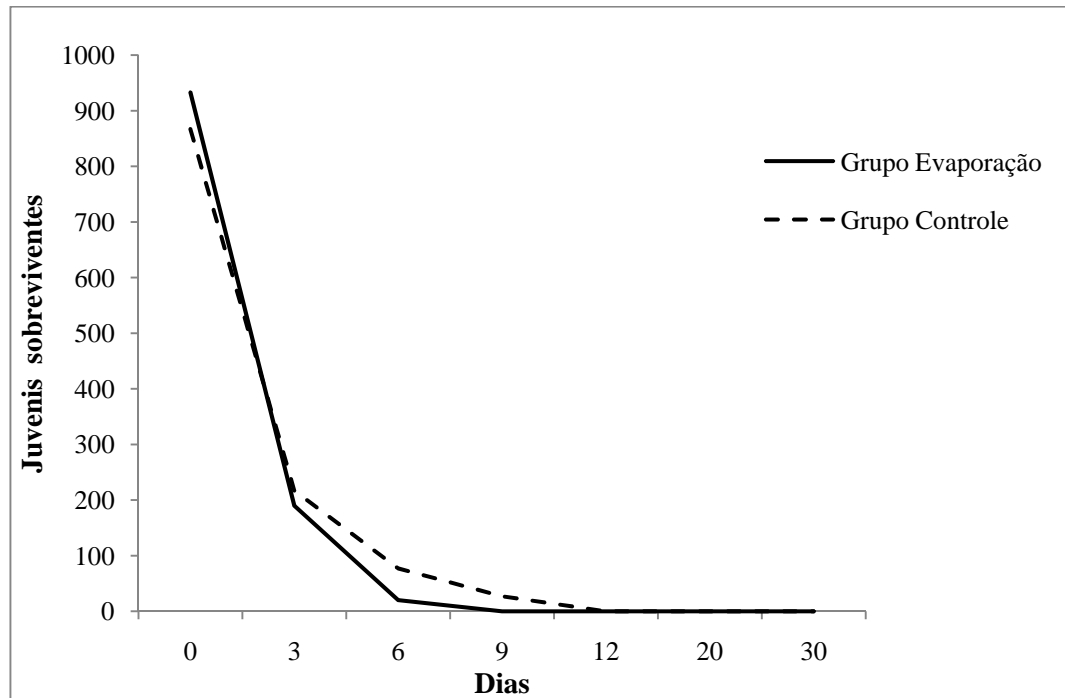


Gráfico 1: Variação na quantidade de juvenis de vida livre sobreviventes de *Heterorhabditis amazonensis* recuperados ao longo de 30 dias em amostras de terra mantidas sob efeito de dessecação por evaporação natural da água, grupo evaporação, ou sob umidade constante de 80% em relação à saturação, grupo controle, mantidas a 25°C, UR 90%, em câmara climatizada.

## DISCUSSÃO

A umidade do solo é frequentemente apontada como o fator ambiental mais determinante sobre a biologia de juvenis de vida livre de nematóides parasitos (KUNG et al., 1990; PUZA & MRACEK, 2005; WALLACE, 1958). Porém, a conservação da umidade do substrato, ao longo desse experimento, no grupo controle, em relação à dessecação observada no grupo evaporação, não refletiu em vantagem significativa para a sobrevivência dos juvenis do primeiro grupo.

Embora, numericamente, o grupo controle tenha apresentado uma quantidade pouco maior de juvenis sobreviventes, o que possibilita questionar se em um n-amostral superior isso teria significado estatisticamente, ainda assim, o resultado encontrado surpreende por demonstrar a baixa sobrevivência desses juvenis, inclusive no grupo controle, cuja umidade manteve-se em 80% ao longo do experimento.

Além disso, nos resultados encontrados, chama a atenção o fato dessa maior mortalidade ter ocorrido em condições úmidas de substrato, já que, mesmo no grupo evaporação, a umidade mínima no período foi próxima de 70%.

Tal observação sugere que a condição úmida do substrato ou foi prejudicial ou, ao menos, não foi suficiente para garantir a sobrevivência desses nematóides. Assim, ao tentar compreender a interferência exercida pela umidade podem-se buscar hipóteses acerca da interação dessa variável com outros fatores disponíveis no substrato e seu suposto resultado na sobrevivência dos JIs.

Dentre esses fatores, tem-se destacado na literatura aqueles vinculados à caracterização física do solo, tais como a textura e a porosidade, por exercerem papel fundamental sobre a biologia comportamental de juvenis de vida livre, uma vez que influenciam na aeração e drenagem do solo, o que interfere na sobrevivência, mobilidade e infectividade desses animais (BARBERCHECK;DUNCAN, 2004; WALLACE, 1958).

Nesse contexto, MOLYNEUX E BEDDING (1984), afirmaram que juvenis de NEPs podem se comportar de maneira diferente em um mesmo substrato de acordo com a umidade na qual se encontram, de tal forma que solos com baixa granulometria, como o que foi utilizado nesse estudo, só seriam favoráveis a esses juvenis se associados à baixa umidade.

A quantidade de oxigênio no solo varia significativamente de acordo com a textura e umidade (BARBERCHECK;DUNCAN, 2004). A caracterização do substrato utilizado nesse estudo, granulometria menor ou igual a 1 mm, textura fina, foi relatada por HAZIR e outros (2003) como negativa para a sobrevivência de juvenis, uma vez que o pequeno tamanho dos poros diminui a quantidade de oxigênio disponível.

Tal diminuição na oxigenação, nesse tipo de solo, seria agravada em condições com maior umidade (ALEKSEEV et al., 2006), já que a água ocuparia parte dos poros diminuindo mais a aeração. Nesse sentido, a umidade nesse estudo pode ter sido um fator negativo na medida em que sua interação com a textura do substrato utilizado disponibilizou uma condição de baixa oxigenação para os nematóides.

