

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

AÇÃO *IN VITRO* DOS FUNGOS NEMATÓFAGOS *DUDDINGTONIA FLAGRANS* (DUDDINGTON, 1955), *MONACROSPORIUM THAUMASIUM* (DRECHSLER, 1937) E *POCHONIA CHLAMYDOSPORIA* (GAMS & ZARE, 2001) SOBRE OVOS DE *EURYTREMA COELOMATICUM* (GIARD & BILLET, 1892)F.R. Braga¹, J.V. Araújo^{1*}, A.R. Silva¹, R.O. Carvalho¹, J.M. Araujo¹, A.K. Campos², A.O. Tavela¹¹Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Veterinária, Avenida Peter Henry Rolfs, s/nº, CEP 36570-000, Viçosa, MG, Brasil. E-mail: fabioribeirobraga@hotmail.com

RESUMO

O presente estudo investigou a ação *in vitro* dos fungos nematófagos *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium thaumasium* (NF 34) e *Pochonia chlamydosporia* (VC1 e VC4) sobre ovos de *Eurytrema coelomaticum*. Os ovos foram vertidos sobre a superfície de culturas dos isolados fúngicos cultivados sobre ágar-água 2% (AA 2%) em placas de Petri, e sobre AA 2% sem fungo como controle. Ao completarem 7, 10 e 14 dias, os ovos foram removidos e classificados de acordo com os seguintes parâmetros: efeito tipo 1, efeito lítico sem prejuízo morfológico a casca do ovo; tipo 2, efeito lítico com alteração morfológica da casca e embrião; e tipo 3, efeito lítico com alteração morfológica do embrião e da casca, além de penetração de hifas e colonização interna do ovo. Os isolados AC001 e NF34 não causaram os efeitos dos tipos 2 e 3, contudo o isolado VC1 causou tal efeito determinando atividade ovicida sobre 27,2% dos ovos no dia 7, 23,1% no dia 10, e 25,0% no dia 14 após tratamento. Da mesma forma, o isolado VC4 causou atividade ovicida: 15,0%, 25,4%, e 21,8% nos dias 7, 10 e 14, respectivamente. *P. chlamydosporia* é um fungo promissor para o controle biológico de *E. coelomaticum*.

PALAVRAS-CHAVE: Fungos nematófagos, *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium*, *Pochonia chlamydosporia*, *Eurytrema coelomaticum*.

ABSTRACT

IN-VITRO ACTION OF THE NEMATODE-TRAPPING FUNGI *DUDDINGTONIA FLAGRANS* (DUDDINGTON, 1955), *MONACROSPORIUM THAUMASIUM* (DRECHSLER, 1937) AND *POCHONIA CHLAMYDOSPORIA* (GAMS & ZARE, 2001) ON *EURYTREMA COELOMATICUM* (GIARD & BILLET, 1892) EGGS. The present study investigated the in-vitro action of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium thaumasium* (NF34) and *Pochonia chlamydosporia* (VC1 and VC4) on eggs of *Eurytrema coelomaticum*. Eggs were placed on fungal cultures surface over water-agar 2% (WA 2%) in Petri plates, and on WA 2% with no fungus (control). After 7, 10 and 14 days, the eggs were removed and classified according to the following parameters: type 1, lytic effect without morphological damage to eggshell; type 2, lytic effect with morphological alteration of embryo and eggshell; and type 3, lytic effect with morphological alteration of embryo and eggshell, besides hyphal penetration and internal egg colonization. The isolate AC001 and NF34 did not cause the type 2 and 3 effects; however, the isolate VC1 caused the type 3 effect determining the ovicidal activity on 27.2% of eggs at day 7, 23.1% at day 10, and 25.0% at day 14 after treatment. Also, the isolate VC4 caused ovicidal activity: 15.0%, 25.4% and 21.8% at day 7, 10 and 14, respectively. *Pochonia chlamydosporia* is a promising fungus for biological control of *E. coelomaticum*.

KEY WORDS: Nematophagous fungi, *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium*, *Pochonia chlamydosporia*, *Eurytrema coelomaticum*, Trematoda, biological control.

²Univiçosa, Viçosa, MG, Brasil.

*Apoio financeiro: CNPq.

