

Atividade predatória, crescimento radial e esporulação de fungos predadores de nematóides *Monacrosporium* spp, submetidos à criopreservação

Predatory activity, radial growth and esporulation of nematode-trapping fungus *Monacrosporium* spp, submitted to cryopreservation

Artur Kanadani Campos¹ Marcelo de Andrade Mota¹
Jackson Victor de Araújo² Paulo Roberto Cecon³

RESUMO

Testes *in vitro* foram realizados para avaliar o efeito da criopreservação em nitrogênio líquido com e sem adição de crioprotetores (DMSO ou glicerol), na atividade predatória sobre larvas infectantes de *Cooperia* sp e *Haemonchus* sp, crescimento radial e produção de conídios de dois isolados de fungos predadores de nematóides (*Monacrosporium sinense* e *Monacrosporium appendiculatum*). A capacidade predatória dos fungos sobre larvas infectantes de *Cooperia* sp e *Haemonchus* sp dos fungos previamente submetidos aos diferentes métodos de preservação não foi afetada. O crescimento radial dos fungos criopreservados com glicerol 10% foi mais expressivo ($p < 0,05$), quando comparado ao apresentado pelos fungos congelados com DMSO 10 % ou água. A produção de esporos foi maior ($p < 0,05$) no fungo *M. appendiculatum* preservado a 4°C em geladeira.

Palavras-chave: criopreservação, fungos nematófagos, *Monacrosporium* spp, *Cooperia* sp, *Haemonchus* sp.

ABSTRACT

In vitro tests were performed to evaluate the effect of cryopreservation with or without addition of cryoprotectants (DMSO or glycerol) in the predatory activity on *Cooperia* sp and *Haemonchus* sp infective larvae, radial growth and conidial production of two isolates of nematode-trapping fungus (*Monacrosporium sinense* and *M. appendiculatum*). The predatory activity on *Cooperia* and *Haemonchus* sp infective larvae of the fungus submitted to the different preservation methods did not affected. The radial growth of the fungus cryopreserved with glycerol was higher ($p < 0.05$), when compared to others treatments. The conidial production was higher ($p < 0.05$) in the *M. appendiculatum* isolate preserved at 4°C in refrigerator.

Key words: cryopreservation, nematophagous fungi, *Monacrosporium* spp, *Haemonchus* sp, *Cooperia* sp.

INTRODUÇÃO

O gênero *Monacrosporium* apresenta diversas espécies e pertence ao grupo de fungos predadores de nematóides. Estes organismos são saprófitas, amplamente distribuídos na natureza, sendo facilmente isolados do solo e bolos fecais de diversas espécies de animais (LARSEN, 1999 e SANTOS et al., 1991).

Atualmente estes fungos têm sido amplamente pesquisados no intuito de se avaliar a viabilidade de sua utilização no controle biológico de nematóides parasitas dos animais domésticos (LARSEN, 1999).

Após seu isolamento, necessitam ser conservados por longos períodos para diversas avaliações laboratoriais e a campo, visando a seleção de isolados com maior potencial para utilização em programas de controle; entretanto, dificuldades técnicas na manutenção em laboratório têm prejudicado as pesquisas.

Muitos processos utilizados na manutenção de fungos exigem repicagens periódicas, ficando a cultura exposta a contaminações, além de favorecer mutações que podem afetar a sua atividade nematófaga. Segundo KERRY (1989), a manutenção da viabilidade do isolado durante o armazenamento é

¹Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), 31270-901, Belo Horizonte, MG.

²Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000, Viçosa, MG. Autor para correspondência: Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, 31270-901, CP 486, Belo Horizonte, MG. E-mail: arturkanadani@hotmail.com

³Departamento de Estatística, Universidade Federal de Viçosa.

um dos principais atributos do agente de controle biológico

A perda de capacidade predatória pode ocorrer em alguns isolados, quando estes são mantidos por longos períodos em condições laboratoriais, sem serem expostos à presença de nematóides, de acordo com STIRLING (1991).

