

ROSANE TEIXEIRA LELIS

**CONTROLE BIOLÓGICO DE *Echinostoma Paraensei* PELO FUNGO  
NEMATÓFAGO *Pochonia chlamydosporia***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS–BRASIL  
2014

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

L541c  
2014 Lelis, Rosane Teixeira, 1987-  
Controle biológico de *Echinostoma Paraensei* pelo fungo  
nematófito *Pochonia Chlamydosporia* / Rosane Teixeira Lelis.  
– Viçosa, MG, 2014.  
viii, 48f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Jackson Victor de Araújo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Controle biológico. 2. Fungos nematófitos. 3. *Pochonia Chlamydosporia*. 4. *Echinostoma Paraensei*. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 632.96

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por estar sempre comigo, dando-me força e coragem para enfrentar todos os desafios para chegar até aqui.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade da realização do mestrado em Medicina Veterinária.

À FAPEMIG e a CAPES, pela concessão da bolsa de estudo que possibilitou a realização do projeto e aperfeiçoamento profissional.

Ao professor Jackson Victor de Araújo, pela orientação, ensinamentos e confiança durante e o mestrado.

Aos meus pais Renato e Neuza por todo amor, confiança, conselhos, incentivo para essa realização.

Á meu namorado Henrique e meu filho João Vitor que estiveram sempre ao meu lado dando a maior força e alegria em todos os momentos e também pelo carinho que tens por mim.

Á minha irmã Rosana, meu cunhado Ricardo e o meu irmão Rogério pelo carinho e incentivo.

Aos meus avós, tios, primos que sempre torceram por mim.

Aos colegas do laboratório: Alessandra, Lorendane, Juliana, Mariana, Wendeo, Anderson, Alexandre Tavela, Mariza, Samuel, Jose Geraldo (Tuim), Ademir, Fernanda, Tiago, João Vitor, Tais, obrigada aos que, em algum momento, contribuíram na realização deste trabalho e outros que durante nosso convívio tornaram-no um momento de descontração e alegria.

Ao Fabio, muito obrigada pela orientação, amizade e pelos conselhos que foram importantes na realização deste trabalho.

A todos os professores, servidores e amigos do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.

A todos que não foram mencionados, mas que contribuíram para essa conquista

## **BIOGRAFIA**

Rosane Teixeira Lelis, filha de Renato Lopes Lelis e Neuza Teixeira Lopes Lelis, nasceu em 09 de janeiro de 1987, em Viçosa, Minas Gerais.

Em Dezembro de 2010, graduou-se em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Norte Fluminense (UENF), Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.

Em Março de 2012 ingressou no Programa de Mestrado em Medicina Veterinária, no Departamento de Veterinária – UFV, submetendo-se à defesa de dissertação em fevereiro de 2014.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	v
<b>ABSTRACT</b>	vii
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	3
2.1 Equinostomíase - <i>Echinostoma paraensei</i>	3
2.2 Controle Biológico	6
2.3 Fungos nematófagos	7
2.3.1 <i>Pochonia chlamydosporia</i>	9
2.4 Referências Bibliográficas	13
<b>3. OBJETIVOS</b>	24
3.1 Objetivo geral	24
3.2 Objetivos específicos	24
<b>4. CAPÍTULO ÚNICO - Effect of the fungus <i>Pochonia chlamydosporia</i> on <i>Echinostoma paraensei</i> (Trematoda: Echinostomatidae)</b>	25
Abstract	26
4.1 Introduction	27
4.2 Material and methods	28
4.3 Results	32
4.4 Discussion	35
4.5 References	38
<b>5. CONCLUSÕES</b>	43
<b>6. ANEXOS</b>	44

## RESUMO

LELIS, Rosane Teixeira, Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Controle biológico de *Echinostoma Paraensei* pelo fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia***. Orientador: Jackson Victor de Araújo. Co-orientador: Fabio Ribeiro Braga.

*Echinostoma paraensei* é um trematóide do gênero *Echinostoma* que pode causar a equinostomíase em humanos. Os objetivos desse trabalho foram avaliar a atividade ovicida dos isolados VC1 e VC4 do fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia* em meio sólido ágar- água 2% sobre ovos de *Echinostoma paraensei*, selecionando o isolado mais eficaz (ensaio A); avaliar o efeito ovicida (destruição dos ovos) do isolado mais eficaz em meios de cultura ágar suplementados (ensaio B) e avaliar a capacidade ovicida do extrato bruto enzimático do melhor isolado sobre ovos de *E. paraensei* (ensaio C). Mil ovos de *E. paraensei* (ensaio A) foram colocados em placas de Petri contendo ágar-água 2% (AA 2%) com um isolado do fungo *P. chlamydosporia* crescido (VC1 ou VC4) durante 10 dias, e sem fungo como controle. Seis repetições foram feitas para ambos o grupo tratado e controle. Após 15 dias, cerca de cem ovos foram retirados de cada placa e classificados de acordo com os seguintes parâmetros: tipo 1, efeito fisiológico 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, com 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. No ensaio B, ovos de *E. paraensei* foram colocados em placas de Petri com diferentes meios de cultura ágar suplementados: ágar-quitina 2% (AQ 2%), corn-meal-ágar 2% (CMA 2%), ágar-água 2% (AA 2%) e ágar- amido 2% (SSA 2%) com o isolado VC4 (o mais eficaz), no grupo controle não foram utilizados fungos. Seis repetições foram feitas para cada tratamento. Depois de 25 dias, cem ovos foram retirados de cada placa e o efeito ovicida foi avaliado de acordo com os parâmetros já citados. No ensaio C, mil ovos de *E. paraensei* foram vertidos para placas de Petri com 5ml de extrato bruto do isolado VC4 constituindo o grupo tratado. O grupo controle tinha 1.000 ovos em 10 ml de

água destilada nas placas de Petri. Cada tratamento foi constituído por seis repetições. Após 7 dias, foram contados o número total de ovos de *E. paraensei* presentes em cada placa dos grupos tratado e controle de acordo com a metodologia descrita por Mukhtar e Pervaz. No ensaio A, foi observado que não houve diferença ( $p>0,05$ ) na atividade ovicida entre os isolados testados, contudo, o maior percentual para a atividade ovicida (efeito do tipo 3) foi demonstrado pelo isolado VC4. No ensaio B, o meio de cultura ágar- amido 2% (SSA 2%) apresentou os melhores resultados para a destruição dos ovos ao final de 25 dias de interação, com um percentual de 46.6%. No ensaio C, o extrato bruto de VC4 demonstrou ser eficaz na destruição dos ovos de *E. paraensei* ao final de 7 dias com um percentual de redução de 53%. Os resultados dos ensaios experimentais *in vitro* A, B e C demonstraram que *P. chlamydosporia* (VC1 e VC4) influenciou de forma negativa sobre os ovos de *E. paraensei*, e assim pode ser considerado como um potencial candidato a controlador biológico desse helminto.

## ABSTRACT

LELIS, Rosane Teixeira, Universidade Federal de Viçosa, February, 2014. **Biological control of *Echinostoma Paraensei* by nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia***. Adviser: Jackson Victor Araujo. Co-advisor: Fabio Ribeiro Braga.

*Echinostoma paraensei* is a trematode of the genus *Echinostoma* that can cause echinostomiasis in humans. The aims of this study were to evaluate the ovicidal activity of the isolates VC1 and VC4 of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* on solid medium containing 2% water-agar(2% WA) on eggs of *E. paraensei*, selecting the most efficient isolate (assay A), evaluate the ovicidal effect (destruction of eggs) of most effective isolate on supplemented agar culture media (assay B), and to evaluate the ovicidal capacity of crude enzymatic extract of most effective isolate on *E. paraensei* eggs (assay C). One thousand eggs of *E. paraensei* (assay A) were placed in Petri dishes containing 2% WA with one isolate of fungus *P. chlamydosporia* (VC1 or VC4) grown for 10 days, and without fungus as control. Both the treated and control group consisted of six replicates. After 15 days, approximately one hundred eggs were removed from each dish and classified according to the following parameters: type 1 effect, physiological effect without morphological damage to eggshell, where hyphae are observed attached to the shell; type 2 effect, lytic effect with morphological alteration of embryo and egg shell with hyphal penetration through the shell; and type 3 effect, lytic effect with morphological alteration of embryo and eggshell, in addition to hyphal penetration and internal egg colonization. In assay B, *E. paraensei* eggs were placed in Petri dishes with different supplemented agar culture media: 2% chitin- agar (2% AC), 2% corn-meal-agar (2% CMA), 2% WA and 2% starch-agar (2% SSA) with isolate VC4 (the most effective); in control group were not used fungus. Each treatment consisted of six replicates. After 25 days, one hundred eggs were removed from each dish and the ovicidal effect was evaluated according to the parameters already mentioned. In assay C, one thousand *E. paraensei* eggs were poured into Petri dishes with 5 ml of isolate VC4 crude extract constituting the treated group. The control group contained

one thousand eggs in 10 ml of distilled water in Petri dishes. Each treatment consisted of six replicates. After 7 days, the total number of *E. paraensei* eggs present on each dish of the treated and control groups were counted according to the methodology described by Mukhtar and Pervaz. In assay A, there was no difference ( $p > 0.05$ ) in ovicidal activity among the tested isolates; however, the highest percentage for ovicidal activity (type 3 effect) was demonstrated by the isolate VC4. In assay B, the culture medium starch–agar showed the best results for the destruction of the eggs at the end of 25 days of interaction, with a percentage of 46.6%. In assay C, the crude extract of VC4 was effective in the destruction of *E. paraensei* eggs at the end of 7 days, with a percentage reduction of 53%. Results of *in vitro* experimental assay A, B and C have shown that *P. chlamydosporia* (VC1 and VC4) had negative influence on the *E. paraensei* eggs, and thus can be considered as a potential candidate for the biological control of this helminth.

## 1- INTRODUÇÃO

Os humanos são acometidos por numerosas zoonoses parasitárias de origem alimentar, sendo a grande maioria causada por helmintos (Acha & Szyfres, 2003). As parasitoses causadas por trematóides continuam sendo um problema de saúde pública, apesar das mudanças nos hábitos alimentares em todo o mundo, as alterações nas práticas sociais e agrícolas, educação para a saúde, a industrialização, a alteração ambiental e anti-helmínticos de largo espectro, ainda são persistentemente endêmicas em algumas partes do mundo (Fried et al., 2004).

No passado, estas helmintoses limitavam-se apenas às áreas restritas do planeta, caracterizadas por baixo desenvolvimento econômico ou com hábitos alimentares específicos. Entretanto, nas últimas décadas, estas enfermidades expandiram-se por diversas regiões em virtude da globalização que permitiu um maior fluxo de alimentos e pessoas entre diferentes países e causou a incorporação da culinária tradicional de algumas culturas no cotidiano de outras (Chai et al., 2005).

A equinostomíase é causada por trematóides do gênero *Echinostoma*, que acomete o intestino de vários animais selvagens e domésticos e, também, os seres humanos. A contaminação ocorre pela ingestão de carne crua ou mal cozida de molusco, peixe ou anfíbios contendo metacercárias encistadas. Seus sintomas envolvem anemia, diarreia, dor abdominal entre outros (Graczyk & Fried, 1998).

Várias espécies de *Echinostoma* estão associadas à equinostomíase, uma delas é *Echinostoma paraensei*, uma espécie brasileira de *Echinostoma*, que foi descrita por Lie e Basch (1967), encontrada naturalmente infectando *Biomphalaria glabrata*, seu hospedeiro intermediário. Possui como hospedeiro definitivo natural o roedor silvestre semi-aquático *Nectomys squamipes* (Maldonado et al., 2001b).

