

Observação *in vitro* da ação dos isolados fúngicos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Verticillium chlamydosporium* sobre ovos de *Ascaris lumbricoides* (Lineu, 1758)

In vitro observation of the action of isolates of the fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* and *Verticillium chlamydosporium* on the eggs of *Ascaris lumbricoides* (Linnaeus, 1758)

Fábio R. Braga¹, Jackson V. Araújo^{1,2}, Artur K. Campos³, Rogério O. Carvalho¹, André R. Silva¹, Alexandre O. Tavela¹ e Alessandro S. Maciel¹

RESUMO

Observou-se a ação *in vitro* dos fungos nematófagos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Verticillium chlamydosporium* sobre ovos de *Ascaris lumbricoides*. Após sete, dez e quatorze dias de interação, o fungo promissor a ser utilizado no controle biológico de *Ascaris lumbricoides* foi o *Verticillium chlamydosporium* (26-30%). Os outros fungos não foram satisfatórios.

Palavras-chaves: *Ascaris lumbricoides*. Fungos nematófagos. *Duddingtonia flagrans*. *Monacrosporium thaumasium*. *Verticillium chlamydosporium*.

ABSTRACT

The *in vitro* action of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* and *Verticillium chlamydosporium* on eggs of *Ascaris lumbricoides* was observed. After 7, 10 and 14 days of interaction, the fungus showing most promise for use in biological control over *Ascaris lumbricoides* was *Verticillium chlamydosporium* (26-30%). The other fungi did not present satisfactory results.

Key words: *Ascaris lumbricoides*. Nematophagous fungi. *Duddingtonia flagrans*. *Monacrosporium thaumasium*. *Verticillium chlamydosporium*.

No Brasil e no mundo, um alto número de pessoas está infectado por parasitas intestinais e, vários são os fatores sugeridos como causas: Uma condição sócio-econômica baixa, o aumento populacional, às constantes migrações internas a falta de saneamento básico, além de outros⁹. Embora a espécie *Ascaris lumbricoides* seja bem conhecida e muito comum em seres humanos, ainda hoje representa um problema de caráter extremamente importante para a saúde pública e de uma forma geral o problema é maior em países em desenvolvimento como o Brasil. A representatividade clínica desse parasita afeta principalmente crianças, notando-se sérias complicações².

O principal fator envolvido na transmissão é o ambiente uma vez que, os ovos de *Ascaris lumbricoides* quando eliminados nas fezes pelo hospedeiro definitivo não conseguem exercer papel

de infectividade, ou seja, não possuem capacidade de infecção que só acontecerá após algumas semanas principalmente em lugares úmidos, sombreados e com temperatura alta, podendo contaminar a água e os alimentos. As estratégias para o controle desse parasita têm demonstrado principalmente: atenção às áreas com grande densidade populacional por serem as áreas de risco¹³.

Por outro lado, o controle biológico de nematóides realizado com fungos nematófagos é uma alternativa promissora e com resultados satisfatórios⁸. A vantagem de se aliar o controle biológico realizado com fungos nematófagos com o controle químico é a abrangente atuação sobre as formas infectantes presentes nas fezes, bem como sobre os nematóides que estão parasitando o animal¹¹. Esses fungos se comportam como

1. Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2. Pesquisador do CNPq. 3. Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Viçosa, MG. Projeto financiado pela FAPEMIG e CNPq

Endereço para correspondência: Dr. Jackson Victor de Araújo. Dept^o de Veterinária/ Universidade Federal de Viçosa. Av. Ph Rolfs s/n, 36570-000 Viçosa, MG, Tel: 55 31 3899-1464 e-mail: jvictor@ufv.br.

Recebido para publicação em 30/11/2006

Aceito em 8/2/2007

antagonistas naturais de nematóides, sendo capazes de promover a captura, a morte ou mesmo a sua destruição¹⁰.

Nos trabalhos de Lysek^{5,6} e Lysek & Sterba⁷ o fungo *Verticillium chlamydosporium* demonstrou ação sobre ovos de *Ascaris lumbricoides*, provando sua eficácia como controlador biológico.