A importância da disponibilidade de oxigênio para a sobrevivência e atividade dos juvenis “dauer” pode ser explicada pelo fato desses animais obterem energia, principalmente, a partir da quebra de suas reservas lipídicas através de processos oxidativos (HASS et al., 2002). Em situações com baixa oxigenação, a obtenção de energia passa a ser realizada através da fermentação anaeróbica das reservas de carboidratos, porém, como essas ocorrem em menor quantidade e disponibilizam menos energia que as lipídicas, o tempo de sobrevivência é abreviado (KUNG et al., 1990). Dessa forma, a quantidade de oxigênio no solo

seria um fator regulador da quantidade de energia produzida para manutenção da sobrevivência e atividade dos nematóides.

As interações entre a umidade e diferentes propriedades físicas do solo alteram de forma diversificada o padrão comportamental de nematóides (WALLACE, 1958; WILSON; GAUGLER, 2004), de tal forma que averiguar a influência dessa variável na sobrevivência de juvenis de vida livre depende da compreensão da sua interação com os demais fatores ambientais disponíveis.

A suscetibilidade dos JIs de NEPs às condições disponíveis no solo depende da distribuição desses animais no solo, o que está intimamente relacionada ao tipo de comportamento de busca apresentado por esses nematóides (ALEKSEEV et al., 2006; HAZIR et al., 2003). Segundo LEWIS (2002), esse comportamento pode ser dividido em dois tipos, “ambusher” e “cruiser”, embora haja espécies com comportamentos intermediários. O primeiro, também conhecido por “senta e espera”, caracteriza-se por pouco ou nenhum deslocamento, onde o nematóide posiciona-se em local fixo sobre partícula de solo ou substrato e fica à espera do hospedeiro. Espécies com esse tipo de comportamento costumam concentrar-se na superfície do solo. Já o comportamento “cruiser”, caracteriza-se por busca ativa pelo hospedeiro, ampla movimentação e exploração do solo ou substrato e maior concentração abaixo da superfície. Devido a esses fatores, BARBERCHECK E DUNCAN (2004) relataram que espécies com comportamento “cruiser” seriam mais susceptíveis às limitações impostas pela caracterização física do solo.

Solos mais densos, como o substrato utilizado nesse estudo, podem, segundo ALEKSEEV e outros (2006), dificultar ou até impedir a locomoção dos nematóides devido ao pequeno tamanho das partículas (KUNG et al., 1990). Nesse estudo, a dificuldade de locomoção pode ter restringido os nematóides em algumas microregiões acentuando o efeito da baixa oxigenação pela competição, já que esses animais costumam ter comportamento agregado (PUZA;MRÁCEK, 2005).

Além disso, supondo-se que *H. amazonensis* apresente comportamento “cruiser”, já que tal característica é comum em espécies pertencentes ao gênero *Heterorhabditis* (LEWIS, 2002), poderia-se vislumbrar que a dificuldade de deslocamento imposta pela textura do substrato utilizado possa ter exigido maior gasto energético para locomoção e conseqüente depreciação das reservas energéticas mais rapidamente. Tal relação positiva entre reserva energética e longevidade na fase de vida livre de NEPs, conforme observado em trabalho de HASS e outros (2002), tem sido relatada

Ademais, a sobrevivência e tolerância de JIs de NEPs ao estresse ambiental variam enormemente entre as diversas espécies e, inclusive, entre populações de uma mesma espécie (KUNG et al., 1990; PUZA;MRACEK, 2005; SHANNON et al., 2005), sobretudo entre aquelas pertencentes ao gênero *Heterorhabditis* devido à facilidade de aparecimento de diferenças gênicas, favorecidas pela existência de uma geração hermafrodita (GREWAL et al., 2002). Dessa forma, o tempo de persistência no solo e a tolerância e/ou preferência por condições úmidas ou secas podem ser simples consequência da história natural específica de cada grupo.

Ainda considerando-se a história natural específica de cada grupo, é conveniente indagar se a breve sobrevivência no solo, verificada pela acentuada mortalidade nos primeiros três dias de permanência no substrato, não seria algo natural e esperado dentro do ciclo de vida de *H. amazonensis* e refletiria consequências da pressão seletiva sobre essa fase do ciclo de vida, de onde prossegue que o elevado número de juvenis liberados na progênie já seria uma resposta comportamental selecionada pelo grupo.

Indagações acerca da biologia e das relações ecológicas de *H. amazonensis* seriam mais bem esboçadas caso se conhecesse a caracterização física do solo e do ambiente onde a espécie foi isolada. No entanto, tais informações não estão publicadas e não se encontram disponíveis.

Vale citar que ao buscar-se por um substrato que pudesse ser utilizado nesse estudo, procurou-se escolher, dentro das opções que possibilitassem padronização e repetição, aquele que se aproximasse de situações possíveis de serem encontradas em campo. A terra utilizada, embora tenha sido peneirada, é similar a alguns tipos de solo cultiváveis e é comercializada para uso em cultivos ornamentais e pequenas hortas, atividades nas quais se poderiam almejar o uso de NEPs como biocontroladores.

Além disso, o pH do substrato utilizado, 5.9, é comum em solos agriculturáveis, que variam geralmente entre 5.1 e 6.5. Tal pH ácido é considerado na literatura como sendo bem tolerado e até propício a *Heterorhabditis* spp (KUNG et al., 1990; PRASAD et al., 2001; WRIGTH;PERRY, 2002). Sendo assim, nos estudos realizados, o pH foi fator favorável ou ao menos neutro na sobrevivência dos juvenis.