Considerando que *E. paraensei* é uma espécie com potencial zoonótico, capaz de infectar os seres humanos e animais selvagens (Tunholi et al., 2011), deve-se criar medidas que possam ser usadas para seu possível controle. Como parte do seu ciclo de vida ocorre no ambiente, propõe-se medidas que

possam interferir no seu desenvolvimento. Assim, sugere-se o controle biológico como uma alternativa promissora que reduz as infecções causadas por helmintos parasitos gastrintestinais, e cuja ação se dá por meio de organismos vivos que atuam como antagonistas naturais no ambiente (Araújo et al., 2004).

Entre esses antagonistas estão os fungos nematófagos capazes de promover a captura, a morte ou até mesmo a destruição de helmintos (Braga et al., 2007), destacando-se o fungo ovicida *Pochonia chlamydosporia*, que tem sido utilizada com sucesso sobre ovos de helmintos parasitos de animais e humanos (Braga et al., 2010b; Lysek et al., 1976; Braga et al., 2008a, b).

Desta forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a ação *in vitro* do fungo ovicida *P. chlamydosporia* sobre ovos de *E. paraensei*.

## 2 - REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Equinostomíase - *Echinostoma paraensei*

A equinostomíase é uma parasitose causada por trematóides do gênero *Echinostoma*, podendo infectar animais selvagens e domésticos e, também, os seres humanos, logo, representam um importante agente de infecção intestinal de interesse médico e veterinário (Fried & Graczyk, 2000). É relacionada a pelo menos dezesseis espécies de Echinostomatídeos, sendo endêmica na China, Taiwan, Índia, Coréia, Malásia, Filipinas e Indonésia (Fried et al., 2004).

A infecção ocorre pela ingestão de metacercárias encistadas em alimentos crus ou mal cozidos, como moluscos, peixes, crustáceos e anfíbios, que constituem uma parte substancial da dieta em áreas endêmicas (Graczyk & Fried, 1998; Fried et al., 2004).

Em muitos países, a equinostomíase é agravada por fatores sócio-econômicos como a pobreza, a desnutrição, aumento do mercado livre-alimentar, falta de inspeção alimentar, saneamento, outras helmintoses, declínio nas condições econômicas (Ujiié, 1963; Carney, 1991) e um pobre conhecimento sobre infecções por trematóides pelas autoridades de saúde pública (Dixon & Flohr, 1997). A equinostomíase em áreas endêmicas ocorre focalmente e está associada com práticas sócio-culturais comuns (Carney, 1991).

Morfologicamente, os *Echinostoma* são caracterizados por apresentarem um ou dois colares compostos por grandes espinhos envolvendo a região oral e interrompidos na face ventral, são pequenos, apresentam 3-10 mm de comprimento e 1-3 mm de largura. O padrão em que os espinhos se encontram organizados e o tamanho destes é fundamental para se caracterizar o gênero e até mesmo as espécies pertencentes a este gênero (Kostadinova & Gibson, 2000).

Os parasitos do gênero *Echinostoma* apresentam um complicado ciclo de vida de sete gerações (ovo, miracídio, esporocisto, rédia, cercária, metacercária e adulto) envolvendo dois hospedeiros intermediários e um hospedeiro definitivo. O ciclo depende, quase em sua totalidade, da presença

de água para desenvolvimento dos estágios larvares. Os ovos não embrionados são liberados junto com as fezes e entram em contato com a água. Após um período médio de dez dias, o ovo libera um miracídeo que nada e penetra ativamente em alguma parte mole do corpo do caramujo. Geralmente no local da penetração, o miracídeo se transforma em esporocisto. Este migra para a cavidade cardíaca ou aorta, depois de cerca de uma semana o esporocisto produz a primeira geração de rédia. Esta, por sua vez, irá produzir novas gerações de rédia (que podem ser várias). A primeira geração de rédia produz apenas rédia, mas da segunda geração em diante pode-se observar tanto produção de rédia como cercária. Após migrarem para várias partes do corpo do hospedeiro, as cercarias aumentam de tamanho e são liberadas na água. O encistamento das cercárias ocorre na superfície ou dentro do segundo hospedeiro intermediário. O segundo hospedeiro intermediário pode ser caramujo ou outro invertebrado, e ainda alguns anfíbios e peixes. A cercária encistada, agora conhecida como metacercária, é ingerida pelo hospedeiro definitivo, por exemplo humano, quando este consome um hospedeiro intermediário contaminado. Uma vez dentro do organismo, a metacercária se desenvolve dando origem a adultos localizados em lugares específicos no tubo digestivo do hospedeiro (Lie & Basch, 1967; Hsu et al., 1968; Lie & Nasemary, 1973; Lo, 1995; Fried & Huffman, 1996; Fried & Graczyk, 2000; Toledo et al., 2000).

Alguns autores separaram a doença em dois ciclos de vida, o ciclo humano e o ciclo selvagem (que tem potencial zoonótico), devido à ampla dispersão pela Ásia e a variabilidade de espécies causadoras. No ciclo selvagem, os roedores são os hospedeiros mais comuns desta parasitose, sendo o homem acometido ocasionalmente. Outros mamíferos, como cães e gatos, também podem servir como hospedeiro para *Echinostoma*, bem como aves (galinha e patos) e cobras terrestres que se alimentam de animais. O ciclo humano ocorre quando o homem é o hospedeiro definitivo e ele mesmo contamina e adquire a doença a partir de alimentos contaminados com metacercárias, sendo que, esse ciclo ocorre em áreas endêmicas (Neto et al., 2008; Belding, 1964; Carney et al., 1980; Bundy et al., 1991).

Dados de morbidade e mortalidade por equinostomíase são difíceis de serem obtidos, principalmente, porque seus sintomas são semelhantes aos de outras helmintoses intestinais (Chai & Lee, 1990). Os sintomas clínicos estão relacionados à carga parasitária (Bandyopathy & Nandy, 1986; Chai et al., 1994). Para infecções moderadas os sintomas são tonturas, dor de cabeça, dor de estômago, ligeira anemia e fezes moles (Chattopadyay et al., 1990; Bundy et al., 1991; Anonymous, 1995b). Infecções pesadas estão associadas com a eosinofilia, dor abdominal, diarreia aquosa profusa, anemia, edema e anorexia (Chattopadyay et al., 1990; Anonymous, 1995b). *Echinostoma* danificam a mucosa intestinal, provocando extensas erosões intestinais e duodenais e inflamações catarrais (Anonymous, 1995b).

No Brasil, os ovos de *Equinostoma* spp. foram vistos em fezes de um corpo humano parcialmente mumificado entre 600 e 1200 anos atrás (Sianto et al., 2005). Contudo, recentemente, nenhum caso de infecção humana tem sido relatado, embora tenham sido encontrados infectando animais de interesse comercial, tais como patos, cães, porcos e galinhas e também em roedores e aves selvagens, indicando um grande potencial zoonótico (Maldonado & Lanfredi, 2008).

*Echinostoma paraensei* foi descrito no Brasil a partir de *Biomphalaria glabrata* naturalmente infectada e coletada na cidade de Belo Horizonte, no estado de Minas Gerais. Seu ciclo biológico foi desenvolvido em laboratório utilizando-se roedores como hospedeiros definitivos (Lie & Basch, 1967). Maldonado et al. (2001b) isolaram *E. paraensei* a partir do roedor silvestre *Nectomys squamipes* proveniente do município de Sumidouro, Estado do Rio de Janeiro, sendo este, portanto, considerado o hospedeiro definitivo natural do parasito (Maldonado et al., 2006). Como todos os Echinostomatídeos, esta espécie apresenta um potencial zoonótico (Carney, 1991; Tangtrongchitr & Monzon, 1991; Graczyk & Fried, 1998). Ultimamente *E. paraensei* tem sido utilizado como modelo experimental em vários estudos sobre a relação parasita-hospedeiro (Maldonado et al., 2001c; Pinheiro et al., 2009; Tunholi-Alves et al., 2011; Garcia et al., 2011).

O ciclo biológico de *E. paraensei* foi reestudado, confirmando-se sua compatibilidade apenas para mamíferos (*Mesocricetus auratus*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* e *N. squamipes*) e sua incompatibilidade para se desenvolver em aves. Além disso, foi observada a sua compatibilidade com os moluscos *Lymnaea collumela*, *Physa marmorata* e *Biomphalaria glabrata* (Maldonado et al., 2001a).

O diagnóstico da equinostomíase é feito encontrando ovos não embrionados característicos em amostras fecais. Como o ovo varia de tamanho entre as espécies de *Echinostoma* (Bandyopathy & Nandy, 1986), a identificação das espécies pode ser feita com base na morfologia de vermes adultos após o tratamento anti-helmíntico (Graczyk & Fried, 1994,1995; Graczyk, 1997). Uma das principais características que separam *E. paraensei* de outros *Echinostoma* é o pequeno tamanho das espinhas dorsais do colar em relação às das lombadas laterais e de canto (Lie & Basch, 1967; Kostadinova e Gibson, 2000).

O tratamento da equinostomíase pode ser por mebendazol (Cross et al., 1976), albendazol (Cross, 1984), praziquantel, ou niclosamida (Anonymus, 1995b). O controle de equinostomíase humana via bloqueio ou a interrupção do ciclo de vida pode ser alcançada através de diagnóstico apropriado, seguido por tratamento farmacológico e prevenção da reinfecção (Graczyk & Fried, 1998).

## **2.2. Controle Biológico**

O termo controle biológico se define como a utilização de antagonistas naturais disponíveis no ambiente, para controlar uma população de um agente causador de perdas produtivas na atividade pecuária ou agrícola (Gronvold et al., 1996).

Na prática, o controle biológico não atua como o controle químico sobre estágios internos de parasitos, mas sim, sobre os hospedeiros intermediários, paratênicos, vetores e estágios larvais de vida livre, diminuindo a fonte de infecção para os hospedeiros finais, e também causam menos efeitos negativos no ambiente que os métodos químicos (Mota et al., 2003). De acordo

com Gronvold et al. (1996), os microorganismos para serem selecionados como antagonistas naturais, eles devem possuir especificidade de ação, alta capacidade reprodutiva e suportar as condições ambientais no local em que o controle é realizado.

Vários agentes são relatados como antagonistas naturais dos helmintos como os protozoários, bactérias, vírus, ácaros, besouros e fungos (Mota et al., 2003). Destes, os fungos nematófagos constituem-se os principais antagonistas naturais dos nematóides nos solos contaminados. Estes fungos têm demonstrado bons resultados como agentes de biocontrole no combate à diversas espécies de parasitos de animais domésticos, podendo ser encontrados nos ambientes mais distintos, sendo capazes de apreender e digerir as formas livres dos nematóides (Larsen, 1999; Kerry, 2000; Ribeiro, 2003).

### **2.3. Fungos nematófagos**

São assim chamados devido à sua capacidade de infectar e se alimentar de nematóides, através do desenvolvimento de órgãos especializados na captura e destruição dos nematóides (Barron, 1977). No entanto, estudos vêm demonstrando a grande capacidade desses fungos agirem em todas as classes de helmintos, com isso, eles devem não só ser chamados de nematófagos, mas também helmintófagos (Braga & Araújo, 2014).

Eles são amplamente distribuídos e podem ser encontrados em uma grande diversidade de espécies, bem como em diferentes ecossistemas, como em solos naturais e agrícolas e em todos os tipos de matéria orgânica em decomposição (Gray, 1983). Capturam e utilizam o nematóide como fonte principal de nutrientes ou ainda apenas como suplementação para sua existência saprofítica (Waller & Faedo, 1996). Sua ação está concentrada no ambiente fecal e direcionada ao combate dos ovos e das larvas de vida livre dos geohelminto (Braga et al., 2007). São isolados do solo e de fezes novas ou velhas de animais (Gronvold et al., 1996). São organismos que apresentam micélio septado e bem desenvolvido, reproduzem-se agamicamente por esporos exógenos formados sobre ramificações das hifas (Drechsler, 1937).