O método de conservação em nitrogênio líquido é considerado um dos métodos mais efetivos na preservação de fungos por períodos prolongados (STALPERS et al., 1987). Quando conservados em nitrogênio líquido (-196°C), o tempo de estocagem é muitas vezes ilimitado, de forma que se elimina o inconveniente de constantes repicagens, além de diminuir a chance de contaminações. Outra característica importante deste processo é que, pelo fato de o metabolismo do fungo ser totalmente inibido, as chances de ocorrerem mutações e perda de viabilidade do fungo diminuem (SANDSCAR & MAGALHÃES, 1994).

A classe do crioprotetor utilizada nos processos de congelamento, pode interferir na viabilidade dos isolados após o descongelamento. Por outro lado, o crioprotetor impede a difusão de água do interior da célula e reduz a formação de cristais de gelo, além de estabilizar alguns componentes da membrana celular, impedindo alterações celulares (ONIONS, 1971). Os crioprotetores mais comumente utilizados na conservação de fungos são o glicerol e o dimetilsulfóxido (DMSO).

O objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar a viabilidade de isolados fúngicos das espécies *M. sinense* e *M. appendiculatum* submetidos à criopreservação com dois diferentes crioprotetores (glicerol e dimetil sulfóxido).

MATERIAL E MÉTODOS

Organismos - Um isolado de *M. sinense* (SF 470) e um isolado de *M. appendiculatum* (CGI), obtidos de amostras de solo, foram estocados em tubos de cultura contendo ágar extrato de milho 2% a 4°C de temperatura no Laboratório de Parasitologia do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.

Larvas infectantes (L3) de *Cooperia* sp e *Haemonchus* sp foram obtidas de culturas de fezes de bezerro estabelecido e naturalmente infectado. Para se evitarem contaminações com bactérias fecais e fungos, as larvas foram lavadas em água destilada em centrífuga regulada a 1.000rpm, por 5 minutos, desprezando-se ao final de cada centrifugação o sobrenadante. Este procedimento foi repetido dez

vezes. Em seguida, estas larvas foram estocadas a 4°C, em solução contendo 0,05% de anfotericina B, 0,05% de cloranfenicol, e 0,05% de sulfato de estreptomicina, sendo repetido o processo de lavagem (ARAÚJO et al., 1996).

Os espécimes foram quantificados em cinco alíquotas de 20µl, sob microscópio óptico (10X). O número médio de L3 foi calculado e o número de larvas presentes no volume total foi calculado com base na média e extrapolando para o volume final.

Criopreservação dos isolados em nitrogênio líquido e descongelamento - Discos de meio de cultura dos isolados CGI e SF470 foram transferidos dos tubos de cultivo para placas de Petri (9 cm de diâmetro), contendo 20ml de meio de cultura AELA (extrato de levedura, 4g; K₂HPO₄, 1g; Mg SO₄.7H₂O, 0,5g; amido solúvel, 20g; agar, 20g; água destilada, 1 litro) autoclavado. Estas placas foram incubadas em estufa regulada a 25°C, durante sete dias, em ausência de luz.

Discos de cultura (4mm de diâmetro) foram retirados das bordas de colônias crescidas livres de contaminação e, em seguida, acondicionados em criotubos contendo 1ml de água destilada autoclavada. Este processo foi repetido, para os dois isolados, com criotubos contendo solução estéril de Glicerol (Synth) 1% (v/v) ou DMSO (Sigma) 10% (v/v).

Para o congelamento das amostras, estas foram colocadas em "freezer" até que atingissem a temperatura -20°C, sendo em seguida imersas em nitrogênio líquido à temperatura de -196°C.

As amostras foram descongeladas 30 dias após, em banho-maria, regulado a 38°C, sob agitação. O material descongelado foi espalhado sobre placas de Petri contendo AEM 2% e colocado para crescer em estufa a 25°C, por 7 dias.

Avaliação da capacidade predatória dos isolados sobre L3 de *Haemonchus* sp e *Cooperia* sp - Placas de Petri de 5cm de diâmetro contendo ágar-água 2% (5 placas por tratamento), foram inoculadas com discos de cultura dos isolados fúngicos (submetidos aos diferentes métodos de preservação) e colocadas em estufa regulada a 25°C de temperatura por 5 dias. No quinto dia de crescimento gotejou - se aproximadamente 500 L3 de nematóides alvos. O grupo controle constituiu-se de placas com ágar-água sem fungo e recebeu número similar de larvas. As placas foram colocadas em estufa e incubadas por 7 dias a 25°C. No sétimo dia de incubação, todas as placas receberam 5ml de água a 37°C, e com auxílio de uma espátula, raspou-se a superfície do ágar, e a suspensão resultante deste processo foi recolhida em tubos de hemólise. Para se estimar o número de larvas livres de