Os trematódeos *Eurytrema pancreaticum* e *E. coelomaticum* são parasitos que habitam normalmente na luz dos ductos pancreáticos, observados ocasionalmente nos ductos biliares e raramente no intestino delgado de ruminantes. O parasitismo por estas espécies já foi observado em bovinos, caprinos, ovinos, bubalinos, suínos, camelídeos, cervídeos, leporinos e em seres humanos (BASSANI et al., 2006).

O ciclo biológico deste trematoda é heteroxeno, sendo o primeiro hospedeiro intermediário um molusco do gênero *Bradybaena* e o segundo um artrópode do gênero *Conocephalus* (BASSANI et al., 2006). A infecção se dá por ingestão acidental dos insetos ou de metacercárias eliminadas sobre as pastagens.

A ineficiência de produtos anti-helmínticos tem levado a pesquisa de alternativas para o controle de parasitoses, sendo o controle biológico das parasitoses gastrintestinais dos animais domésticos realizado com fungos nematófagos uma medida promissora (ARAÚJO; BELÉM, 1993; ARAÚJO et al., 1998; ARAÚJO et al., 2007). Esses fungos se comportam como antagonistas naturais, promovendo a captura e a destruição do parasito e, de acordo com seu modo de ação, são classificados em endoparasitas, predadores e oportunistas (parasitas de ovos). Desses, os grupos dos predadores e oportunistas têm sido estudados no controle biológico das helmintoses apresentando resultados promissores (LYSEK, 1978; ARAÚJO et al., 1995).

No grupo dos fungos predadores destacam-se os gêneros *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* e *Monacrosporium*, devido à eficácia no controle biológico de nematóides (DIMANDER et al., 2003).

Entre os oportunistas, destaca-se a espécie *Pochonia chlamydosporia*, que coloniza e penetra os ovos de helmintos por meio de estruturas denominadas apressórios desenvolvidos a partir de hifas indiferenciadas (LYSEK, 1976, 1978; LYSEK; STERBA, 1991).

O presente trabalho avaliou a ação *in vitro* de isolados brasileiros de fungos nematófagos *D. flagrans*, *M. thaumasium* e *P. chlamydosporia* sobre ovos de *E. coelomaticum*.

Fungos

Quatro isolados de fungos nematófagos (um de *D. flagrans*, um de *M. thaumasium* e dois de *P. chlamydosporia*), obtidos de solo brasileiro, foram mantidos no escuro em tubos de cultivo contendo carneal-ágar 2% (CMA 2%) a 4° C em geladeira, no Laboratório de Parasitologia Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

Discos de 4 mm de diâmetro contendo os isolados foram extraídos de tubos de cultivo, e transferidos para placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro contendo 20 mL de batata-dextrose-ágar 2% (BDA 2%). Essas placas foram mantidas a 25° C, no escuro, durante 10

dias. Após o crescimento dos isolados, novos discos de cultura foram transferidos para placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro contendo ágar-água 2% (AA 2%) por 10 dias.

Ovos de *Eurytrema coelomaticum*

Os ovos de *E. coelomaticum* foram recuperados a partir da dissecação de exemplares adultos, colhidos de pâncreas de bovinos naturalmente infectados provenientes de abatedouros.

Mil ovos de *E. coelomaticum* foram vertidos sobre cada uma das culturas, incubada por 10 dias a 25° C em meio AA 2% em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro. O mesmo procedimento foi realizado em placas de Petri contendo apenas os meio AA 2% (sem fungo), constituindo o grupo controle. Cada um dos grupos foi constituído por 10 repetições.

Nos intervalos de 7, 10 e 14 dias, aproximadamente 100 ovos foram retirados de cada placa de acordo com a técnica descrita por ARAÚJO et al. (1995). Os ovos foram então colocados em lâminas de vidro com uma gota de azul de Amam 1% e avaliados em microscopia de luz de acordo com os parâmetros estabelecidos por LYSEK et al. (1982): 1) efeito do tipo 1, efeito lítico sem prejuízo morfológico à casca do ovo, onde hifas são observadas aderidas à casca; 2) efeito do tipo 2, efeito lítico com alteração morfológica da casca e embrião do ovo, sem penetração de hifas através da casca; 3) efeito do tipo 3, efeito lítico com alteração morfológica do embrião e da casca, além de penetração de hifas e colonização interna do ovo.