Sugere-se a necessidade de que outros estudos sejam realizados visando testar diferentes condições de umidade, afim de que uma possível preferência e/ou vantagens de condições mais secas, em substratos com a caracterização física ora estudada, sejam mais bem elucidadas.

O estudo desenvolvido pôde simular pequena fração dos diversos fatores envolvidos na sobrevivência dos JIs de vida livre no solo e, é importante ressaltar, que as indagações e

suposições levantadas pretendem apenas vislumbrar possibilidades para estudos futuros acerca da biologia e da ecologia comportamental desse grupo.

Assim, a partir do estudo realizado pôde-se perceber que a rápida mortalidade de JIs de *H. amazonensis* ocorreu em condições úmidas de substrato. Tal fato permite questionar a importância de condições úmidas para a sobrevivência desses nematóides e sugere-se que a interferência dessa variável na ecologia da fase de vida livre de NEPs dependa das interações com os demais fatores ambientais presentes no solo.

### **3 - EFEITO DA UMIDADE DO SUBSTRATO NA SOBREVIVÊNCIA E NA INFECTIVIDADE DE JUVENIS DE VIDA LIVRE DE *Heterorhabditis amazonensis* (NEMATODA, HETERORHABDITIDAE)**

A existência de um estágio juvenil de vida livre com capacidade infectante (JIs) é comum ao ciclo de vida de diversos grupos de nematóides parasitos, dentre eles os nematóides entomopatogênicos (NEPs). Tal estágio é caracterizado por possuir mobilidade e não se alimentar, distinguindo-se pela presença de cutícula adicional que lhe confere aumento de resistência contra variações ambientais, tais como dessecação (HAZIR et al., 2003).

Nos Neps, os JIs diferenciam-se principalmente por possuírem simbiose com bactéria, a qual causa a morte do hospedeiro, produz antibióticos contra ação de outros microorganismos e transforma os tecidos do hospedeiro em alimento disponível para os nematóides. Já esses disponibilizam proteção contra o ambiente externo, penetração na hemocele e inibição das proteínas antibacterianas liberadas pelo hospedeiro (FORST;CLARKE, 2002; HAZIR et al., 2003; LEWIS et al., 2006).

Dentre as espécies de NEPs até então conhecidas destaca-se *Heterorhabditis amazonensis* Andaló, Nguyen & Moino Jr, 2006 (Rhabditida:Heterorhabditidae), espécie nativa do Brasil isolada em região de floresta no norte do Amazonas (ANDALÓ et al., 2006). Embora se saiba que estudos estão sendo realizados acerca da espécie, as publicações ainda não foram disponibilizadas. Da mesma forma, informações acerca das características ambientais do local onde a espécie foi isolada, como as características físico-químicas do solo, também não estão disponíveis.

Conhecimentos a cerca da biologia de NEPs ainda são deficientes, sobretudo no que tange a compreensão da influência dos fatores ambientais do solo sobre a fase juvenil de vida livre (KUNG et al., 1990; SHAPIRO-IAN et al., 2002). Dentre esses fatores, a umidade pode ser destacada por sua elevada importância para a biologia desses animais (KUNG et al., 1990; PUZA;MRACEK, 2005), visto que a condição úmida está relacionada a questões básicas à sobrevivência e continuidade do ciclo infectivo, como o deslocamento e a absorção de oxigênio.

Embora venha sendo alvo de estudos (ALEKSEEV et al., 2006; BHATNAGAR;BARETH, 2003; GLAZER et al., 2001; HAZIR et al., 2003; WALLACE, 1958), a pouca compreensão acerca da ação da umidade sobre a fase de vida livre de NEPs ainda é uma realidade destacada na literatura. Além disso, a enorme quantidade de espécies existentes exige estudos específicos, dadas as variações intrínsecas na biologia de cada espécie.

Assim, esse estudo teve por objetivo averiguar a influência de três diferentes condições de umidade do substrato na sobrevivência e na infectividade de JIs de *H. amazonensis*, na tentativa de ajudar a elucidar a influência dessa variável ambiental sobre aspectos da biologia desse estágio de vida livre de nematóides entomopatogênicos.

## MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi desenvolvido nas dependências do prédio de Pós Graduação em Biologia e Comportamento Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora no período entre setembro e novembro de 2008.

Avaliaram-se a sobrevivência e a conservação da infectividade de juvenis de *H. amazonensis* recuperados ao longo de 30 dias a partir de amostras de terra em três diferentes umidades.

Utilizaram-se juvenis infectantes (JIs) recém-emergidos, decorrentes de multiplicação *in vivo* em larvas do besouro *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1785 (Insecta: Tenebrionidae). A multiplicação teve início a partir de JIs obtidos junto ao Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora, MG.

A criação de *T. molitor* foi realizada em condições ambiente, ao abrigo de luz intensa, em potes plásticos contendo estopa de algodão e cama formada por farelo de pão. Os animais foram mantidos com pão de farinha de trigo (“pão francês” ou “pão de sal”) e, ocasionalmente, rodela de chuchu (*Sechium edule*) foram colocadas por 1 ou 2 dias para manutenção da umidade.

A multiplicação dos nematóides foi realizada em placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo duas folhas de papel filtro umedecidas com 1,5 ml de água destilada contendo JIs de *H. amazonensis* e cerca de 10 larvas de *T. molitor*. As placas foram vedadas com filme PVC e mantidas a 25°C, UR90% por 72 horas. Após esse período as larvas mortas foram retiradas e mantidas em placas de Petri de 9 cm de diâmetro por cerca de 10 dias até serem colocadas em armadilhas para recuperação da próxima progênie de *H. amazonensis*. Tal armadilha consistiu em uma placa de Petri de 15 cm de diâmetro contendo em seu centro uma placa de Petri de 5 cm de diâmetro coberta com papel filtro e umedecida com cerca de 5ml de água destilada. Tais armadilhas ficaram vedadas com filme PVC, a 25°C, UR90% até emergência dos juvenis após cerca de 18 dias desde a morte das larvas, quando foram coletados e utilizados no experimento. As técnicas descritas são modificações de WHITE, 1927.