predação presentes nas placas, foram retiradas 5 alíquotas de 20µl de cada um dos tubos. A média do número de larvas contidas nessas alíquotas foi então extrapolada para o volume final de 5ml. O cálculo do percentual de redução do número de larvas nas placas foi feito através da equação:

$$\% \text{ Redução} = \frac{(\text{n}^\circ \text{ de larvas controle} - \text{n}^\circ \text{ de larvas tratadas})}{(\text{n}^\circ \text{ de larvas controles})} \times 100$$

Avaliação do crescimento radial dos isolados CGI e SF470 - Discos de cultura (4mm de diâmetro), oriundos de placas contendo colônias dos isolados fúngicos previamente congelados ou conservados a 4°C, foram colocados no centro de placas de Petri (9cm de diâmetro) contendo ágar-água 2% (5 placas por tratamento), mantidas a 25°C e em ausência de luz. Com um marcador permanente, foram feitos traços a partir do centro até a borda das placas. As medições do diâmetro da cultura foram feitas no quinto dia de crescimento, sobre os traços previamente marcados, com auxílio de uma régua.

Esporulação - Discos de cultura (4mm de diâmetro), retirados de placas com colônias dos isolados CGI e SF470 (previamente submetidos aos diferentes protocolos de armazenamento), foram transferidos para placas de Petri com 9cm de diâmetro (5 placas por tratamento) contendo AEM 2%. Estas placas foram acondicionadas em estufa por oito dias regulada a 25°C e em ausência de luz. No último dia de incubação, 10ml de solução 0,01% de Tween 20 foi adicionada às placas, e uma espátula foi utilizada para raspar a superfície do ágar e auxiliar a remoção dos esporos. Em seguida, o número de esporos foi quantificado em câmara de Neubauer. Os resultados foram submetidos à análise de variância e analisados ao nível de 5% de significância.

RESULTADOS

Os testes *in vitro* de predação dos fungos sobre L3 de nematóides parasitas de bovinos demonstraram que o processo de preservação não teve influência sobre a atividade predatória dos agentes de controle, sobre larvas de *Cooperia* sp e *Haemonchus* sp (Tabela 1).

Diferenças ($p < 0,05$) no diâmetro médio das colônias do isolado CGI (Tabela 2), foram observadas entre os tratamentos com glicerol, água e DMSO. As amostras dos dois isolados criopreservadas com glicerol, apresentaram os maiores diâmetros de colônia.

A produção de esporos do isolado SF 470, não diferiu ($p > 0,05$) em nenhum dos tratamentos,

entretanto, o isolado CGI estocado a 4°C em geladeira produziu mais esporos que as amostras preservadas pelos outros métodos. O isolado CGI obteve maiores produções que o isolado SF 470 em todos os tratamentos, exceto, no tratamento que utilizou glicerol como crioprotetor. (Tabela 3).

DISCUSSÃO

Não existe um meio universal para a estocagem de microorganismos. A seleção do método deve ser feita baseada na natureza do organismo em estudo e nas vantagens e desvantagens de cada método. Caso o microorganismo não seja bem estudado, a preservação deste por mais de um método deve ser feita. Após a estocagem, suas características morfológicas e fisiológicas devem ser verificadas para detectar qualquer mudança durante o período de armazenamento (DHINGRA & SINCLAIR, 1995).

Neste trabalho, pode ser verificado que, após estocagem em nitrogênio líquido (- 196°C), o crescimento radial e esporulação foram alterados em alguns tratamentos. Apesar de os crioprotetores desempenharem um papel muito importante na crioproteção de microorganismos, pudemos observar que o isolado CGI quando criopreservado com DMSO, obteve menor crescimento radial, quando comparado aos tratamentos criopreservados com água e glicerol.