Os fungos nematófagos estão catalogados em cerca de 700 espécies (Van Ooij, 2011). De acordo com a sua morfologia e características funcionais associadas à produção de estruturas especializadas para a captura de nematóides, eles podem ser divididos em três grupos: fungos predadores, fungos endoparasitas e fungos ovicidas ou oportunistas (parasitas de ovos) (Nordbring-Hertz, 1988).

A maioria das espécies dos fungos nematófagos está inserida no grupo dos predadores de nematóides. Estes fungos produzem um extenso sistema de hifas, ao longo das quais são formadas armadilhas, que capturam e retêm nematóides vivos (Barron, 1977). O aprisionamento por armadilha é seguido pela penetração das hifas na cutícula do nematóide, e logo depois ocorre o crescimento das hifas no interior do nematóide e a digestão dos conteúdos internos (Nordbring-Hertz, 2006). As hifas vegetativas são diferenciadas em seis estruturas de captura (armadilhas): hifas adesivas não diferenciadas; ramificações de hifas que sofrem anastomose, formando redes adesivas tridimensionais; ramificações adesivas, onde em algumas vezes podem se unir formando redes adesivas simples bidimensionais; nódulos adesivos; anéis constritores e anéis não constritores (Gray, 1987), a mais encontrada em fungos predadores são as redes adesivas (Mota et al., 2003).

No grupo dos endoparasitas, os fungos infectam os nematóides através de esporos, que, uma vez ingeridos, desenvolvem hifas responsáveis pela absorção do conteúdo interno do nematóide. Não há desenvolvimento de hifas vegetativas fora do corpo do hospedeiro, mas somente hifas férteis ou conidióforos contendo esporos (Mota et al., 2003; Araújo et al., 2004).

No grupo dos ovicidas, os fungos parasitam ovos, cistos, helmintos e fêmeas de fitonematóides. Eles penetram os ovos através de hifas vegetativas, por ação mecânica, associado ou não à liberação de exoenzimas, como quitinase e protease (Nordbring-Hertz, 1988).

De acordo com Morgan-Jones e Rodríguez-Kábana (1988), a ação desses fungos é baseada na formação de hifas que penetram a casca do ovo através dos pequenos poros existentes na camada vitelínica, causando alteração na permeabilidade da casca e expandindo seu volume. A hifa aumenta de tamanho ao passar pela camada vitelínica e atravessa a camada

adjacente quitínica e lipídica. Como resultado desse processo, a camada vitelínica se divide, a camada de quitina se torna vacuolizada e a camada de lipídios se torna dispersa. Hifas endógenas emergem do ovo e produzem conidióforos, funcionando como fonte de conídios. Estes fungos colonizam o conteúdo do ovo, ou ainda a larva em desenvolvimento no seu interior. Neste grupo, destacam-se as espécies *Verticillium chlamydosporium*, atualmente, denominada *Pochonia chlamydosporia* devido às observações e análises filogenéticas das subunidades do rRNA e por apresentar produção de clamidósporos (Gams & Zaire, 2001), *Paecilomyces lilacinus* e *Dactyella ovoparasitica* (Lysek & Sterba, 1991). Dentre essas, a espécie *P. chlamydosporia* é a mais estudada (Zare & Gams, 2004).

### **2.3.1. *Pochonia chlamydosporia***

O fungo *P. chlamydosporia* foi relatado pela primeira vez em 1974 parasitando o fitonematóide, *Heterodera schachtii*, por Wilcox e Tribe, no Reino Unido. A partir de então, vem sendo estudado agindo sobre ovos, cistos e fêmeas de fitonematóides (Kerry, 2000; Hidalgo et al., 2000; Verdejo-lucas et al., 2003, Monfort et al., 2005) e também em ovos de helmintos parasitos gastrintestinais (Lysek, 1976; Braga et al., 2008a; Araujo et al., 2009).

São encontrados no solo em várias regiões do mundo, podendo ser isolados diretamente do solo ou de ovos e cistos de fitonematóides (Zare & Gams, 2004; Sun et al., 2006). Apresenta um rápido crescimento, produzindo colônias com 15-40 µm de diâmetro. Possui vários formatos de conídios, variando de elíptico, globoso e algumas vezes bacilar, possui conidióforo pequeno e hifas diferenciadas, que em algumas situações podem ser eretas, clamidósporos com paredes espessas e morfologia tridimensional (Gams & Zaire, 2001).

Segundo Lysek & Sterba (1991), a ação do fungo é baseada na formação apressorial, desenvolvido a partir de hifas indiferenciadas, que permite a colonização da superfície do ovo e a penetração é por ação mecânica e enzimática, caracterizando um efeito tipo 3 (destruição de ovos) (Lysek, 1976, 1978). O apressório é a primeira estrutura mecânica formada por

fungos ovicidas, permitindo a aderência à superfície do hospedeiro e proporcionando força mecânica para a penetração do ovo (Lysek et al., 1982). A atividade enzimática é provocada pela ação da enzima protease-serino-alcalina (VCP1), que está envolvida no início do processo de infecção, ela é responsável pela remoção da membrana vitelina da casca do ovo (Segers et al., 1994). De acordo com Kerry (2000) as enzimas hidrolíticas, proteases e quitinases são responsáveis pelo enfraquecimento da camada vitelínica e também pela remoção da camada mais externa e degradação da quitina.

Lysek (1976) criou um método qualitativo para classificar a atividade ovicida, esse método foi proposto sobre observações de ovos de *Ascaris lumbricoides*, através de microscopia eletrônica, e que atualmente foi simplificada de acordo com os seguintes parâmetros: 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, com 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. Um fungo é caracterizado como ovicida se durante o processo de infecção dos ovos apresentar o efeito do tipo 3 (Lysek & Nigenda, 1989; Lysek & Sterba, 1991).

Estudos vêm demonstrando a capacidade de destruição deste fungo sobre ovos de vários gêneros de geo-helmintos em condições laboratoriais e a campo, como em ovos de *Ancylostoma* sp (Braga et al., 2010b), *Toxocara canis* (Frassy et al., 2010; Araujo et al., 2013), *Taenia saginata* (Araujo et al., 2009), *Fasciola hepática* (Braga et al., 2008a), *Schistosoma mansoni* (Braga et al., 2008b), *Ascaridia galli* (Braga et al., 2012b) e *Ascaris lumbricoides* (Braga et al., 2007).

Pesquisas recentes têm apontado para a busca de substâncias derivadas de fungos nematófagos que tenham demonstrado atividade ovicida ou larvicida. Testes realizados com extratos brutos derivados de fungos nematófagos têm sido eficazes na redução da quantidade de larvas de nematóides gastrointestinais e prevenção da eclosão dos ovos (Braga & Araújo, 2014), uma vez que foi provado que os extratos brutos atuam com um

“pool” de enzimas extracelulares de distintas classes como as proteases (Braga et al., 2012a) e as quitinases (Esteves et al., 2009).

Os isolados fúngicos de *P. chlamydosporia* tem comprovado que são capazes de produzir extratos enzimáticos e que têm sido eficazes, podendo no futuro ser utilizado como controlador biológico de helmintos. O primeiro relato da ação de extratos enzimáticos sobre ovos de um geo-helminto foi feito por Braga et al. (2010b), que avaliaram *in vitro* a ação do extrato bruto enzimático de *P. chlamydosporia* (VC4) sobre ovos de *Ancylostoma* sp, observando um percentual de redução de 76,8% na eclosão dos ovos. Braga et al. (2010a) também testaram o extrato sobre a eclosão de ovos de Ciatostomíneos e observou um percentual de redução de 72,8% na eclosão dos ovos e este foi o primeiro relato da atividade enzimática do extrato bruto do fungo sobre nematóides gastrintestinais de cavalos. E além disso, Braga et al., 2012b testaram a ação do extrato bruto dos isolados VC1 e VC4 sobre ovos de *Ascaridia galli* observando um percentual de redução de 64,1%( VC1) e 56,5% (VC4) na eclosão dos ovos.

A procura por meios de cultura que proporcionem um rápido crescimento e esporulação dos fungos, maior disponibilidade de nutrientes, maior fonte C e N, que sirvam como substrato para a maior produção de atividades enzimáticas e que tenham custo igual ou menor que os meios industrializados é o objetivo de muitas pesquisas (Soares et al., 2008; Maciel et al., 2006; Silva et al., 2013).

O meio de cultura é o fator de maior influência no cultivo fúngico, sendo que a concentração de seus constituintes determina a qualidade e a quantidade de crescimento e se a esporulação ou o crescimento vegetativo serão dominantes (Dhingra & Sinclair, 1995) e também pode proporcionar uma maior capacidade ovicida, pois quanto mais rico for o meio de cultura maior a disponibilidade de fontes de carbono e nitrogênio, aumentando dessa forma sua capacidade ovicida (Braga et al., 2010a).

A exemplo disso, Carvalho et al. (2013) registraram a atividade ovicida dos isolados VC1 e VC4 do fungo *P. chlamydosporia* sobre ovos de *Parascaris equorum* quando crescidos em meio de cultura suplementados com quitina (AC), amido (Agar AELA), milho (Agar CMA), batata (Agar BDA) e extrato de levedura (Agar YPSSA), observaram que o melhor meio de cultura foi o AELA,

onde, após 21 dias, a porcentagem de destruição foi de 44,9%, quando comparado com outros meios de cultura. Braga et al. (2012a) observaram que este mesmo isolado fúngico demonstrou atividade enzimática positiva (proteolítica, lipolítica e amilolítica) em ágar suplementado gelatina (GA), caseína (CA), azeite (OOA) e amido (SSA) sobre ovos de *Oxyuris equi*. Esses autores viram maior atividade ovicida quando crescido em meio de cultura a base de amido, sugerindo ser uma alternativa para a utilização de meios de culturas de altos custos.

## 2.4- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA, P., SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3ª ed. **Washington DC: Organización Panamericana de la Salud**, 2003.

ANONYMOUS. Control of foodborne trematode infections. (Report of a WHO study group). **Technical report series**, 849:1–157, 1995a

ANONYMOUS. Foodborne trematode infections. **Bull Who Bulletin of the World Health Organization**, 73:397–399, 1995b.

ARAUJO, J. M., ARAÚJO, J.V., BRAGA, F.R., FERREIRA, S.R., TAVELA, A.O. *Pochonia chlamydosporia* fungus on *Toxocara canis* eggs in lab conditions. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 22:1- 4, 2013.

ARAUJO, J.M., ARAÚJO, J.V., BRAGA, F.R., CARVALHO, R.O., SILVA, A.R., CAMPOS, A.K. Interaction and ovicidal activity of nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* on *Taenia saginata* eggs. **Experimental Parasitology**, 121:338-341, 2009.

ARAÚJO, J.V, MOTA, M.A, CAMPOS, A.K. Controle biológico de helmintos parasitos de animais por fungos nematófagos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 13:165-170, 2004.

BANDYOPATHY, A.K., NANDY, A. A preliminary observation on the prevalence of echinostomes in a tribal community near Calcutta. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, 80:3016–3034, 1986.

BARRON, G.L. The Nematode-destroying fungi. **Canadian Biological Publications**, 1:140, 1977.

BELDING DL, 1964. **Textbook of Parasitology**. 3ª edition. New York: Appleton-Century-Crofts, 1374.

BRAGA, F.R., ARAÚJO, J. V., SOARES, F.E.F., TAVELA, A.O., ARAUJO, J. M., CARVALHO, R. O., FERNANDES, F.M., QUEIROZ, J.H. Enzymatic

analysis and in vitro ovicidal effect of *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* on *Oxyuris equi* eggs of horses. **Biocontrol Science and Technology** (Print), 22: 685-696, 2012a.

BRAGA, F.R., ARAÚJO, J. V., ARAUJO, J. M. , FRASSY, L.N., TAVELA, A. O., SOARES, F.E.F., CARVALHO, R. O., QUEIROZ, L.M., QUEIROZ, J.H. *Pochonia chlamydosporia* fungal activity in a solid medium and its crude extract against eggs of *Ascaridia galli*. **Journal of Helminthology**,86: 348-352, 2012b.