Os dados de cada intervalo estudado foram submetidos ao teste não paramétrico Friedman com 1% de probabilidade de acordo com AYRES et al. (2003).

Na Tabela 1 está apresentada a atividade ovicida das diversas espécies de fungo nos dias 7, 10 e 14 após tratamento.

O fungo *D. flagrans* (AC001) apresentou somente efeito do tipo 1, com resultados percentuais de 54,5%, 58,1% e 61,8% sobre os ovos de *E. coelomaticum* nos intervalos de 7, 10 e 14 dias, respectivamente. Esses resultados são semelhantes aos registrados por BRAGA et al. (2007) que utilizaram três isolados fúngicos, dentre eles, *D. flagrans*, sobre ovos de *Ascaris lumbricoides*, apresentando efeito do tipo 1 de 30,0%, 52,0% e 68,0% nos intervalos de sete, 10 e 14 dias, respectivamente.

O fungo *M. thaumasium* (NF34) demonstrou também apenas o efeito do tipo 1 a partir do sétimo dia de observação com os seguintes resultados: 61,9%, 62,7% e 69,0% respectivamente nos dias 7, 10 e 14. Da mesma forma, esse isolado apresentou o efeito do tipo 1 semelhantes aos observados por BRAGA et al. (2007) sobre ovos de *A. lumbricoides* com os seguintes valores: 48,0%; 42,0% e 62,0% aos 7, 10 e 14 dias respectivamente.

Tabela 1 - Percentuais e desvios padrão da atividade ovicida dos fungos nematófagos *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium thaumasium* (NF34) e *Pochonia chlamydosporia* (VC1 e VC4), e do grupo controle (sem fungo), sobre ovos de *Eurytrema coelomaticum* no dia 7, 10 e 14 dias após tratamento.

Isolados	Efeitos aos 7 dias		
	Efeito tipo 1(%) *	Efeito tipo 2 (%) **	Efeito tipo 3 (%) ***
AC001	54,5 ^A ±21,8	0 ^B ±0	0 ^C ±0
NF34	61,9 ^A ±22,0	0 ^B ±0	0 ^C ±0
VC1	19,5 ^B ±10,5	24,1 ^A ±12,0	27,2 ^A ±12,5
VC4	25,0 ^B ±11,4	26,4 ^A ±10,9	15,0 ^B ±9,2
Controle	0 ^C ±0	0 ^B ±0	0 ^C ±0
Isolados	Efeitos aos 10 dias		
	Efeito tipo 1(%) *	Efeito tipo 2 (%) **	Efeito tipo 3 (%) ***
AC001	58,1 ^A ±21,2	0 ^B ±0	0 ^B ±0
NF34	62,7 ^A ±22,4	0 ^B ±0	0 ^B ±0
VC1	21,8 ^B ±10,0	23,6 ^A ±9,5	23,1 ^A ±10,5
VC4	24,5 ^B ±9,8	24,5 ^A ±10,6	25,4 ^A ±9,6
Controle	0 ^C ±0	0 ^B ±0	0 ^B ±0
Isolados	Efeitos aos 14 dias		
	Efeito tipo 1(%) *	Efeito tipo 2 (%) **	Efeito tipo 3 (%) ***
AC001	61,8 ^A ±21,9	0 ^B ±0	0 ^B ±0
NF34	69,0 ^A ±24,0	0 ^B ±0	0 ^B ±0
VC1	19,5 ^B ±11,0	26,8 ^A ±9,8	25,0 ^A ±10,3
VC4	25,0 ^B ±13,8	28,6 ^A ±12,1	21,8 ^A ±10,1
Controle	0 ^C ±0	0 ^C ±0	0 ^B ±0

Percentual seguido de letra diferente maiúscula na coluna difere estatisticamente ($P < 0,01$) pelo teste de Friedman.

*efeito lítico sem prejuízo morfológico à casca do ovo, onde as hifas são observadas aderidas à casca.

**efeito lítico com alteração morfológica da casca do ovo e do embrião, sem penetração de hifas através da casca.

***efeito lítico com alteração morfológica da casca e do embrião, além da penetração de hifas e colonização interna do ovo.