O presente trabalho procurou avaliar em diferentes intervalos a ação *in vitro* de isolados brasileiros de fungos nematófagos do gênero *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Verticillium chlamydosporium*, sobre ovos de *Ascaris lumbricoides*.

Quatro isolados de fungos nematófagos, um isolado de *Duddingtonia flagrans*, um de *Monacrosporium thaumasium* e dois *Verticillium chlamydosporium* foram mantidos em tubos de ensaio a 4°C contendo corn-meal-ágar 2% (CMA 2%) e no escuro. Esses isolados foram obtidos através da técnica de espalhamento do solo descrito por Duddington³, modificado por Santos e cols¹².

Discos de cultura de 4mm de diâmetro foram extraídos de isolados fúngicos mantidos em tubos de ensaio contendo CMA 2% transferidos para placas de Petri de 9cm de diâmetro contendo 20ml de batata-dextrose-ágar 2% (BDA 2%) mantidos a 25° C, no escuro e durante 10 dias. Após o crescimento dos isolados novos discos de cultura de 4mm de diâmetro foram transferidos para placas de Petri de 9cm diâmetro contendo 20ml de ágar-água 2% (AA 2%) e durante 10 dias.

Trinta mil ovos de *Ascaris lumbricoides* foram analisados morfológicamente ao microscópio óptico (10x) e a seguir mil ovos foram vertidos sobre a superfície das placas contendo apenas o meio AA 2% com isolados fúngicos e sem fungo (controle), permanecendo por um período de 14 dias. Nos intervalos de sete, dez e quatorze dias, cerca de cem ovos foram retirados de cada isolado e do controle com a ajuda de espátula e colocados em lâminas de vidro com uma gota de azul de Amam, e avaliados percentualmente de acordo com os parâmetros estabelecidos por Lysek⁵: sem alteração; efeito tipo 1, efeito lítico sem prejuízo morfológico à casca do ovo, onde hifas são observadas aderidas à casca; tipo 2, efeito lítico com alteração morfológica da casca e embrião do ovo, sem penetração de hifas através da casca e tipo 3, efeito lítico com alteração morfológica do embrião e da casca, além de penetração de hifas e colonização interna do ovo.

A atividade dos isolados *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium thaumasium* (NF34a) e *Verticillium chlamydosporium* (VC1 e VC4) sobre os ovos de *Ascaris lumbricoides*, segundo os parâmetros estabelecidos por Lysek⁵, é representada nas Tabelas 1, 2 e 3.

Segundo Lysek⁵, o fungo que comprovadamente apresenta a maior atividade ovicida é aquele que demonstra os maiores percentuais do tipo 3, sendo potencialmente o fungo mais eficaz, dessa forma pôde-se avaliar que os isolados AC001 e NF34 não possuem atividade ovicida. Já o fungo *Verticillium chlamydosporium* apresentou maior efeito ovicida (Figuras 1 e 2) em relação aos isolados de *Duddingtonia flagrans* e *Manacrosporium thaumasium*, que não apresentaram qualquer efeito do tipo 2 e 3. Entretanto, no decorrer dos intervalos

Tabela 1 - Percentual de atividade ovicida dos fungos nematófagos, *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Verticillium chlamydosporium* e o grupo controle sem fungos, sobre ovos de *Ascaris lumbricoides* no intervalo de 7 dias.

Grupos	Intervalo 7 dias			
	sem alteração	efeito tipo 1*	efeito tipo 2**	efeito tipo 3***
AC 001	70,0	30,0	0,0	0,0
NF 34a	62,0	48,0	0,0	0,0
VC 1	27,0	65,0	18,0	20,0
VC 4	22,0	44,0	16,0	18,0
Controle	0,0	0,0	0,0	0,0

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

**Efeito lítico com alteração morfológico 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.

Tabela 2 - Percentual de atividade ovicida dos fungos nematófagos, *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Verticillium chlamydosporium* e o grupo controle sem fungos, sobre ovos de *Ascaris lumbricoides* no intervalo de 10 dias.