BRAGA, F.R., ARAÚJO, J.V., CARVALHO, R.O., SILVA, A.R., ARAUJO, J.M., FREITAS, F.E.S., GENIÊR, H.L.A., FERREIRA, S.R., QUEIROZ, J.H. Ovicidal action of a crude enzymatic extract of the fungus *Pochonia chlamydosporia* against cyathostomin eggs. **Veterinary Parasitology**, 172:264-268, 2010a.

BRAGA, F.R., ARAÚJO, J.V. Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 98:71-82, 2014.

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 Medicina Tropical**, 40:356-358, 2007.

BRAGA, F.R., CARVALHO, R.O., SILVA, A.R., ARAUJO, J.M., ARAUJO, J.V., FREITAS, F.E.S., GENIÊR, H.L.A., QUEIROZ, J.H. Ação ovicida do extrato bruto enzimático do fungo *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Ancylostoma sp.* **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 44:116-118, 2010b.

BRAGA, F.R., ARAÚJO, J.V., CAMPOS, A.K., ARAUJO, J. M., SILVA, A.S., CARVALHO, R.O., TAVELA, A.O. In vitro evaluation of the action of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* and

*Pochonia chlamydosporia* on *Fasciola hepatica* eggs. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 24: 1559-1564, 2008a.

BRAGA, F.R., Araújo, J.V., Campos, A.K., Siva, A. R., Araujo, J. M., Carvalho, R.O., Correa, D.N ; Pereira, C.A.J . In vitro evaluation of the effect of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on *Schistosoma mansoni* eggs. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 24: 2713-2716, 2008b.

BUNDY, D.A, CHANDIWANA, S.K, HOMEIDA, M.M., YOON, S., MOTT, K.E. The epidemiological implications of a multiple-infection approach to the control of human helminth infections. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 85:274–276,1991.

CARNEY, W.P. Echinostomiasis—a snail-borne intestinal trematode zoonosis. Southeast Asian. **Journal of Tropical Medicine and Public Health**, 22:206–221,1991.

CARNEY, W.P., SUDOMO, M., PURNOMO, A. Echinostomiasis: a disease that disappeared. **Tropical and geographical medicine**. 32: 101–105,1980.

CARVALHO, L. M., BRAGA, F. R., DOMINGUES, R. R., ARAUJO, J. M., LELIS, R.T., PAULA, A. T., SILVEIRA, W. F., ARAÚJO, J. V. Infection of *Parascaris equorum* eggs by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* in different culture media, **Journal of Basic Microbiology**. 53, 1-6, 2013.

CHAI, J.Y., DARWIN, M.K., LYMBERY, A.J. Fish borne parasitic zoonoses: status and issues. **International Journal for Parasitology**, 35:1233-1254, 2005.

CHAI, J.Y., HONG, S.T., LEE, S.H., LEE, G.C., MIN, Y.I. A case of echinostomiasis with ulcerative lesions in the duodenum. **Journal of Parasitology**. 32:201–204,1994.

CHAI, J.Y., LEE, S.H. Intestinal trematodes of humans in Korea: *Metagonimus*, heterophyids and echinostomes. **Journal of Parasitology**, 28:103–122,1990.

CHATTOPADYAY, U.K., DAS, M.S., PAL, D., DAS, S., MUKHERJEE, A . A case of echinostomiasis in a tribal community in Bengal. **Tropical Medicine and Parasitology**, 84:193,1990.

CROSS, J.H. Changing patterns of some trematode infections in Asia. **Arzneimittel Forschung**, 34:1224–1226,1984.

CROSS, J.H., CLARKE, M.D., COLE, W.C. Parasitic infection in humans in West Kalimantan (Borneo) Indonesia. **Tropical and geographical medicine**, 28:121–130,1976.

DHINGRA, O.D.,SINCLAIR, J.B. **Basic Plant Pathology** Methods. 2<sup>a</sup> edition. Florida: CRC Press, 434p,1995.

DIMANDER, S.O., HÖGLUND., JUGGLA, A., SPÖRNDLY, E., WALLER, P.J. Evaluation of gastro-intestinal nematode parasite control strategies for first-season grazing cattle in Sweden. **Veterinary Parasitology**.111: 192-209, 2003.

DIXON, B.R., FLOHR, R.B .Fish- and shellfish-borne trematode infections in Canada. **Journal of Tropical Medicine and Public Health**, 28:58–64,1997.

DRECHSLER, C. Some Hyphomycetes that prey on free living terricolous nematode. **Mycologia**, 23:447-552, 1937.

ESTEVEZ, I., PETEIRA, B., ATKINS, S.D., MAGAN, N., KERRY, B. Production of extracellular enzymes by different isolates of *Pochonia chlamydosporia*. **Mycological Research**, 113:867-876,2009.

FRASSY, L.N., BRAGA, F.R., SILVA, A.R., ARAÚJO, J.V., FERREIRA, S.R., FREITAS, L.G. Destrução de ovos de *Toxocara canis* pelo fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 43:102-104, 2010.

FRIED, B., GRACZYK, T. K., TAMANG, L. Food-borne intestinal trematodiasis in humans. **Parasitology Research**, 93: 159-170,2004.

FRIED, B., GRACZYK, T.K. Echinostomes as experimental models for biological research. **Kluwer, Dordrecht**, pp. 245–266, 2000.

FRIED, B., HUFFMAN, J. E. The biology of the intestinal trematode *Echinostoma caproni*. **Advances in Parasitology**, 38: 311-368,1996.

GAMS, W., ZARE, R. A revision of Verticillium sect. Prostrata. III. **Generic classification**. 73: 329-337, 2001.

GARCIA, J.S., HOOPER, C.S., SIMÕES, R.O., DOS SANTOS, M.A.J., MALDONADO, J.R., A., PINHEIRO, J. Biochemical and histological responses of *Rattus norvegicus* (Wistar) infected by *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). **Veterinary Parasitology**, 178, 86–92,2011.

GRACZYK, T.K. Trematode immunobiology in the vertebrate host. In: Fried, B., Graczyk, T.K (eds) Advances in trematode biology. **Institute of Cetacean Research**, pp 383-404,1997.

GRACZYK, T.K., FRIED, B. An ELISA for detecting anti-*Echinostoma trivolvis* (Trematoda) immunoglobulins in experimentally infected ICR mice: cross-reactivity with *Echinostoma caproni*. **Parasitology Research**, 81:710–712,1995.

GRACZYK, T.K., FRIED, B. Echinostomatiasis: a common but forgotten foodborne disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 58: 501–504, 1998.

GRACZYK, T.K., FRIED, B. ELISA method for detecting anti-*Echinostoma caproni* (Trematoda: Echinostomatidae) antibodies in experimentally infected ICR mice. **Journal of Parasitology**, 80:544–549,1994.

GRAY, N.F. Ecology of Nematophagous fungi: distribution and habitat. **Annals Applied Biological**. 102: 501–509, 1983.

GRAY, N.F. Nematophagous fungi with particular reference to their ecology. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, 62: 245-304, 1987.

GRONVOLD, J., HENRIKSEN, S.A., LARSEN, M., NANSEN, P., WOLSTRUP, J. Biological control Aspects of biological control, with special reference to arthropods, protozoans and helminths of domesticated animals. **Veterinary Parasitology**, 64:47-64, 1996.

HIDALGO, L.; BOURNE, J.M.; KERRY, B.R.; RODRIGUEZ-KÁBANA, M.G. Nematophagous *Verticillium* spp. In soils infested with *Meloidogyne* spp in Cuba: isolated and screening. **International Journal of Pest Management**, 46: 277-284, 2000.

HSU, K. C., LIE, J. K., BASCH, P. F. The life history of *Echinostoma rodriguesi* sp. N. (Trematoda: Echinostomatidae). **Journal of Parasitology**, 54: 333-339, 1968.

KERRY, B.R. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, 38: 323-441, 2000.

KOSTADINOVA, A., GIBSON, D.I. The systematics of the echinostomes. In: Fried B, Graczyk JK (eds) Echinostomes as experimental models for biological research. **Kluwer, Dordrecht**, pp 31-57, 2000.

LARSEN, M. Biological control of helminths. **International Journal for Parasitology**, .29:139-146, 1999.

LIE, J. K., NASEMARY, S. Studies on Echinostomatidae (Trematoda) in Malaysia XVI. The life history of *Echinostoma ilocanum* (Garrison, 1908). **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, 40: 59-65,1973.

LIE, K.J., BASCH, P.F. The life history of *Echinostoma paraensei* sp. n. (Trematoda: Echinostomatidae). **Journal of Parasitology**, 53:1192–1199, 1967.

LO, C. T. *Echinostoma macrorchis*: life history, population dynamics of intramolluscan stages, and the first and second intermediate hosts. **Journal of Parasitology**, 81: 569-576,1995.

LYSEK, H. ; NIGENDA, G. Capacidad de autodeshormintización del suelo. *Salud Pública de México*, 31:763–771, 1989.

LYSEK, H. Classification of ovicide fungi according to type of ovicidity. **Acta Universitatis**. Palack. Olomue. 76: 9–13,1976.

LYSEK, H., FASSATIOVÁ, O., PINEDA, N.C., HERNÁNDEZ, N.L. Ovicidal fungi in soils of Cuba. **Folia Parasitology**, 29: 265–270, 1982.

LYSEK, H., STERBA, J. Colonization of *Ascaris lumbricoides* eggs by the fungus *Verticillium chlamyosporium* Goddard. **Folia Parasitology**, 38: 255–259, 1991.

MACIEL, A.S., ARAUJO, J.V., CAMPOS, A.K. Viabilidade sobre larvas infectantes de *Ancylostoma spp.* dos fungos nematófagos *Arthrobotrys robusta*, *Duddingtonia flagrans* e *Monacrosporium thaumasium* após esporulação em diferentes meios de cultura. **Revista Brasileira de Parasitologia de Veterinária**. 15:182-187, 2006.

MALDONADO, A JR., GENTILE, R., FERNANDES-MORAES, C.C., D'ANDREA, P.S., LANFREDI, R.M., REY, L. Helminth communities of *Nectomys squamipes* naturally infected by the exotic trematode *Schistosoma mansoni* in southeastern Brazil. **Journal of Helminthology**. 80: 369-75, 2006.

MALDONADO, A. JR., VIEIRA, G.O., GARCIA, J.S., REY, L., LANFREDI, R.M. Biological aspects of a new isolate of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae): susceptibility of sympatric snails and the natural vertebrate host. **Parasitology Research**. 87: 853-59, 2001a.

MALDONADO, A. JR., LOKER, E.S., MORGAN, J.A.T., REY, L., LANFREDI, R.M. Description of the adult worms of a new Brazilian isolate of *Echinostoma paraensei* (Platyhelminthes: Digenea) from its natural vertebrate host *Nectomys squamipes* by light and scanning electron microscopy and molecular analysis. **Parasitology Research**, 87: 840–848, 2001b.

MALDONADO, A. JR., COURA, R., GARCIA, J.S., LANFREDI, R.M., REY. Changes on *Schistosoma mansoni* (Digenea: Schistosomatidae) worm load in *Nectomys squamipes* (Rodentia: Sigmodontinae) concurrently infected with *Echinostoma paraensei* (Digenea: Echinostomatidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** ,96 (Suppl. I), 96:193–198. 2001c.

MALDONADO, A. JR., LANFREDI, R.M. Echinostomes in the Wild. In: Bernard Fried; Rafael Toledo (Org). The Biology of Echinostomes: From the Molecule to the Community, vol. 6. **Springer**, 6: 129–145, 2008.