Para o estudo, foram utilizados potes plásticos de 2,5 cm de diâmetro com capacidade para 30 ml, contendo 10 g de terra umedecida com 6,6 ml, 4,95 ml ou 1,98 ml de água

destilada, correspondentes às umidades de 100, 75 e 30%, respectivamente, e adicionada de 1000 juvenis de *H. amazonensis* distribuídos uniformemente na superfície da terra com auxílio de uma seringa plástica com capacidade para 0,5 ml. A terra utilizada foi obtida comercialmente\*, completamente seca por 72 horas em estufa à 120°C, tempo no qual não mais se observou variação de peso indicando estabilização na perda de água, e peneirada em malha de um milímetro. O pH foi aferido em phmômetro obtendo-se o valor de 5.9.

As umidades do substrato utilizadas, 100%, 75% e 30%, correspondem a porcentagens em relação à quantidade de água necessária para saturação da terra nas condições do experimento, o que foi testado previamente. Tal teste foi realizado adicionando-se, gradualmente, água destilada nos potes com 10g de terra até fina película de água formar-se na superfície, indicativo de saturação do substrato. A partir da quantidade de água necessária para a saturação, umidade 100%, foram calculadas, por proporção, as umidades de 75 e 30%.

Foram realizadas três repetições por grupo testado para cada dia de observação. Todos os potes ficaram tampados e vedados com filme PVC para evitar a perda de água e foram mantidos em câmara climatizada a 25°C, UR 90%.

Todos os potes, de todos os grupos, tiveram suas massas aferidas no dia 0, tida como massa inicial, e, novamente, no dia de observação. A diferença entre essas duas medidas foi atribuída à perda de água. As observações ocorreram nos dias 0, 3, 6, 9, 12, 20 e 30.

Para recuperação dos juvenis desenvolveu-se, em estudos preliminares e baseada nos princípios das técnicas de Baerman (descrita em UENO;GONÇALVES,1988) e DONALD, 1967, a seguinte técnica a qual se mostrou mais eficaz na recuperação do maior número de nematóides. A terra de cada pote foi colocada e envolvida em gaze de algodão com 8 dobras, cortada no tamanho 10x15 cm, amarrada com barbante e presa com esparadrapo em funis de plástico com capacidade para 250 ml, o qual foi completado com água aquecida à temperatura de 27°C até cobrir o fundo da gaze. Após 24 horas, toda água do funil foi transferida para cálice de sedimentação e nova água (2ª água) foi colocada nos funis, a qual passou pelo mesmo procedimento e análise da “1ª água”, descrita a seguir.

As amostras permaneceram nos cálices de sedimentação por 24 horas, após o que o sobrenadante foi descartado e cerca de 7 ml de sedimento mais 3 ml de água destilada utilizada para lavar o cálice foi transferido para tubos de vidro com capacidade de 10 ml, onde permaneceram por 12 horas em sedimentação. Depois desse período, descartou-se o sobrenadante até restar apenas 1 ml de sedimento a partir do qual, após homogeneização,

---

\* Terra vegetal Boa Vista® - consiste em solo próximo à superfície, contém matéria orgânica em decomposição.



efetuou-se a contagem dos juvenis através de alíquotas de 0,05 ml montadas em lâminas e analisadas em microscópio de campo claro. A quantidade de juvenis vivos encontrados para 0,05 ml foi extrapolada para 1 ml, cujo valor foi considerado o total de sobreviventes da amostra.

O total de juvenis recuperados, em cada dia de observação, foi obtido através da média entre as três repetições, sendo que o total de cada repetição corresponde ao somatório dos juvenis recuperados na 1ª e na 2ª água. Nas amostras onde o resultado foi negativo, analisou-se todo o conteúdo de 1 ml sob estereomicroscópio para aferir a real inexistência de juvenis.

A infectividade dos juvenis recuperados foi testada utilizando-se larvas de *T. molitor*. Em cada grupo, 100, 75 e 30%, os juvenis recuperados em cada uma das três repetições foram homogeneizados e utilizados na proporção aproximada de 200 juvenis para cada larva de *T. molitor* com cerca de 0,14g, proporção baseada em experiência prévia. A aplicação se deu individualmente em placas de Petri de 5 cm de diâmetro contendo duas folhas de papel filtro umedecidas com 1ml de água destilada.

A mortalidade foi observada após 72 horas de aplicação e as larvas mortas foram colocadas em armadilhas para observação da emergência dos juvenis, após cerca de 15 a 20 dias, para confirmação de infecção. Tais armadilhas foram feitas utilizando-se placa de Petri de 5 cm de diâmetro em cujo centro colocou-se esparadrapo impermeável formando uma elevação sobre a qual depositou-se papel filtro cortado no diâmetro de 3cm para acomodação da larva morta. As larvas foram acomodadas individualmente, cada armadilha recebeu 4 ml de água destilada, foi tampada, vedada com filme PVC e mantida a 25°C, UR90% até emergência dos juvenis.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o teste de ANOVA, para dados paramétricos, seguido pelo teste de Tukey quando as diferenças foram significativas, e o teste de Mann-Whitney, para os não paramétricos, ambos segundo o Programa BioStat 5.0, versão disponível gratuitamente e com grau de liberdade de 0,05.