Comparando-se a ação de AC001 e NF34, observou-se que não houve diferença significativa ($p > 0,01$) para o efeito tipo 1, demonstrando que ambos isolados causaram efeitos similares sobre os ovos de *E. coelomaticum*. Além disso, foi observado que a atividade ovicida dos isolados AC001 e NF34, para os efeitos dos tipos 1 e 2, equipararam-se também aos resultados observados para os isolados de *Artrobotryx robusta* e *A. conoides* sobre ovos de *Toxocara canis* (ARAÚJO *et al.*, 1995).

Os isolados VC1 e VC4 de *P. chlamydosporia* causaram os efeitos dos tipos 1, 2 e 3 em todos os intervalos estudados. Segundo LYSEK *et al.* (1982), ação ovicida de um fungo é caracterizada pelo efeito tipo 3 (efeito lítico com alteração morfológica do embrião e da casca e colonização interna do ovo). No presente trabalho, o isolado VC1 causou o efeito do tipo 3, com mortalidade de 27,2%, 23,1% e 25,0%, nos intervalos de 7, 10 e 14 dias, respectivamente. Já o isolado VC4 apresentou o efeito do tipo 3 em 15,0%, 25,4% e 21,8% nos dias 7, 10 e 14, respectivamente. Não foi observada diferença ($p > 0,01$) entre VC1 e VC4 em relação aos efeitos estudados.

BRAGA *et al.* (2007) comprovaram a ação de *P. chlamydosporia*, isolados VC1 e VC4, sobre ovos de *A. lumbricoides* nos intervalos de 7, 10 e 14 dias após tratamento, observando que os isolados apresentaram efeito tipo 3 de 20% e 18%, 25% e 22%, 30% e 26%, respectivamente. No presente trabalho, os percentuais médios da atividade ovicida desses isolados sobre ovos de *E. coelomaticum* foram maiores em relação aos ovos de *A. lumbricoides*. Esses resultados podem indicar alguma diferença no processo de interação entre esses isolados e os ovos dos helmintos estudados.

Em relação à ação de *P. chlamydosporia* sobre alguns gêneros de helmintos, este fato sugere existir alguma diferença no processo de interação entre o fungo e os diferentes tipos de ovos. Fatores como o diâmetro e a resistência dos ovos no meio ambiente poderiam ser responsáveis pela ação distinta do fungo.

Embora os fungos *D. flagrans* e *M. thaumasium* sejam reconhecidos como fungos predadores, utilizados no controle apenas de larvas de helmintos (ARAÚJO *et al.*, 2004; ARAÚJO *et al.*, 2006a; ARAÚJO *et al.*, 2006b), foram observadas hifas de *D. flagrans* e *M. thaumasium* aderidas à casca do ovo, mas, necessariamente não

levaram à destruição deste. Para se ter uma resposta mais precisa sobre isto, seria necessário aplicar testes de viabilidade, ou mesmo aumentar o contato dos ovos ao fungo.

A ação do fungo *P. chlamydosporia* foi observada no presente trabalho, onde o efeito do tipo 3, quando confrontado com os demais isolados, foi mantido nos intervalos estudados a partir de 7, 10 e 14 dias.

Os ovos de *E. coelomaticum* chegam ao exterior junto com as fezes dos hospedeiros definitivos e serão ingeridos pelos hospedeiros intermediários (FREITAS, 1982). Dessa forma, por meio dos resultados percentuais obtidos no presente estudo, sugere-se a utilização de *P. chlamydosporia* como uma alternativa de controle biológico dos ovos presentes nas fezes, partindo-se do princípio que sua ação será no ambiente fecal, evitando com isso sua eclosão e, conseqüentemente, o desenvolvimento de metacercárias.

O fungo *P. chlamydosporia* apresentou atividade ovicida sobre ovos de *E. coelomaticum* e poderia atuar como agente de controle biológico de *Eurytrema coelomaticum*.