MONFORT, E., LOPEZ-LLORCA, L.V., JANSSON, H-B.; SALINAS, J. In vitro soil receptivity assays to eggs-parasitic nematophagous fungi. **Mycology Progress**. 5: 18-23, 2006.

MORGAN-JONES, G., RODRÍGUES-KÁBANA, R. Infections events in the fungus nematode system, In: Poinar O.G. & Borne J.H. (ed.) **Diseases of Nematodes**. CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 59-62. 1988.

MOTA, M.A., CAMPOS, A.K., ARAÚJO, J.V. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 23:93–100, 2003.

NETO, V.A., GRYSCHK, R.C.B., AMATO, V.S., TUON, F.F. **Parasitologia: Uma abordagem clínica**. Editora Elsevier, Rio de Janeiro, pp. 191-198, 2008.

NORDBRING-HERTZ, B., JANSSON, H.B., TUNLID, A. Nematophagous fungi. **Encyclopedia of Life Sciences**. Chichester: John Wiley & Sons. 1-11 p, 2006.

NORDBRING-HERTZ, B. Nematophagous fungi: strategies for nematode exploitation and for survival. **Microbiology Sciences**, 5:108-116, 1988.

PINHEIRO, J., MALDONADO, JR., A., LANFREDI, R.M. Physiological changes in *Lymnaea columella* (Say, 1817) (Mollusca, Gastropoda) in response to *Echinostoma paraensei* Lie and Basch, 1967 (Trematoda: Echinostomatidae) infection. **Parasitology Research**, 106: 55–59, 2009.

RIBEIRO, R.R. Atividade predatória sobre larvas de tricostrongilídeos de isolados fúngicos do gênero *Monacrosporium* após a passagem pelo trato gastrointestinal de bovinos. Viçosa: UFV, 2003. 46p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, 2003.

SEGRS, R., BUTT, T. M., KERRY, B. R., PEBERDY, J. F. The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* produces a chymoelastase-like protease which hydrolyses host nematode proteins in situ. **Microbiology**, 140: 2715–2723, 1994.

SIANTO, L., REINHARD, K.J., CHAME, M., CHAVES, S., MENDONÇA, S., GONÇALVES, M.L., FERNANDES, A., FERREIRA, L.F., ARAÚJO, A. The finding of *Echinostoma* (Trematoda: Digenea) and hookworm eggs in coprolites

collected from a Brazilian mummified body dated 600–1200 years before present. **Journal of Parasitology**, 91: 972–975, 2005.

SILVA, M.E., ARAÚJO, J.V., BRAGA, F.B, BORGES, L.A, SOARES, F.E.F., LIMA, W.S., GUIMARÃES, M.P. Mycelial mass production of fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* under different culture conditions. **Biomedcentral Research Notes**, 6: 340-343, 2013.

SOARES, P.L.M., NOZAKI, M.H., BARBOSA, B.F., SANTOS, J.M., BARBOSA, J.C. Crescimento e esporulação de duas espécies de *Arthrobotrys* corda em diferentes meios de cultura e dois ambientes. **Bioscience Journal**. 25: 263-74, 2009.

SUN, M. H., GAO, L., SHI, Y.X., LI, B.J., LIU, X.Z. Fungi and actinomycetes associated with *Meloidogyne spp.* eggs and females in China and their biocontrol potential. *Journal of Invertebrate Pathology*, 93: 22-28, 2006.

TANGTRONGCHITR, A., MONZON, R.B. Eating habits associated with *Echinostoma malayanum* infections in the Philippines Southeast Asian. **Journal of Tropical Medicine and Public Health**: 22: 212–216, 1991.

TOLEDO, R., MUNOZ-ANTOLI, C., ESTEBAN, J. G. The life cycle of *Echinostoma friedi* n. sp. (Trematoda: Echinostomatidae) in Spain and a discussion on the relationships within the "*revolutum*" group based on cercarial chaetotaxy. **Systemtic Parasitology**, 45: 199-217, 2000.

TUNHOLI, A.V.M., TUNHOLI, V.M., GÔLO, P., LUSTRINO, D., MALDONADO JR, A., BITTENCOURT, V.R.E.P., RODRIGUES, M.L.A., PINHEIRO, J. Lipid levels in *Biomphalaria glabrata* infected with different doses of *Echinostoma paraensei* miracidia. **Experimental Parasitology** 128: 212–216, 2011.

UJIE, N. On the structure and development of *Echinochasmus japonicus* and its parasitism in man. **Journal of the Formosan Medical Association**. 35:525–546, 1963.

VAN OOIJ .C. Fungal pathogenesis: hungry fungus eats nematode. **Nature Reviews Microbiology**. 9:766-767, 2011.

VERDEJO-LUCAS, S., SORRIBAS, F.J., ORNAT, C., GALEANO, M. Evaluating *Pochonia chlamydosporia* in a double-cropping system of lettuce and tomato in plastic houses infested with *Meloidogyne javanica*. **Plant Pathology**. 52:521-528, 2003.

ZARE, R., GAMS, W. A monograph of Verticillium section Prostrata. **Rostaniha Botanical Journal of Ira**, 3:1-188 p. 2004.

WALLER, P.J., FAEDO, M. The prospects for biological control of the free-living stages of nematode parasites of livestock. **International Journal for Parasitology**. 26 : 915-925,1996.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral:

Avaliar a ação *in vitro* do fungo ovicida *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Echinostoma paraensei*.

#### 3.2 Objetivos específicos:

- Avaliar a atividade ovicida dos isolados VC1 e VC4 do fungo nematófago *P. chlamydosporia* em meio sólido Ágar- água 2% sobre ovos de *E. paraensei*, selecionando o isolado mais eficaz.
- Avaliar o efeito ovicida do isolado mais eficaz de *P. chlamydosporia* em meios de cultura ágar suplementados: ágar- quitina 2% (AQ 2%), corn-meal-ágar 2% (CMA 2%), ágar-água 2% (AA 2%) e ágar- amido 2% (SSA 2%) sobre ovos de *E. paraensei*.
- Avaliar a capacidade ovicida do extrato bruto enzimático do melhor isolado de *P. chlamydosporia* sobre ovos de *E. paraensei*.

## Capítulo Único

**Effect of the fungus *Pochonia chlamydosporia* on *Echinostoma paraensei*  
(Trematoda: Echinostomatidae)**

Article submitted to Acta Tropica (impact factor 2.78)

## Abstract

*Echinostoma paraensei* is a trematode of the genus *Echinostoma* that causes echinostomiasis in humans. The objectives of this study were to: evaluate the ovicidal activity of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* (VC1 and VC4) on a solid medium 2% water–agar (2% WA) against *E. paraensei* eggs (assay A); evaluate ovicidal effect (destruction of eggs) of the isolate VC4 in supplemented culture media (assay B); and evaluate the ovicidal ability of the crude enzymatic extract (VC4) on *E. paraensei* eggs (assay C). Eggs of *E. paraensei* (assay A) were placed in Petri dishes containing 2% WA with an isolate of the fungus *P. chlamydosporia* (VC1 and VC4) grown for 10 days, and without fungus as a control and evaluated regarding their destruction. In assay B, eggs of *E. paraensei* were placed in Petri dishes with different supplemented culture media and with VC4 isolate and the destruction of eggs was examined at the end of 25 days of interaction. In assay C, effects of the crude enzymatic extract of *P. chlamydosporia* (VC4) on eggs were evaluated at the end of 7 days. In assay A, there was no difference ( $p > 0.05$ ) in ovicidal activity among the tested isolates (VC1 and VC4); however, the highest percentage for ovicidal activity (type 3 effect) was demonstrated by the isolate VC4. In assay B, the culture medium starch–agar showed the best results for the destruction of the eggs, with a percentage of 46.6% at the end of the assay. In assay C, the crude extract of VC4 was effective in the destruction of *E. paraensei* eggs, with a percentage reduction of 53%. The results of this study demonstrate that a rich culture medium with a greater availability of carbon and nitrogen may interfere directly in the predatory characteristics of ovicidal fungi.

Keywords: Nematophagous fungi, zoonosis, public health, *Pochonia chlamydosporia*, *Echinostoma paraensei*.

## 4.1 Introduction

Estimations indicate that about 40–50 million people worldwide could be infected with some foodborne trematode, *Echinostoma paraensei* being among these (Abdussalam et al., 1995; Lima dos Santos, 1995). The echinostomas have a broad geographic distribution and can infect wildlife, domestic animals, as well as humans, and so represent an important infective agent from medical and veterinary standpoints (Fried and Graczyk, 2000). In humans they can cause a zoonosis known as echinostomiasis, related to at least 16 species of Echinostomatidae (Fried et al., 2004). *Echinostoma paraensei* presents a biological cycle composed of seven stages of evolution: adult, egg, miracidium, sporocyst, redia, cercaria and metacercaria, and three categories of hosts, known as definitive host, first and second intermediate hosts (Fried & Graczyk, 2000; Lie & Bash, 1967). Non-fertilized eggs are released with the feces and come in contact with water. At the end of the life cycle in the environment, the metacercariae are ingested by the definitive host giving rise to adults located in specific places in the digestive tract of the host (Fried & Graczyk, 2000; Lie & Bash, 1967).

In this context, the infection can occur by the ingestion of molluscs, fish, or raw/undercooked meat of amphibians containing metacercariae (Roberts and Janovy, 2000). In countries where echinostomiasis is endemic, it can be aggravated by socio-economic factors such as poverty, malnutrition and lack of basic sanitation (Ujiie, 1963; Carney, 1991).

Thus, considering that part of the life cycle of this trematode occurs in the environment, alternative measures that might directly or indirectly interfere in its ontogenetic development could be used as a possible means of control. One method of biological control employs ovicidal nematophagous fungi that can act directly on the free-living stage of most helminths (Braga et al., 2008a, b; Dias et al., 2013). Accordingly, the species *Pochonia chlamydosporia* is ovicidal and naturally found in Brazilian soils (Freitas, 1982). It produces a protease (VCP1) responsible for the destruction of the eggs of helminth parasites of humans and animals (Sergers et al., 1994, 1996; Lopez-Llorca et al., 2010). Specifically, Braga et al. (2008a, b and c) demonstrated ovicidal activity against the eggs of

*Fasciola hepatica*, *Schistosoma mansoni* and *Eurytrema coelomaticum* under laboratory conditions; however, as each trematode behaves differently in its environmental life cycle, research investigating possible antagonist action by organisms from the environment is important. Many papers have already been published regarding the activity of ovicidal fungi (Braga et al., 2007; Araujo et al., 2009, 2013; Ferreira et al., 2010); however, because of distinct biological differences in evolutionary cycles and egg morphology, studies such as this can be justified and be relevant in the area of parasite control.

The objectives of this study were to: evaluate the ovicidal activity of the nematophagous fungus *P. chlamydosporia* on a solid medium 2% water–agar (2% WA); evaluate its ovicidal effect in supplemented culture media agar with distinct substrates; and evaluate the ovicidal ability of the crude enzymatic extract.

## **4.2 Materials and methods**

### **4.2.1 Eggs**

The isolate of *E. paraensei* was obtained from *Nectomys squamipes* specimens that were naturally infected, and had been captured in Sumidouro municipality, Rio de Janeiro state, Brazil in 2001 (22°02'46"S, 42°41'21"W). The life cycle had been maintained in the Laboratory of Biology and Parasitology of Wild Mammals Reservoirs (LBPMR) (Institute Oswaldo Cruz) Fiocruz, Rio de Janeiro, by passage using hamsters (*Mesocricetus auratus*) as the definitive host and *Biomphalaria glabrata* as the first and second intermediate hosts.

Adult hamsters experimentally infected with *E. paraensei* were euthanized in a CO<sub>2</sub> chamber, according to a protocol approved by the animal use ethics committee (CEUA L-074/08). Adult worms were collected from the small intestine and transferred to Petri dishes containing a 0.9% NaCl solution. The helminths' uteruses were dissected to release eggs, which were washed and incubated in dechlorinated tap water at 26°C for 14 days.