## RESULTADO

Não houve perda de água nas amostras dos grupos testados ao longo de todo experimento, o que atesta que a umidade do substrato permaneceu constante nas umidades desejadas durante todo o estudo.

Os testes de infectividade realizados foram 100% eficazes, ou seja, todas as larvas de *T. molitor* foram mortas com liberação de nova progênie, indicando a conservação da infectividade dos juvenis recuperados ao longo de todo experimento.

A quantidade recuperada de JIs no dia “0” foi considerada como o total existente nas amostras e as percentagens de recuperação dos demais dias de observação foram calculadas a partir desse valor. Dos cerca de 1000 juvenis que se calculou estarem presentes nas alíquotas adicionadas às amostras, atingiu-se uma recuperação mínima acima de 80% e sem diferença significativa entre os tratamentos, o que denota boas eficácia e sensibilidade da técnica utilizada para recuperação dos juvenis.

Ainda com relação à técnica utilizada, verificou-se que a maior recuperação dos juvenis ocorreu nas primeiras 24 horas, ou seja, na 1ª água utilizada.

A quantidade média de juvenis recuperados em cada dia de observação, bem como seu percentual em relação ao dia “0” e o desvio-padrão correspondente podem ser visualizados na Tabela 3.

Tabela 3: Relação do percentual e média de juvenis de vida livre sobreviventes de *Heterorhabditis amazonensis* recuperados ao longo de 30 dias em amostras de terra em três umidades, 100, 75 e 30%, em relação à umidade de saturação, mantidas a 25°C, UR 90%, em câmara climatizada.

Grupos <sup>1</sup>		Dias de observação						
		0	3	6	9	12	20	30
100	%	100	11.7	11.4	6.5	0.2	0.2	0.1
	M	826,67 <sup>a</sup>	97 a	94,33 a	53,33 a	1,33 a	1,67 a	0,67 a
	DP	(±180,37)	(±81,22)	(±73,76)	(±70,21)	(±2,31)	(±2,08)	(±1,15)
75	%	100	31.3	0.9	0.3	0	0	0
	M	856,67 a	268,33 ab	8 b	2,33 b	0 a	0 a	0 a
	DP	(±125,03)	(±81,29)	(±2,65)	(±0,58)	(0)	(0)	(0)
30	%	100	41.5	33.9	20.5	5.8	2.4	1.2
	M	916,67 a	380 b	310,67 a	187,67 a	53 b	21,67 b	10,67 b
	DP	(±144,38)	(±144,22)	(±188,11)	(±125,35)	(±10,15)	(±7,64)	(±8,5)

<sup>1</sup>: umidades testadas, 100%, 75% e 30%, em relação à condição de saturação.

M: média; DP: desvio padrão

Letras iguais nas mesmas colunas indicam valores equivalentes estatisticamente, p>0,05.

Entre os dias 0 e 3 ocorreu acentuada queda no número de juvenis infectantes vivos. A maior taxa de mortalidade, 88%, ocorreu no grupo com terra saturada, sendo que nas umidades de 75 e 30% a mortalidade foi, respectivamente, de 69 e 59%.

Foi no grupo de 75% que primeiro observou-se mortalidade total dos JIs, já que a partir do 12º dia, mesmo considerando-se a análise de todo conteúdo sob estereomicroscópio, não mais se encontrou juvenis vivos.

No entanto, os poucos juvenis recuperados no grupo 100%, a partir do 12º dia de observação, através da análise de todo conteúdo das amostras sob estereomicroscópio, não refletiram em diferença significativa em relação à ausência de juvenis no grupo 75%.

O grupo com 30% de umidade apresentou as maiores taxas de sobrevivência dos juvenis ao longo de todo experimento. Mesmo com queda acentuada após o 9º dia, a quantidade de juvenis recuperados a partir do 12º dia foi significativamente maior que a dos grupos 75 e 100%.

A variação do número de sobreviventes nos três tratamentos ao longo do experimento pode ser visualizada no Gráfico 2.