AGRADECIMENTO

Ao CNPq pela concessão das bolsas.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, J.V.; BELÉM P.A.D. Efeito anti-helmíntico do albendazole sobre a contagem de ovos de *Eurytrema* sp (Trematoda) em fezes de bovinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.45, n.1, p.111-114, 1993.
- ARAÚJO, J.V.; SANTOS, M.A.; FERRAZ, S. Efeito ovicida de fungos nematófagos sobre ovos embrionados de *Toxocara canis*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.47, n.1, p.37-42, 1995.
- ARAÚJO, J.V.; GOMES, A.P.S.; GUIMARÃES, M.P. Biological control of bovine gastrointestinal nematode parasites in southeastern Brazil by the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys robusta*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.7, n.2, p.117-122, 1998.
- ARAÚJO, J.V.; GUIMARÃES, M.P.; CAMPOS, A.K. Control of bovine gastrointestinal nematodes parasites using pellets of the nematode trapping fungus *Monacrosporium thaumasium*. *Ciência Rural*, v.34, n.2, p.457-463, 2004.
- ARAÚJO, J.V.; FREITAS, B.W.; VIEIRA, T.C.; CAMPOS, A.K. Avaliação do fungo predador *Duddingtonia flagrans* sobre larvas infectantes de *Haemonchus contortus* e *Strongyloides papillosus* de caprinos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.15, n.2, p.76-79, 2006a.
- ARAÚJO, J.V.; ASSIS, R.C.L.; CAMPOS, A.K.; MOTA, M.A. Efeito antagonístico de fungos predadores dos gêneros *Monacrosporium*, *Arthrobotrys* e *Duddingtonia* sobre larvas infectantes de *Cooperia* sp. e *Oesophagostomum* sp. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.58, n.3, p.373-380, 2006b.
- ARAÚJO, J.V.; RODRIGUES, M.L.A.; SILVA, W.W.; VIEIRA, L.S. Controle biológico de nematóides gastrintestinais de caprinos em clima semi-árido pelo fungo *Monacrosporium thaumasium*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.42, n.8, p.1177-1181, 2007.
- AYRES, M.; AYRES, JUNIOR, M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. *Aplicações estatísticas nas áreas de ciências biomédicas*. Belém: Sociedade Civil Maniraua, 2003.
- BASSANI, C.A.; SANGIONI, L.A.; SAUT, J.P.E.; YAMAMURA, M.H.; HEADLEY, S.A. Epidemiology of eurytrematosis (*Eurytrema* spp. Trematoda: Dicrocoeliidae) in slaughtered beef cattle from the central-west region of the State of Paraná, Brazilian. *Veterinary Parasitology*, v.141, n.3, p.356-361, 2006.
- BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V.; CAMPOS, A.K.; CARVALHO, R.O.; SILVA, A.R.; TAVELA, A.O.; MACIEL, A.S. Observação *in vitro* da ação dos isolados fúngicos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Verticillium chlamydosporium* sobre ovos de *Ascaris lumbricoides* (Lineu, 1758). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.40, n.3, p.356-358, 2007.
- DIMANDER, S.O.; HÖGLUND, J.; UGGLA, A.; SPÖRNDLY, E.; WALLER, P.J. Evaluation of gastrointestinal nematode parasite control strategies for first-season grazing cattle in Sweden. *Veterinary Parasitology*, v.111, n.2/3, p.192-209, 2003.
- FREITAS, M.G. *Helmintologia veterinária*. 6.ed. Belo Horizonte: Precisa, 1982. p.40-42.
- LYSEK, H. Classification of ovicide fungi according to type of ovicidity. *Acta Universitatis Palackianae Olomucensis*, v.76, n.0, p.9-13, 1976.
- LYSEK, H. A scanning electron microscope study of the effects of ovicidal fungus on the eggs of *Ascaris lumbricoides*. *Parasitology*, v.77, n.1, p.139-141, 1978.
- LYSEK, H.; FASSATIOVÁ, O.; PINEDA, N.C.; HERNÁNDEZ, N.L. Ovicidal fungi in soils f Cuba. *Folia Parasitologica*, v.29, n.3, p.265-270, 1982.
- LYSEK, H.; STERBA, J. Colonization of *Ascaris lumbricoides* eggs by the fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard. *Folia Parasitologica*, v.38, n.3, p.255-259, 1991.

Recebido em 4/12/07

Aceito em 3/1/09