#### **4.2.2. Fungal isolates**

Isolates of *P. chlamydosporia* (VC1 and VC4) were used. The isolates VC1 and VC4 are derived from the Laboratory of Parasitology of the Veterinary Department of the Federal University of Viçosa, Minas Gerais and by means of periodic maintenance have been stored in test tubes at 4°C containing a rich culture medium based on corn.

#### **4.2.3. Transfer of fungal isolates to Petri dishes**

Culture plates of 4 mm in diameter were extracted from fungal isolates kept in test tubes containing 2% cornmeal–agar (2% CMA) and transferred to Petri dishes of 9.0 cm in diameter containing 20 ml of 2% potato dextrose–agar (2% PDA) maintained at 25°C in the dark for 10 days. After growth, new culture dishes were transferred to Petri dishes of 9.0 cm in diameter containing 20 ml of 2% water–agar (2% WA) and maintained at 25°C in a dark environment for 10 days until the moment of its use.

#### **4.2.4. Crude extract of *Pochonia chlamydosporia***

Fungal mycelia were obtained by transferring culture disks (approximately 5 mm diameter) of fungal isolates kept in 2% CMA to Erlenmeyer flasks (250 ml) containing 50 ml of liquid medium according to the methodology described by Meyers and Wiebe (2003). The liquid medium was composed of: glucose (10 g/l); casein (18.409 g/l); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (5.0 g/l); MgSO<sub>4</sub> (0.10 g/l); ZnSO<sub>4</sub> (0.0050 g/l); FeSO<sub>4</sub> (0.001 g/l); and CuSO<sub>4</sub> (0.50 mg/l). The fungal inoculum was grown in the Erlenmeyer flasks under agitation of 120 revolutions per min at pH 9.0. After 6 days the supernatant fraction was collected and filtered on Whatman filter paper n° 1 at 4°C.

#### **4.2.5. Experimental assays**

A total of three distinct steps (A, B and C) were performed. In assay A, the ovicidal activity of the two isolates VC1 and VC4 on the 2% WA solid

medium against *E. paraensei* eggs was evaluated. In assay B, the ovicidal effect (destruction of eggs) of the isolate VC4 in supplemented agar culture media were evaluated. In assay C, the ovicidal capacity of the crude enzyme extract of *P. chlamydosporia* (VC4) against eggs of *E. paraensei* was evaluated.

#### **4.2.6. Experimental assay A**

The criteria of Araújo et al. (1995) were used for the removal of *E. paraensei* eggs from Petri dishes and subsequent analysis of the ovicidal effect of the isolates of *P. chlamydosporia* according to the effect parameters 1, 2 and 3 on ovicidal activity (Lysek et al., 1982). A total of 1000 eggs of *E. paraensei* were placed in Petri dishes of 9.0 cm in diameter containing 2% WA with one isolate of grown fungus (VC1 and/or VC4) for 10 days, constituting the treated group. The control group consisted of 1000 eggs of *E. paraensei* without fungus. Six replicates were used for both the treated and control groups. At the end of 15 days after inoculation, 100 eggs were removed from each of the plates containing fungal isolates and from the control plate (without fungus). These eggs were placed on glass slides with a drop of 1% Aman blue and evaluated by light microscopy at 40x objective (Zeiss Axioskop MC80), according to the parameters established for ovicidal activity: type 1 effect, effect without morphological damage to eggshell, where hyphae are observed attached to the shell; type 2 effect, lytic effect with morphological alteration of embryo and egg shell with hyphal penetration through the shell; and type 3 effect, lytic effect with morphological alteration of embryo and eggshell, in addition to hyphal penetration and internal egg colonization according to Lysek et al. (1982).

#### **4.2.7. Experimental assay B**

*E. paraensei* eggs were placed in 9 cm Petri dishes with different supplemented agar culture media and with the isolate VC4, as follows: (1) 2% chitin–agar (2% CA); (2) 2% cornmeal–agar (2% CMA); (3) 2% water–agar (2% WA); and (4) 2% starch–agar (2% SSA). Fungi were not used in the control

group. Six repetitions were performed for each group. Each Petri dish contained 1000 eggs of *E. paraensei* with VC4 and a control group without fungi. After 25 days 100 eggs were removed from each plate containing the isolate VC4 and from the control plate (without fungus), as described by Araujo et al. (1995). These eggs were placed on glass slides with a drop of 1% Aman blue and evaluated by light microscopy at 40x objective (Zeiss Axioskop MC80) according to the parameters established for ovicidal activity.

#### **4.2.8. Experimental assay C**

The ovicidal capacity of the crude enzymatic extract of *P. chlamydosporia* (VC4) on *E. paraensei* eggs was evaluated. A total of 1000 *E. paraensei* eggs were poured into Petri dishes of 4.5 cm in diameter with 5 ml of crude extract of *P. chlamydosporia*, constituting the treated group. The control group consisted of 1000 eggs in 10 ml of distilled water in Petri dishes. Petri dishes of the treated and control groups were sealed with Rolapack film and incubated at 26°C. Each treatment consisted of six replicates. After 7 days, the total number of *E. paraensei* eggs present in each Petri dish from the treated and control groups was calculated according to the methodology described by Mukhtar and Pervaz (2003).

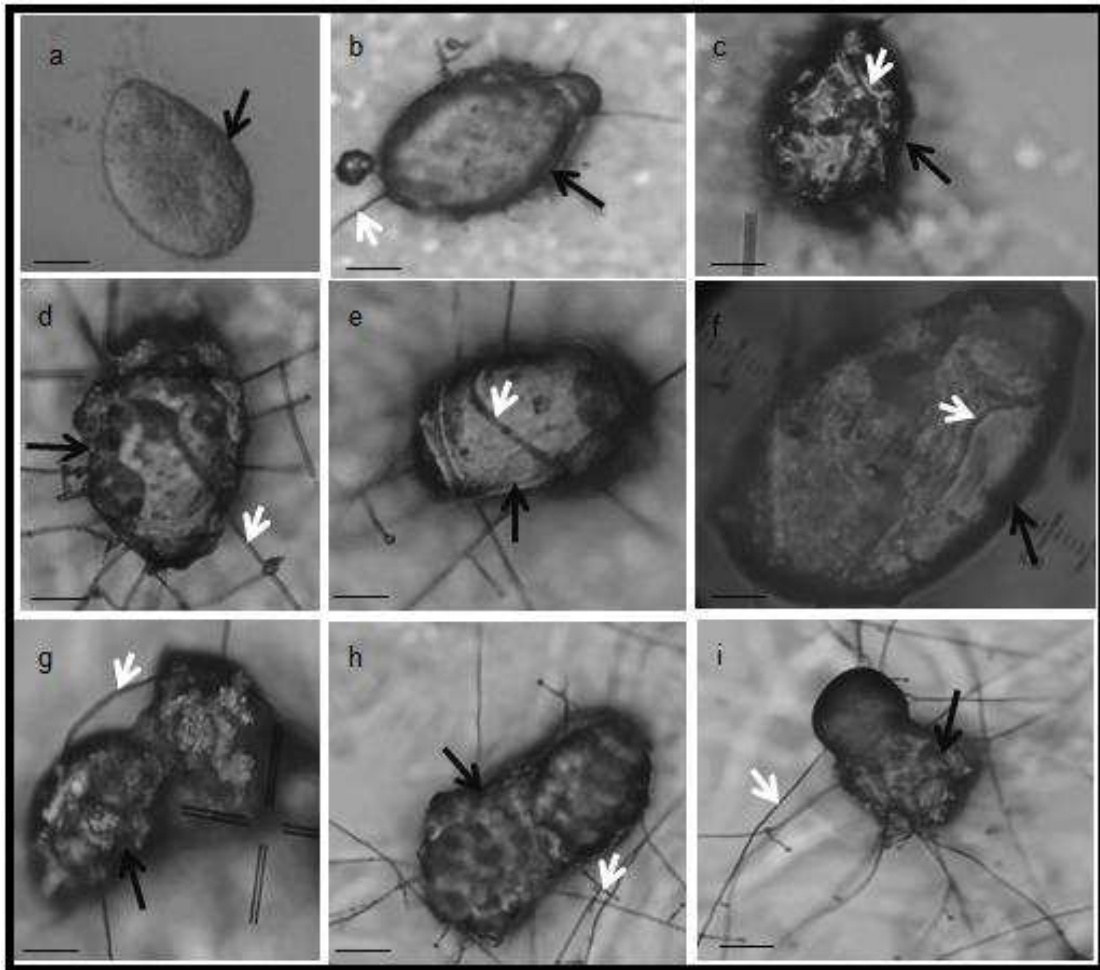
#### **4.2.9. Statistical analysis**

Data from experimental assays A, B and C over the studied intervals were subjected to non-parametric Friedman tests with 1 and 5% probability (Ayres et al., 2003). Statistical analyses were performed with the aid of BioStat 5.0 software. In assay C, the percentage reduction was calculated by using the following formula:

$$\% \text{ Reduction} = \frac{(\text{Mean number of eggs recovered in control} - \text{mean number of eggs recovered in treatment})}{\text{Mean number of eggs recovered in control}} \times 100.$$

### 4.3 Results

In assay A, both the VC1 and VC4 isolates demonstrated ovicidal activity, with a type 3 effect. This activity was confirmed by visualization of the interaction of *P. chlamydosporia* hyphae and the subsequent destruction of the *E. paraensei* eggs (Fig. 1b–i) and control group (Fig.a). However, interaction of the species *P. chlamydosporia* was also demonstrated, not only of each isolate. In Fig. 1b–c, the interaction of hyphae of the tested fungi (VC1 and/or VC4) on the surface of eggs can be observed, but not leading to their destruction. This type of interaction has been recognized as a type 1 effect. In Fig. 1d–f, there is an expansion in the shell of the parasitized eggs and therefore penetration of hyphae of the tested fungi, this being a type 2 effect. Finally, in Fig. 1g- i, there is not only a change in the morphology of the eggs, but also penetration and therefore their destruction (type 3 effect). The interval of 15 days was sufficient to follow the interaction, penetration and subsequent destruction of the *E. paraensei* eggs.



**Figure 1** - Interaction hyphae of the fungus *Pochonia chlamydosporia* (white arrows) on the *Echinostoma paraensei* eggs (black arrow) and control group at the end of 15 days. Figure (a) *Echinostoma paraensei* eggs (black arrow), control. Figure (b-c), membership of the hyphae of the fungus on the surface of eggs (white arrow), effect 1. Figure (d-f), adhesion and with hyphal penetration through the shell (white arrow), effect 2. Figure (g-i), destruction of the *E. paraensei* eggs (black arrow), effect 3. Bars: a (350  $\mu\text{m}$ ); b (400  $\mu\text{m}$ ); c (430  $\mu\text{m}$ ); d (450  $\mu\text{m}$ ); e (500  $\mu\text{m}$ ); f (750  $\mu\text{m}$ ); g (300  $\mu\text{m}$ ); h (300  $\mu\text{m}$ ); i (300  $\mu\text{m}$ ).

Regarding the values of ovicidal percentage, there was no difference ( $p > 0.05$ ) in ovicidal activity among the tested isolates. However, the highest percentage for ovicidal activity (type 3 effect) was demonstrated by isolate VC4. In relation to this fact, the isolate VC1 has shown: a type 1 effect (20.3%); a type 2 effect (28.6%); and a type 3 effect (33.9%) on the parasitized eggs. Isolate VC4 has shown: 16.6% of a type 1 effect; 31.6% of a type 2 effect; and 39.6% of a type 3 effect.