SANDSCAR & MAGALHÃES (1994) relataram toxicidade do DMSO sobre fungos, todavia este fato era dependente da concentração. Eles sugerem que lavagens imediatamente após o descongelamento poderiam resultar em menor toxicidade deste crioprotetor sobre o fungo. Estudos com concentrações menores de DMSO que as

Tabela 1 - Percentual médio de redução de larvas de *Cooperia* sp e *Haemonchus* sp pelos isolados SF 470 e CGI submetidos aos diferentes métodos de estocagem após 7 dias de incubação a 25° C de temperatura e em ausência de luz.

Isolado	Método de Armazenamento			
	Nitrogênio Líquido Água	Nitrogênio Líquido DMSO 10%	Nitrogênio Líquido Glicerol 10%	4° C (Refrigerador)
SF470 ²	85,00% A	87,50% A	90,00% A	92,50% A
CGI ³	87,50% A	90,00% A	90,00% A	92,50% A

1. As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

SF470²: *Monacrosporium sinense*. CGI³: *Monacrosporium appendiculatum*

Tabela 2 - Diâmetro médio (mm) das colônias dos isolados SF470 e CGI submetidos aos diferentes métodos de estocagem, em placas de Petri após 5 dias de incubação a 25° C em ausência de luz.

Isolado	Método de Armazenamento			4° C (Refrigerador)
	Nitrogênio Líquido Água	Nitrogênio Líquido DMSO 10%	Nitrogênio Líquido Glicerol 10%	
SF470 ²	57,12 B b	52,80 B a	70,92 A a	56,08 B a
CGI ³	60,72 B a	49,72 C a	66,64 A a	54,12 C c

1. As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

SF 470² *Monacrosporium sinense*. CGI³ *Monacrosporium appendiculatum*.

utilizadas neste ensaio devem ser realizados futuramente com os fungos aqui estudados, no intuito de se encontrar uma concentração ótima para cada um dos isolados.

Em muitos estudos com fungos nematófagos, incluindo produção de formulações, grandes quantidades de esporos têm sido utilizadas (ARAÚJO et al., 2001; LARSEN et al., 1995; WALLER et al., 2001). A esporulação abundante também é um fator importante para a disseminação e sobrevivência de fungos em condições ambientais (JANSSON, 1982), o que é altamente desejável em programas de controle biológico. A atividade nematófaga *in vitro* não foi alterada pelos métodos de preservação, e demonstrou não estar diretamente relacionada com o crescimento radial e esporulação. Este fato está de acordo com DACKMAN et al. (1987) que relatam em seu estudo a independência destas características. Trabalhos anteriores com avaliação *in vitro* da interação destes isolados com diversas espécies de nematóides

Tabela 3 - Número médio de esporos, por placa de Petri, dos isolados SF470 e CGI, submetidos aos diferentes processos de estocagem, após 8 dias de incubação a 25° C em ausência de luz.

Isolado	Método de Armazenamento				4° C Refrigerador
	Nitrogênio Líquido Água	Nitrogênio Líquido DMSO 10%	Nitrogênio Líquido Glicerol 10%		
SF470 ²	0,26 x 10 ⁴ A b	0,52 x 10 ⁴ A b	1,30 x 10 ⁴ A a	1,16 x 10 ⁴ A b	
CGI ³	1,26 x 10 ⁴ B a	1,44 x 10 ⁴ B a	1,48 x 10 ⁴ B a	3,00 x 10 ⁴ A a	

1. As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

SF 470²: *Monacrosporium sinense*. CGI³: *Monacrosporium appendiculatum*.

demonstraram atividade predatória destes fungos sobre L₃ de nematóides dos gêneros *Cooperia* e *Haemonchus* e fitonematóides (GOMES et al., 1999)

Apesar de inicialmente os testes *in vitro* serem de grande importância, eles não reproduzem as interferências que ocorrem durante passagem pelo trato gastrointestinal e no meio ambiente. Desta forma testes *in vivo* com estes isolados trarão informações importantes para o sucesso da aplicação destes fungos em programas de controle biológico.

Um dos grandes problemas da conservação de fungos em tubos de cultivo contendo meios nutritivos é a contaminação por outros fungos e outros organismos. Em nosso laboratório, culturas conservadas por este método têm sofrido constantemente contaminações com ácaros. Neste trabalho, durante as fases pré-experimentais, algumas das culturas conservadas em nitrogênio líquido apresentaram contaminação por leveduras, entretanto pode-se constatar que estas contaminações eram provenientes de contaminações dos criotubos com a água do aparelho de banho-maria pois, com a secagem dos criotubos, após descongelamento, o problema foi resolvido.