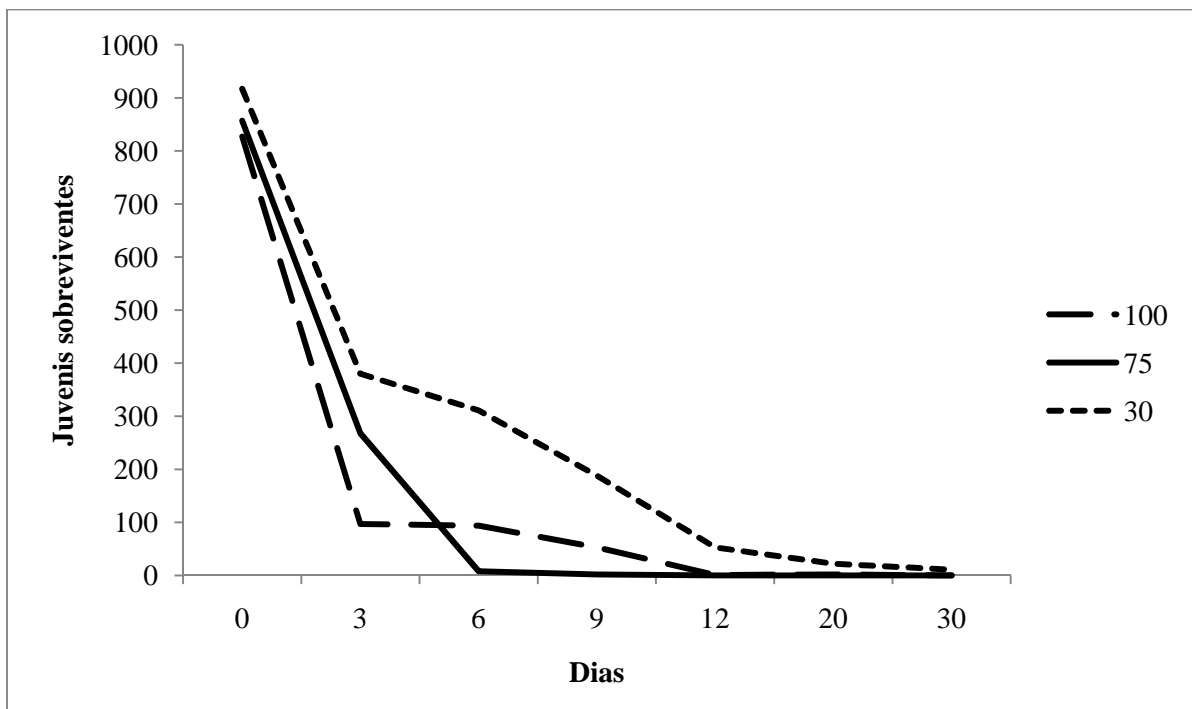


Gráfico 2: Variação na quantidade de juvenis de vida livre sobreviventes de *Heterorhabditis amazonensis* recuperados em amostras de terra em três diferentes condições de umidade, 100, 75 e 30%, em relação à saturação, ao longo de 30 dias, mantidas a 25°C, UR90%, em câmara climatizada.

## DISCUSSÃO

Condições secas de solo são relatadas como negativas para a sobrevivência de juvenis infectantes de vida livre (ALEKSEEV et al., 2006; HAZIR et al., 2003). No entanto, o substrato com 30% de umidade utilizado nesse estudo destacou-se como o mais favorável para a sobrevivência desses nematóides ao longo dos 30 dias de observação, com diferença significativa em relação às condições mais úmidas avaliadas.

Solos encharcados são, também, considerados limitantes à sobrevivência de nematóides devido ao preenchimento dos poros com água, o que diminui a aeração e, conseqüentemente, a quantidade de oxigênio disponível (KUNG et al., 1990). Tal idéia parece ser confirmada pela alta mortalidade, de 88%, observada logo nos três primeiros dias no grupo com condição saturada avaliado nesse estudo.

No entanto, pode-se sugerir que o tênue filme de água acumulado sobre a superfície do sedimento encharcado tenha propiciado a persistência do pequeno número de juvenis recuperados nesse tratamento até o 30º dia de observação. Muito embora, essa pequena quantidade de sobreviventes encontrada não tenha representado vantagem estatisticamente significativa dessa condição sobre o grupo com umidade de 75%.

A umidade de 75% foi a condição na qual se verificou 100% de mortalidade e não mais encontrou-se juvenis vivos após o 9º dia. Tal tempo de sobrevivência condiz com o verificado no primeiro capítulo dessa dissertação e reforça a idéia de que condições úmidas de solo podem não ser favoráveis à sobrevivência desses nematóides.

O substrato com condição mais seca estudado, umidade 30 %, foi o mais favorável à sobrevivência dos juvenis. Tal resultado confirma o sugerido e discutido no capítulo 1 dessa dissertação onde, para substratos de granulometria fina, como o que fora utilizado nos estudos aqui apresentados, condições secas são mais benéficas para esses animais.

Tal fato suscita e reafirma a discussão elaborada no estudo anterior dessa dissertação acerca das hipóteses sobre as vantagens de uma condição mais seca de substrato para a biologia desse estágio de vida livre o que se acredita estar relacionado à co-atuação e interação com outros fatores ambientais disponíveis no solo, com destaque para aqueles vinculados à caracterização física, tais como textura e porosidade.

A caracterização física do solo influencia na sua capacidade de aeração e drenagem, o que, conseqüentemente, interfere na sobrevivência, mobilidade e infectividade dos JIs (ALEKSEEV et al., 2006; HAZIR et al., 2003; WALLACE, 1958). E, dessa forma, têm fundamental importância para a compreensão da ecologia comportamental de juvenis de vida livre.

A quantidade de oxigênio disponível relaciona-se diretamente com a textura, porosidade e umidade do solo (BARBERCHECK;DUNCAN, 2004). De tal forma, como se tem verificado na literatura, que a interação entre esses fatores cria condições diversificadas e, assim, a umidade favorável possivelmente se altere de acordo com cada condição resultante.

Em estudo similar a esse desenvolvido acerca da sobrevivência de JIs de *H. bacteriophora* em diferentes condições de umidade do solo, BHATNAGAR E BARETH (2003), relataram resultados bem diversos. No 30° dia de observação, a sobrevivência dos nematóides nas umidades 100%, 75% e 25%, em relação a saturação, foram de 75, 73 e 40%, respectivamente. Porém, de forma diferente do presente estudo, os autores utilizaram areia, substrato de granulometria grossa, alta porosidade.

Já em outro estudo, MOLYNEUX E BEDDING (1984) estudaram diferentes combinações entre tipos de solo e umidade e suas influências sobre a sobrevivência e a mobilidade de JIs de algumas espécies de NEPs. Os autores demonstraram que o efeito da umidade sobre a ecologia comportamental de juvenis de vida livre varia de acordo com o sedimento utilizado. Observaram que em solos com granulometria fina, como o que fora utilizado no presente estudo, condições secas foram significativamente mais favoráveis à sobrevivência e à mobilidade dos juvenis de vida livre.

Com base no exposto, pode-se dizer que o substrato utilizado nesse estudo, caracterizado por granulometria menor ou igual a 1 mm, textura fina, baixa porosidade, ao interagir com condições de maior umidade, cria uma situação de baixa oxigenação e dificuldade de locomoção para os nematóides, uma vez que o resultado de tal interação aumenta a densidade do substrato e diminui a porosidade.