In assay B, the ovicidal effect (destruction of eggs) of the isolate VC4 in supplemented agar-based culture media (chitin, corn and starch) were evaluated. The culture medium 2% SSA showed the best results for the destruction of eggs at the end of 25 days of interaction, with a percentage of 46.6%; on the other hand, the medium supplemented with corn (2% CMA) demonstrated an average destruction of 45.0%. The medium supplemented with chitin (2% CA) showed a relatively lower value when compared with 2% SSA and 2% CMA media, but the ovicidal activity of *P. chlamydosporia* was better in that medium, compared with the 2% WA medium, demonstrating, possibly, a positive interference of chitin in the activity of this fungus. Type 1, 2 and 3 effects of isolate VC4 in the different culture media tested are shown in Table 1.

**Table 1.** Ovicidal activity of the fungal isolate *Pochonia chlamydosporia* (VC4) in medium containing 2% water–agar (2% WA), 2% chitin–agar (2% CA), 2% starch–agar (2% SSA) or 2% cornmeal–agar (2% CMA) and in the control group without fungi against eggs of *Echinostoma paraensei* after 25 days of interaction (mean percentages and standard deviations).

	<b>Effect 1</b>	<b>Effect 2</b>	<b>Effect 3</b>
VC4 (2% WA)	20.0 ± 12.2 <sup>A</sup>	35.5 ± 13.5 <sup>A</sup>	38.2 ± 21.6 <sup>A</sup>
Control	0 ± 0 <sup>B</sup>	0 ± 0 <sup>B</sup>	0 ± 0 <sup>B</sup>
VC4 (2% CA)	24.0 ± 16.8 <sup>A</sup>	26.6 ± 11.2 <sup>A</sup>	40.9 ± 17.2 <sup>A</sup>
Control	0 ± 0 <sup>B</sup>	0 ± 0 <sup>B</sup>	0 ± 0 <sup>B</sup>
VC4 (2% SSA)	22.5 ± 16.8 <sup>A</sup>	30.5 ± 15.2 <sup>A</sup>	46.6 ± 17.4 <sup>A</sup>
Control	0 ± 0 <sup>B</sup>	0 ± 0 <sup>B</sup>	0 ± 0 <sup>B</sup>
VC4 (2% CMA)	14.5 ± 18.4 <sup>A</sup>	32.7 ± 14.7 <sup>A</sup>	45.0 ± 20.3 <sup>A</sup>
Control	0 ± 0 <sup>B</sup>	0 ± 0 <sup>B</sup>	0 ± 0 <sup>B</sup>

<sup>A,B</sup> Mean values were significantly different ( $p < 0.05$ ). Friedman test. Effect 1: effect without morphological damage to eggshell. Effect 2: lytic effect with morphological alteration of embryo and egg shell with hyphal penetration through the shell. Effect 3: lytic effect with morphological alteration of embryo and eggshell, in addition to hyphal penetration and internal egg colonization.

In assay C, it was found that the crude extract (extracellular enzymes) of VC4 was shown to be effective in destroying *E. paraensei* eggs at the end of 7 days, with a percentage reduction of 53% compared with the control group.

#### 4.4 Discussion

In the present study, both tested isolates of the fungus *P. chlamydosporia* were effective in the infection and subsequent destruction of *E. paraensei* eggs (assay A), thus suggesting a biological method that could be used as an additional tool of control. In addition, previous studies using *P. chlamydosporia* (VC1 and VC4) have proposed that this fungus is an excellent biological controller, since it can greatly decrease the amount of helminth eggs in the environment (Braga et al., 2010b; De et al., 2008; Segers et al., 1996). However, the main obstacle to the use of this fungus on trematode eggs is the environment in which these parasites develop, the aquatic environment. Based on this assumption, it has been suggested that *E. paraensei* eggs, once expelled by humans in faeces, will reach the environment and be leached by rain, so reaching their place of development through infection of aquatic molluscs of the genus *Biomphalaria* (Braga et al., 2008a). Another important finding in the present study was the average of 36.7% egg destruction. This fact is interesting and shows that in a few days of the experiment the isolates tested were effective in destroying trematode eggs, which are very resilient, as suggested in the literature (De et al., 2008; Braga et al., 2008 a and b).

Ovicidal nematophagous fungi are saprophytic, but lose this characteristic in the presence of substrate and/or other sources of nutrition, and, in the specific case of this study, of *E. paraensei* eggs. Furthermore, the fungus *P. chlamydosporia* exhibits proteolytic, lipolytic and polysaccharolytic activities depending on the culture medium that is provided as a source of carbon and nitrogen (Braga et al., 2012).

The culture medium 2% WA has been routinely tested under laboratory conditions with ovicidal fungi grown on eggs of a zoonotic trematode that spends part of its life cycle in humans. Because this culture medium is poor in nutrients, it would oblige, in theory, the change from the saprophytic stage of *P.*

*chlamydosporia* to the ovicidal stage (type 3 effect), which also would justify its capacity of infection in media that are poor in carbon and nitrogen sources. These results are in agreement with De et al. (2008) and Eren and Pramer (1965) who discuss the role of nematophagous fungi on routinely used culture media under laboratory conditions. Accordingly, the richer the medium, the greater the ovicidal ability (Braga et al., 2010a). However, the production of chlamydo spores may be lower in culture media based only on agar. Finally, the use of the 2% WA medium is justified by some situations: (1) homogeneous growth of fungal isolates; (2) better visualization of the interaction of fungi *versus* helminth eggs; and (3) improved availability of this culture medium in laboratories. In addition, the present report is the first to describe the ovicidal activity on *E. paraensei* eggs.

In laboratory assay B the culture medium supplemented with starch favored a higher production of fungal structures (conidia and/or chlamydo spores). Since the grown isolate showed better results (46.6%) in the destruction of eggs, enzymatic activity may be suggested, in addition to the medium's nutritional efficacy and its provision of carbon and nitrogen. In agreement with this finding, Braga et al. (2012) have reported that this same fungal isolate showed higher ovicidal activity when grown in culture medium with starch, demonstrating that this is an important alternative to the use of culture media that require high costs.

Helminth eggs are composed of a chitin and protein shell; however, the ovicidal activity of nematophagous fungi is based specifically on the destruction of these layers (Lysek et al., 1976). In this context, ovicidal fungal growth has been suggested in culture media that can serve as substrates for higher enzyme production. As an example, chitinase production by a nematophagous fungi grown on a rich medium supplemented with chitin has proved to be possible, opening up new opportunities for its use (Braga et al., 2013).

Regarding the use of crude extract of the fungus *P. chlamydosporia*, its effectiveness has been verified; however, the authors suggest that further elucidation must be sought of the interaction of this extract *versus* helminth eggs. The literature, on this point, still lacks information; what has already been shown is the possibility of a 'pool' of extracellular enzymes from different

classes, among these chitinases (Esteves et al., 2009) and proteases (Braga et al., 2012) derived from this fungus. Thus, the characterization of these and other enzymes that may elucidate this mechanism is being sought under laboratory conditions, but it is known that the ovicidal potential of this isolate is relevant. Another specific point is to 'assume' the use of this extract in the future and for this the authors suggest the actual biological development of the parasites, since trematodes have in most cases a semi-aquatic cycle and this can help to dissipate derived 'substances' from fungi to combat free forms of life (Braga et al., 2008a, b, c). Thus, starting from the premise that *P. chlamydosporia* 'attacks' the helminth eggs in two ways: mechanical (hyphae/apresorium) and enzymatic (protease and chitinase), this study presents important information on the control of eggs from trematodes that have an aquatic life cycle.

The results of this study demonstrated that the richer the medium, the greater the availability of sources of carbon and nitrogen, which can interfere with the predatory characteristics of nematophagous fungi.

### **Acknowledgments**

The authors thank FAPEMIG, CAPES and CNPq for financial support.

#### 4.5 References

ABDUSSALAM, M., KAFERSTEIN, F. K., MOTT, K. E. Food safety measures for the control of foodborne trematode infections. **Food Control**, 6: 71-79, 1995.

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.

ARAUJO, J. M., ARAÚJO, J.V., BRAGA, F.R., FERREIRA, S.R., TAVELA, A.O. *Pochonia chlamydosporia* fungus on *Toxocara canis* eggs in lab conditions. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 22:1- 4, 2013.

ARAUJO, J.M., ARAÚJO, J.V., BRAGA, F.R., CARVALHO, R.O., SILVA, A.R., CAMPOS, A.K. Interaction and ovicidal activity of nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* on *Taenia saginata* eggs. **Experimental Parasitology**, 121:338-341,2009.

AYRES, M., AYRES, J.R.M., AYRES, D.L, SANTOS A.S. **Aplicações estatísticas nas áreas de ciências biológicas**, Belém: Sociedade civil mamirauá: Brasília CNPq. 290p, 2003.

BRAGA, F.R., ARAÚJO, J. V., SOARES, F.E.F., TAVELA, A.O., ARAUJO, J. M., CARVALHO, R. O., FERNANDES, F.M., QUEIROZ, J.H. Enzymatic analysis and in vitro ovicidal effect of *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* on *Oxyuris equi* eggs of horses. **Biocontrol Science and Technology** (Print), 22:685-696, 2012.

BRAGA, F.R., ARAÚJO, J. V., SOARES, F.E.F., ARAUJO, J. M., TAVELA, A.O., MELLO, I.N.K., CARVALHO, L. M., PAULA, A. T., LELIS, R. T., QUEIROZ, J.H. Interaction of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on *Amblyomma cajannense* engorged females and enzymatic characterization of its chitinase. **Biocontrol Science and Technology**, 23, 584-594,2013.

BRAGA, F.R., ARAÚJO, J.V., CARVALHO, R.O., SILVA, A.R., ARAUJO, J.M., FREITAS, F.E.S., GENIÊR, H.L.A., FERREIRA, S.R., QUEIROZ, J.H. Ovicidal action of a crude enzymatic extract of the fungus *Pochonia chlamydosporia* against cyathostomin eggs. **Veterinary Parasitology**, 172:264-268, 2010a.

BRAGA, F.R., ARAÚJO, J.V., CARVALHO, R.O., SILVA, A.R., ARAUJO, J.M., TAVELA, A.O. Observação *in vitro* dos fungos nematófagos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Eurytrema coelomaticum*. **Parasitología latinoamericana**. 63, 40-45, 2008c.

BRAGA, F.R., ARAÚJO, J.V., SILVA, A.R., CARVALHO, R.O., ARAUJO, J.M., FERREIRA, S.R., CARVALHO, G.R. Viability of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* after passage through the gastrointestinal tract of horses. **Veterinary Parasitology**, 168:264-268, 2010b.

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 Medicina Tropical**, 40:356-358, 2007.

BRAGA, F.R., ARAÚJO, J.V., CAMPOS, A.K., SIVA, A. R., ARAUJO, J. M., CARVALHO, R.O., CORREA, D.N ; PEREIRA, C.A.J . In vitro evaluation of the effect of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on *Schistosoma mansoni* eggs. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 24: 2713-2716, 2008b.

BRAGA, F.R., ARAÚJO, J.V., CAMPOS, A.K., ARAUJO, J. M., SILVA, A.S., CARVALHO, R.O., TAVELA, A.O . In vitro evaluation of the action of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on *Fasciola hepatica* eggs. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 24: 1559-1564, 2008a.

CARNEY, W.P. Echinostomiasis—a snail-borne intestinal trematode zoonosis. Southeast Asian. **Journal of Tropical Medicine and Public Health**, 22:206–221,1991

DE, S., SANYAL, P.K., SARKAR, A.K., PATEL, N.K., PAL, S., MANDAL, S.C. Screening for Indian isolates of egg-parasitic fungi for use in biological control of fascioliasis and amphistomiasis in ruminant livestock. **Journal of Helminthology**, 82, 271-277, 2008.

DIAS, A.S., ARAÚJO, J.V., BRAGA, F.R., PUPPIN, A.C., PERBONI, W.R. *Pochonia chlamydosporia* in the biological control of *Fasciola hepatica* in cattle in Southeastern Brazil. **Parasitology Research**, 112, 2131-2136, 2013.