Apesar de muitos laboratórios que trabalham com fungos nematófagos utilizarem o método de conservação em nitrogênio líquido, nenhuma avaliação dos métodos utilizados está relatada em literatura. Trabalhos com outras espécies de fungos, utilizando a criopreservação em nitrogênio líquido relatam a viabilidade de fungos após 25 anos de congelamento (SMITH & ONIONS, 1994) o que torna esta técnica extremamente vantajosa para a produção industrial em escala que exige grandes quantidades de inóculo com alto grau de pureza.

O método de preservação em nitrogênio líquido exige um aparato tecnológico sofisticado, e de alto custo. DHINGRA & SINCLAIR (1995) sugerem a preservação em sílica gel como um método seguro, pois as condições de umidade reduzida previnem a presença de contaminantes, além de possuir baixo custo e não exigir aparelhagem específica, o que nos leva a considerar esta técnica como potencial candidata em avaliações futuras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, J.V.; NETO, A.P.; AZEVEDO, M.H.F. Screening parasitic nematode- trapping fungi *Arthrobotrys* for passage through the gastrointestinal tract of calves. *Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.*, Belo Horizonte, v.48, p. 543-552, 1996.

- ARAÚJO, J.V et al. Efeito antagonista de fungos predadores do gênero *Arthrobotrys* sobre larvas infectantes de *Oesophagostomum radiatum*, *Cooperia punctata* e *Haemonchus placei*. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v.8, n.2, p.81-84, 2001.
- DACKMAN, C. et al. Quantification of predatory and endoparasitic nematophagous fungi and their activities in soil. **Microbial Ecology**, New York, v.13, p.89-93, 1987.
- DINGRHA, O.D.; SILCLAIR, J.B. **Basic plant pathology methods**. Boca Raton, USA CRC, 1995. 434p.
- GOMES, A.P.S.; ARAÚJO, J.V.; RIBEIRO, R.C.F. Differential in vitro pathogenicity of predatory fungi of the genus *Monacrosporium* for phytonemtododes, free-living nemtodes and parasitic nematodes of cattle. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.32, n.1, p.79-83, 1999.
- JANSSON, H.B. Predacity by nematophagous fungi and its relation to the attractions of nematodes. **Microbial Ecology**, v.8,p.233-240, 1982.
- KERRY, B.R. Fungi as biological control agents for plant parasitic nematodes. In: WHIPPS, J.M.; LUMDSEN,R.D. (Eds). **Biotechnology of fungi for improving plant growth**. Cambridge : ni., 1989. p.153-170.
- LARSEN, M. Biological control of helminths. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.29, p.139-146, 1999.
- LARSEN, M. et al. Biological control of trichostrongyles in calves by the fungus *Duddingtonia flagrans* fed to animals under natural grazing conditions. **Veterinary Parasitology**. Amsterdam ,v.60, p.321-330, 1995.
- ONIONS, A.H.S. Preservation of fungi. **Methods in Microbiology**, London, v.4, p.114-151, 1971.
- SANDSCAR, B.; MAGALHAES, B. Cryopreservation of *Zoophtora radicans* (Zygomycetes, Entomophthorales) in liquid nitrogen. **Cryobiology**, Oxford v.31, p.206-213, 1994.
- SANTOS, M.A.; FERRAZ, S.; MUCHOVEJ, J.J. Detection and ecology of nematophagous fungi from brazilian soils. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v.15, p.122-133, 1991.
- SMITH, D.; ONIONS, A.H.S. **The preservation and maintance of living fungi. IMI technical handbooks** (2.ed). Wallingford, England : CAB International, 1994. 122p.
- STALPERS, J.A.; DE HOOG, V.U. Improvement of the straw technique for the preservation of fungi in liquid nitrogen. **Mycologia**, New York, v.79, n.1, p.182-89, 1987.
- STIRLING, G. R. (Ed). **Biological control of plant parasitic nematodes: progress, problems and prospect**. Wallingford, UK : CAB International, 1991. 282p.
- WALLER, P.J.; KNOX, N.R.; FAEDO, M . The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematodes parasites of sheep: feed and block studies with *Duddingtonia flagrans*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam., v. 102, p. 321-330, 2001.