Por outro lado, a interação entre esse substrato com condições mais secas, de baixa umidade, gera uma situação de menor densidade do solo, com poros mais livres, permitindo maior aeração e, conseqüentemente, maior disponibilidade de oxigênio e maior facilidade de locomoção. Tal fato parece responder pelo resultado positivo encontrado para a condição de 30% de umidade.

Vale ressaltar, como fora alvo de discussões e elucidações no estudo anterior dessa dissertação, que solos que propiciem condições onde haja maior oxigenação e facilidade de locomoção são importantes na medida em que a quantidade de oxigênio no solo seria um fator regulador da quantidade de energia produzida para manutenção da sobrevivência e atividade dos nematóides. Além disso, a facilidade de locomoção permite aos nematóides a exploração de diferentes microrregiões, evitando situações de competição, além de exigir menor gasto energético para deslocamento e facilitar a busca e encontro de hospedeiros.

Ademais de toda proposição apresentada, convém observar que a sobrevivência e tolerância de JIs de NEPs ao estresse ambiental variam enormemente entre as variadas espécies e, inclusive, entre populações de uma mesma espécie (KUNG et al., 1990; PUZA; MRACEK, 2005; SHANNON et al., 2005), sobretudo entre aquelas pertencentes ao gênero *Heterorhabditis* (GREWAL et al., 2002). Dessa forma, o tempo de persistência no solo e a tolerância e/ou preferência por condições úmidas ou secas podem ser simples consequência da história natural específica de cada grupo.

No entanto, ainda assim, pode-se supor que a umidade favorável à biologia desses animais varie de acordo com a co-atuação de outras características ambientais onde, talvez, o mais importante não seja a quantidade de água disponível, mas sim, o que tal umidade represente em termos de disponibilidade de oxigênio e facilidade de locomoção nas condições em que se encontrem.

Assim, esse estudo demonstrou que condições secas de substrato são favoráveis à sobrevivência de juvenis infectantes de NEPs em substratos com granulometria fina e sugere-se que a importância da umidade para essa fase juvenil de vida livre estaria na razão com que essa variável influencie e seja influenciada pelas demais características ambientais disponíveis.

#### 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica desenvolvida e utilizada para recuperação dos juvenis se mostrou uma ferramenta eficaz.

O processo de permanência no substrato utilizado e recuperação dos juvenis não inativou seu potencial infectante.

A acentuada mortalidade nos três primeiros dias parece refletir uma característica da espécie e não dependente da umidade.

A suposição feita no primeiro estudo de que umidades mais altas, no substrato utilizado, tenham atuado negativamente na sobrevivência dos JIs foi confirmada com os resultados obtidos no segundo estudo.

Condições secas, no substrato avaliado de granulometria fina, são favoráveis à sobrevivência de JIs de *H. amazonensis*.

Sugere-se que a umidade ideal para a biologia dessa fase de vida livre dos NEPs dependa da interação com outras características ambientais do solo, sobretudo sua caracterização física, e varie na razão com que influencie e seja influenciada pelas demais características ambientais disponíveis.

#### Observações

Embora não tenha sido o objetivo do estudo, convém tecer duas observações acerca da técnica descrita em Material e Métodos e utilizada para recuperação dos nematóides.

A primeira diz respeito ao tempo de permanência das amostras de terra em contato com a água. Verificou-se que o tempo usualmente utilizado em técnicas de recuperação de nematóides, de 1 a 4 horas, foi ineficaz para os juvenis de *H. amazonensis*, visto que recuperava, em média, no máximo 20% da quantidade de juvenis adicionados às amostras. Isso levou à ampliação gradual desse período, de tal forma que, em 12 horas e, com menos variação e mais segurança, em 24 horas, essa recuperação alcançou 100% em diversas amostras.

A outra observação diz respeito à temperatura da água a ser utilizada, verificou-se que valores acima de 35 -40°C, usuais em muitas técnicas, foram letais aos JIs de *H. amazonensis*, dessa forma utilizou-se a padronização de 27°C.

Tais observações destacam a variabilidade na eficácia de técnicas de acordo com características intrínsecas de cada espécie nas condições impostas em cada experimento e a necessidade de adaptação e/ou desenvolvimento de novas formas de estudo.

## REFERÊNCIAS

- Adams, B. J., & Nguyen, K. B. 2001. Taxonomy and Systematics, p. 1-33. In: R. GAUGLER (Ed.), **Entomopathogenic Nematology**. CABI Publishing, 388p.
- Alekseev, E., Glazer, I., & Samish, M. 2006. Effect of soil texture and moisture on the activity of entomopathogenic nematodes against female *Boophilus annulatus* ticks. **Biological Control** **51**: 507-518.
- Andaló, V., Nguyen, K. B., & Moino Jr, A. 2006. *Heterorhabditis amazonensis* n.sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Amazonas, Brazil. **Nematology** **8** (6): 853-867.
- Barbercheck, M. E., & Duncan, L. 2004. Abiotic factors, p.309-343. In: R. Gaugler, & A. L. Bilgrami (Eds). **Nematode Behavior**. CABI Publishing, 419p.
- Bhatnagar, A., & Bareth, S. 2003. Effect of soil moisture on the survival of entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar 1976, in sandy loam soil. **Pest Management and Economic Zoology** **11** (1): 1-6.
- Bush, A. O., Fernández, J. C., Esch, G. W., & Seed, J. R. 2001. Population concepts. In: A. O. Bush, J. C. Fernández, G. W. Esch, & J. R. Seed, **Parasitism: The diversity and ecology of animal parasites**. Cambridge University Press. I+566p
- Donald, A. D. 1967. A technique for the recovery of Strongyloid infective larvae from small sample units of pasture. **Journal of Helminthology** **XLL** (1): 4-10.
- Forst, S. & Clarke, D. 2002. Bacteria-Nematode Symbiosis, p 57-78. In: R. Gaugler (Ed.), **Entomopathogenic Nematology**. CABI Publishing, 419 p.
- Glazer, I, Alekseev, E. & Samish, M. 2001. Factors affecting the virulence of entomopathogenic nematodes to engorged female *Boophilus annulatus* ticks. **The Journal of Parasitology** **87** (4): 808-812.
- Grewal, P.S., Wang, X., & Taylor, R.A.J. 2002. Dauer juvenile longevity and stress tolerance in natural populations of entomopathogenic nematodes: is there a relationship? **International Journal for Parasitology** **32**: 717-725.
- Hass, B., Downes, M. J., & Griffin, C. T. 2002. Persistence of Four *Heterorhabditis* spp. Isolates in Soil: Role of Lipid Reserves. **Journal of Nematology** **34** (2): 151-158.
- Hazir, S., Kaya, H. K., Stock, S. P., & Keskin, N. 2003. Entomopathogenic Nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for biological control of soil pests. **Turkish Journal of Biology** **27** (4): 181-202.