Grupos	Intervalo 10 dias			
	sem alteração	efeito tipo 1*	efeito tipo 2**	efeito tipo 3***
AC 001	48,0	52,0	0,0	0,0
NF 34a	58,0	42,0	0,0	0,0
VC 1	24,0	69,0	20,0	25,0
VC 4	18,0	45,0	15,0	22,0
Controle	0,0	0,0	0,0	0,0

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

**Efeito lítico com alteração morfológico 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.

Tabela 3 - Percentual de atividade ovicida dos fungos nematófagos, *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Verticillium chlamydosporium* e o grupo controle sem fungos, sobre ovos de *Ascaris lumbricoides* no intervalo de 14 dias.

Grupos	Intervalo 14 dias			
	sem alteração	efeito tipo 1*	efeito tipo 2**	efeito tipo 3***
AC 001	32,0	68,0	0,0	0,0
NF 34a	38,0	62,0	0,0	0,0
VC 1	23,0	22,0	26,0	30,0
VC 4	22,0	32,0	20,0	26,0
Controle	0,0	0,0	0,0	0,0

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

**Efeito lítico com alteração morfológico 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.

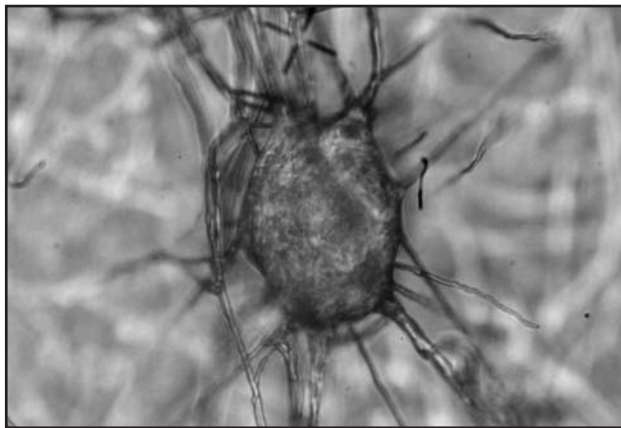


Figura 1 - Interação do fungo *Verticillium chlamydosporium* aos 21 dias com ovo de *Ascaris lumbricoides* (foto MO c/ aumento de 40X).

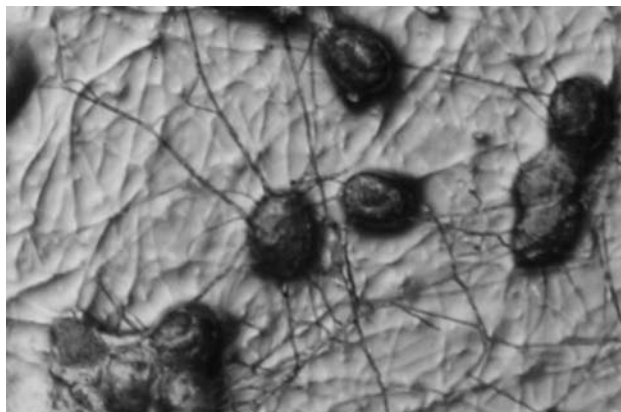


Figura 2 - Interação do fungo *Verticillium chlamydosporium* aos 14 dias com ovos de *Ascaris lumbricoides* (foto MO c/ aumento 10X).

a ação ovicida dos isolados fúngicos (VC1 e VC4), aumentou de forma crescente, e comparando se com as observações de Lysek⁵ comprovase a eficácia do *Verticillium chlamydosporium*. Em relação à comprovação da eficácia desse fungo, como ovicida, pode-se mencionar os trabalhos desenvolvidos por Lysek⁶, Lysek e Sterba⁷ que, não apenas demonstraram atividade ovicida, mas também se equipararam ao trabalho realizado por de Freire e cols⁴ que demonstrou ação do *Verticillium chlamydosporium* sobre ovos, fêmeas e formas juvenis de *Meloidogyne incognita*, um fitonematóide.