EREN, J., PRAMER, D. The most probable number of nematode-trapping fungi in soil. **Soil Science**, 99, 285, 1965.

ESTEVES, I., PETEIRA, B., ATKINS, S.D., MAGAN, N., KERRY, B. Production of extracellular enzymes by different isolates of *Pochonia chlamydosporia*. **Mycological Research**, 113:867-876,2009.

FERREIRA, S.R., ARAÚJO, J.V., BRAGA, F.R., ARAUJO, J.M., CARVALHO, R.O., SILVA, A.R., FRASSY, L.N., FREITAS, L.G. Ovicidal activity of seven *Pochonia chlamydosporia* fungal isolates on *Ascaris suum* eggs. **Tropical Animal Health and Production**, 43, 639-664,2010.

FREITAS, M.G. **Helmintologia veterinária**, 4<sup>a</sup> edição. Gráfica Rabelo, Belo Horizonte, 1982.

FRIED, B., GRACZYK, T.K. Echinostomes as experimental models for biological research. **Kluwer, Dordrecht**, pp. 245–266, 2000.

FRIED, B., GRACZYK, T.K., TAMANG, L. Food-borne intestinal trematodiasis in humans. **Parasitology Research**. 93, 159-170,2004.

Lie, K.J., Basch, P.F., 1967. The life history of *Echinostoma paraensei* sp. n. (Trematoda: Echinostomatidae). *J.Parasitol.* 53,1192–1199.

LIMA DOS SANTOS, C.A . Prevention and control of food borne trematodes in cultured fish. **INFOFISH** Int 2:57–62,1995.

LOPEZ-LLORCA, L.V., GÓMEZ-VIDAL, S., MONFORT, E., LARRIBA, E., CASADO-VELA, J., ELORTZA, F., JANSSON, H.B., SALINAS, J., MARTIÍN-NIETO, J. Expression of serineproteases in egg-parasitic nematophagous fungi during barley root colonization. **Fungal Genetics and Biology.** 47:342-351, 2010.

LYSEK, H. Classification of ovicide fungi according to type of ovicidity. **Acta Universitatis.** Palack. Olomue. 76: 9–13,1976.

LYSEK, H., FASSATIOVÁ, O., PINEDA, N.C., HERNÁNDEZ, N.L. Ovicidal fungi in soils of Cuba. **Folia Parasitology,** 29: 265–270, 1982.

MEYER, W.J., WIEBE, M.G. Enzyme production by the nematode-trapping fungus, *Duddingtonia flagrans*. **Biotechnology Letters.** 25: 791-795,2003.

MUKHTAR T, PERVAZ I. *In vitro* evaluation of ovicidal and larvicidal effects of culture filtrate of *Verticillium chlamydosporium* against *Meloidogyne javanica*. **Int Journal of Agricultural, Biological,;** 5:576-579,2003.

ROBERTS, L. S., JANOVY, J. Jr. **Foundations of Parasitology.** 6<sup>a</sup> Boston: McGraw-Hill,2000.

SEGERS, R., BUTT, M.T., KERRY, B,R., BECKETT A, PEBERDY JF. The role of the proteinase VCP1 produced by the nematophagous *Verticillium chlamydosporium* in the infection process of nematode eggs. **Mycological Research;** 100:421-428,1996.

SEGERS, R., BUTT, T.M., KERRY, B.R., PEBERDY, J.F. The nematophagous fungus *Verticillium chlamyosporium* produces a chymoelastase-like protease which hydrolyses host nematode proteins *in situ*. **Microbiology**. 140: 2715–2723, 1994.

UJIIE, N. On the structure and development of *Echinochasmus japonicus* and its parasitism in man. **Journal of the Formosan Medical Association**. 35:525–546, 1963.

### 3 – CONCLUSÕES

- 1- O fungo *Pochonia chlamydosporia* (VC1 e VC4) influenciou de forma negativa sobre os ovos *Echinostoma paraensei*, assim pode ser considerado como um potencial candidato a controlador biológico desse helminto.
- 2- Quanto mais rico for o meio de cultura maior disponibilidade de fontes de carbono e nitrogênio, podendo interferir de forma positiva nas características predatórias dos fungos ovicidas.
- 3- O extrato bruto enzimático produzido de *P. chlamydosporia* (VC4) foi eficaz na redução da eclosão dos ovos de *E. paraensei* e, sendo assim poderia ser utilizado no controle biológico desse trematóide.

## 6. ANEXOS

### ANÁLISE ESTATÍSTICA

**Ensaio A:** Avaliação da atividade ovicida de dois isolados VC1 e VC4 em meio sólido Agar- água 2% sobre ovos de *E. paraensei*. De acordo com os seguintes parâmetros: tipo 1, efeito 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, com penetração de hifas através da casca; e tipo 3 efeito lítico com alteração morfológica do embrião e da casca.

#### EFEITO 1

	<b>VC1</b>	<b>VC2</b>	<b>Controle</b>
	- 1 -	- 2 -	- 3 -
Soma dos Ranks =	27	23	10
Mediana =	19	12,5	0
Média dos Ranks =	2,7	2,3	1
Média dos valores =	20,3	16,6	0
Desvio padrão =	11,1061	10,8444	0
Friedman (Fr) =	15,8		
Graus de liberdade =	2		
(p) =	0,0004		
Comparações:	Diferença	(p)	
Ranks 1 e 2 =	4	ns	
Ranks 1 e 3 =	17	< 0.05	
Ranks 2 e 3 =	13	< 0.05	

#### EFEITO 2

	<b>VC1</b>	<b>VC2</b>	<b>Controle</b>
	- 1 -	- 2 -	- 3 -
Soma dos Ranks =	24	25,5	10,5
Mediana =	30	31,5	0
Média dos Ranks =	2,4	2,55	1,05
Média dos valores =	28,6	31,6	0
Desvio padrão =	14,7437	5,5015	0

Friedman (Fr) =	13,65
Graus de liberdade =	2
(p) =	0,0011

Comparações:	Diferença	(p)
Ranks 1 e 2 =	1,5	ns
Ranks 1 e 3 =	13,5	< 0.05
Ranks 2 e 3 =	15	< 0.05

### EFEITO 3

	VC1	VC2	Controle
	- 1 -	- 2 -	- 3 -
Soma dos Ranks =	23	27	10
Mediana =	29,5	42	0
Média dos Ranks =	2,3	2,7	1
Média dos valores =	33,9	39,6	0
Desvio padrão =	8,3193	13,335	0
Friedman (Fr) =	15,8		
Graus de liberdade =	2		
(p) =	0,0004		

Comparações:	Diferença	(p)
Ranks 1 e 2 =	4	ns
Ranks 1 e 3 =	13	< 0.05
Ranks 2 e 3 =	17	< 0.05

**Ensaio 2:** Avaliação do efeito ovicida (destruição dos ovos) do isolado VC4 em meios de cultura ágar suplementados: ágar-quitina 2% (AQ 2%), corn-meal-ágar 2% (CMA 2%), ágar-água 2% (AA 2%) e ágar- amido 2% (SSA 2%) sobre os ovos de *E. paraensei*. De acordo com os seguintes parâmetros: tipo 1, efeito 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, com penetração de hifas através da casca; e tipo 3 efeito lítico com alteração morfológica do embrião e da casca.

## Efeito 1

	AA 2%	CMA 2%	SSA 2%	AQ 2%	Controle
	- 1 -	- 2 -	- 3 -	- 4 -	- 5 -
Soma dos Ranks =	61.5000	53.5000	63.5000	66.0000	25.5000
Mediana =	20.0000	10.0000	25.0000	17.5000	0.0000
Média dos Ranks =	3.4167	2.9722	3.5278	3.6667	1.4167
Média dos valores =	20.0000	14.5000	22.5000	24.0000	0.0000
Desvio padrão =	12.2474	18.4972	16.8252	16.8663	0.0000
Friedman (Fr) =	24.5111				
Graus de liberdade =	4				
(p) =	< 0.0001				
Comparações:	Diferença	(p)			
Ranks 1 e 2 =	8	ns			
Ranks 1 e 3 =	2	ns			
Ranks 1 e 4 =	4.5	ns			
Ranks 1 e 5 =	36	< 0.05			
Ranks 2 e 3 =	10	ns			
Ranks 2 e 4 =	12.5	ns			
Ranks 2 e 5 =	28	< 0.05			
Ranks 3 e 4 =	2.5	ns			
Ranks 3 e 5 =	38	< 0.05			
Ranks 4 e 5 =	40.5	< 0.05			

## Efeito 2

	AA 2%	CMA 2%	SSA 2%	AQ 2%	Controle
	- 1 -	- 2 -	- 3 -	- 4 -	- 5 -
Soma dos Ranks =	68.5000	65.0000	60.5000	57.5000	18.5000
Mediana =	35.0000	30.0000	27.5000	30.0000	0.0000
Média dos Ranks =	3.8056	3.6111	3.3611	3.1944	1.0278
Média dos valores =	35.0556	32.7778	30.5556	26.6667	0.0000
Desvio padrão =	13.5927	14.7750	15.2324	11.2459	0.0000
Friedman (Fr) =	36.5778				
Graus de liberdade =	4				
(p) =	< 0.0001				
Comparações:	Diferença	(p)			
Ranks 1 e 2 =	3.5	ns			
Ranks 1 e 3 =	8	ns			
Ranks 1 e 4 =	11	ns			
Ranks 1 e 5 =	50	< 0.05			

Ranks 2 e 3 =	4.5	ns
Ranks 2 e 4 =	7.5	ns
Ranks 2 e 5 =	46.5	< 0.05
Ranks 3 e 4 =	3	ns
Ranks 3 e 5 =	42	< 0.05
Ranks 4 e 5 =	39	< 0.05

### Efeito 3

	AA 2%	CMA 2%	SSA 2%	AQ 2%	Controle
	- 1 -	- 2 -	- 3 -	- 4 -	- 5 -
Soma dos Ranks =	57.5000	65.0000	66.5000	61.0000	20.0000
Mediana =	44.5000	50.0000	50.0000	40.0000	0.0000
Média dos Ranks =	3.1944	3.6111	3.6944	3.3889	1.1111
Média dos valores =	38.2778	45.0000	46.6667	40.9444	0.0000
Desvio padrão =	21.6083	20.3643	17.4895	17.2336	0.0000
Friedman (Fr) =	33.2111				
Graus de liberdade =	4				
(p) =	< 0.0001				
Comparações:	Diferença	(p)			
Ranks 1 e 2 =	7.5	ns			
Ranks 1 e 3 =	9	ns			
Ranks 1 e 4 =	3.5	ns			
Ranks 1 e 5 =	37.5	< 0.05			
Ranks 2 e 3 =	1.5	ns			
Ranks 2 e 4 =	4	ns			
Ranks 2 e 5 =	45	< 0.05			
Ranks 3 e 4 =	5.5	ns			
Ranks 3 e 5 =	46.5	< 0.05			
Ranks 4 e 5 =	41	< 0.05			

**Ensaio 3:** Avaliação da capacidade ovicida do extrato bruto enzimático de *P. chlamydosporia* (VC4) sobre ovos de *E. paraensei*

	Extrato - 1 -	Controle - 2 -
Soma dos Ranks =	6.0000	12.0000
Mediana =	128.0000	305.5000
Média dos Ranks =	1.0000	2.0000
Média dos valores =	145.3333	312.3333
Desvio padrão =	64.0083	56.6945
Friedman (Fr) =	6.0000	
Graus de liberdade =	1	
(p) =	0.0143	
Comparações: Ranks 1 e 2 =	Diferença 6	(p) < 0.05

O percentual de redução foi observado por meio da utilização da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Redução} = \frac{(\text{Média de ovos recuperados no controle} - \text{média de ovos recuperados no tratado})}{\text{Média de ovos recuperados no controle}} \times 100.$$