- Kung, S. P., Gaugler, R., & Kaya, H. K. 1990. Influence of soil pH and oxygen on persistence of *Steinernema* spp. **Journal of Nematology** **22** (4): 440-445.
- Lewis, E.E. 2002. Behavioural Ecology, p 205-223. In: R. Gaugler (Ed.), **Entomopathogenic Nematology**. CABI Publishing, 388 p.
- Lewis, E. E., Campbell, J., Griffin, C., Kaya, H., & Peters, A. 2006. Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. **Biological Control** **38**: 66-79.
- Martin Jr, W. R. 1997. Using Entomopathogenic Nematodes to Control Insects During Stand Establishment. **HortScience** **32** (2): 196-200.
- Molyneux, A. S., & Bedding, R. A. 1984. Influence of soil texture and moisture on the infectivity of *Heterorhabditis* sp D1 and *Steinernema glaseri* for larvae of the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. **Nematologica** **30**: 358-365.
- Neves, J. M., Simões, N., & Mota, M. 1999. Nematóides Entomopatogênicos: uso e novas perspectivas. **Boletim de Biotecnologia** **64**: 23-29.
- Prasad, G. S., Ranganath, H.R. & Singh, P. K. 2001. Occurrence of the entomopathogenic nematode in parts of South Andamans. **Current Science** **80** (4): 501-502.
- Puza, V. & Mracek, Z. 2005. Seasonal dynamics of entomopathogenic nematodes of the genera *Steinernema* and *Heterorhabditis* as a response to abiotic factors and abundance of insect hosts. **Journal of Invertebrate Pathology** **89**: 116-122.
- Samish, M. 2000. Biocontrols of Ticks. **Annals New York Academy Sciences** **916**: 172-178.
- Samish, M., Alekseev, E., & Glazer, I. 2001. Biocontrol of ticks by entomopathogenic nematodes: Research Update. **Annals New York Academy Sciences** **17** (8): 589-594.
- Samish, M. & Rehacek, J. 1999. Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. **Annual Review of Entomology**. **44**: 159-182.
- Shannon, A. J., Browne, J. A., Boyd, J., Fitzpatrick, D. A. & Burnell, A. M. 2005. The anhydrobiotic potential and molecular phylogenetics of species and strains of *Panagrolaimus* (Nematoda, Panagrolaimidae). **The Journal of Experimental Biology** **208**: 2433-2445.
- Shapiro-Ilan, D. I., Goug, D. H., & Koppenhöfer, A. M. 2002. Factors affecting commercial success: case studies in cotton, turf and citrus, p 333-355. In: R. Gaugler (Ed.), **Entomopathogenic Nematology**. CABI Publishing, 419 p.
- Smart Jr, G.C. 1995. Entomopathogenic Nematodes for the Biological Control of Insects. **Journal of Nematology** **27** (4S): 529-534.

- Stock, S. P. 2005. Insect - parasitic nematodes: From lab curiosities to model organisms. **Journal of Invertebrate Pathology** **89**: 57-66.
- Ueno, H. & Gonçalves, P.C. 1988. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. Ed. Japan International Cooperation Agency, Tokyo. 166p.
- Vasconcelos, V. O., Furlong, J., Freitas, G. M., Dolinski, C., Aguilhera, M. M., Rodrigues, R. C.D. & Prata, M. 2004. *Steinernema glaseri* Santa Rosa strain (Rhabditida:Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora* CCA Strain (Rhabditida:Heterorhabditidae) as biological control agents of *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae). **Parasitology Research** **94**: 201-206.
- Wallace, H. R. 1958. The influence of pore size and moisture content of the soil on the migration of larvae of the beet eelworm, *Heterodera schachtii* Schmidt. **Annals Applied Biology** **46**(I): 74-85.
- White, G. F. 1927. A method for obtaining infecting nematode larval from culture. **Science** **66**: 302-303
- Wilson, M., & Gaugler, R. 2004. Factors limiting short-term persistence of entomopathogenic nematodes. **Journal of applied entomology** **128**(4): 250-253
- Wright, D. J. & Perry, R. N. 2002. Physiology and biochemistry. In: R. Gaugler (Ed.), **Entomopathogenic Nematology**. CABI Publishing, 388 p.

## APÊNDICE

- ❖ Ilustrações das etapas da técnica desenvolvida e utilizada para recuperação, a partir de amostras de terra, dos juvenis de vida livre de *Heterorhabditis amazonensis*.