No trabalho desenvolvido por Araújo e cols¹, com o isolado fúngico *Paecilomyces lillacinus*, o resultado encontrado de atividade ovicida do tipo 3, durante o intervalo de tempo de 7 dias, foi semelhante ao demonstrado no presente.

Foi observado que a atividade ovicida dos isolados fúngicos de *Duddingtonia flagrans* e *Manacrosporium thaumasium*, para os valores percentuais do tipo 1 e 2, equiparou-se também aos percentuais encontrados para os isolados de *Arthrobotrys*

robusta e *Arthrobotrys conoides*, utilizados por Araújo e cols¹ na ação sobre ovos embrionados de *Toxocara canis*.

O presente trabalho é o primeiro relato da ação comparativa de fungos nematófagos das espécies *Duddingtonia flagrans*, *Manacrosporium thaumasium* e *Verticillium chlamydosporium* sobre ovos de *Ascaris lumbricoides*.

A importância desse estudo é sustentada pelo fato de que a transmissão de *Ascaris lumbricoides* ocorre principalmente através de ambiente contaminado¹³ e os fungos poderiam ser utilizados como ferramenta para a descontaminação ambiental por ovos de nematóide. Segundo os resultados apresentados, o fungo *Verticillium chlamydosporium* (isolados VC1 e VC4) demonstrou atividade ovicida sobre os ovos de *Ascaris lumbricoides*, sendo um fungo promissor a ser empregado no controle biológico desse nematóide.

REFERÊNCIAS

1. Araújo JV, Santos MA, Ferraz S. Efeito ovicida de fungos nematófagos sobre ovos embrionados de *Toxocara canis*. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 47: 37-42, 1995.
2. Costa-Macedo LM, Costa MC, Almeida LM. Parasitismo pelo *Ascaris lumbricoides* em crianças menores de dois anos em comunidade aberta do Rio de Janeiro. Caderno de Saúde Pública 15:173-178, 1999.
3. Duddington CL. Notes on the technique of handling predaceous fungi. Transactions of British Mycology Society 38: 97-103, 1955.
4. Freire FCO, Bridge J. Parasitism of eggs, females and juveniles of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lillacinus* and *Verticillium chlamydosporium*. Embrapa, CAPTU. Phytopathology Brazilian 10:577-596, 1985.
5. Lysek H. Classification of ovicidal fungi according to type of ovicidity. Acta University Palack Olumue 76:9-13, 1976.
6. Lysek H. A scanning electron microscope study of the effects of ovicidal fungus on the eggs of *Ascaris lumbricoides*. Parasitology 77:139-141, 1978.
7. Lysek H, Sterba J. Colonization of *Ascaris lumbricoides* eggs by the fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard. Folia. Parasitology 38:255-259, 1991.
8. Mankau R. Biological control of nematode pest by natural enemies. Annual Review Phytopathology 18:415-440, 1980.
9. Morroni CA. Parasitoses Intestinais. In: Maakaroun MF, Souza RP, Cruz AR (eds) Manual de Adolescência. Diretoria de Publicações do SBP, Rio de Janeiro, p.670-695, 1989.
10. Nordring-Hertz B, Jansson HB. Fungal development, predacity, and recognition of prey in nematode-destroying fungi. In: Klug MJ, Reddy CA (eds) Current prepectives in microbial ecology. Annual Society Microbiology, Wahshington, p. 327-333, 1984.
11. Ribeiro RR. Atividade predatória sobre larvas de Trichostrongídeos de isolados fúngicos do gênero *Monacrosporium* após a passagem pelo trato gastrointestinal de bovinos. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2003.
12. Santos MA, Ferraz S, Muchove J. Detection and ecology of nematophagous fungi from Brazilian Soils. Nematologia Brasileira 15:121-134, 1991.
13. Tshikuka JG, Scott ME, Gray DK. *Ascaris lumbricoides* infection and environmental risk factories in urban African setting. Annual Tropical Medicine Parasitology 89:505-514, 1995.