ARTÍCULO ORIGINAL

Avaliação in vitro dos fungos Aspergillus flavus e Penicillium corylophilum em adultos de Musca domestica (Diptera: Muscidae)

MÁRCIA DE SENNA-NUNES*, GISELA L. DA COSTA**,
VÂNIA RITA E.P. BITTENCOURT***, e EDSON J. SOUZA***

IN VITRO AVALIATION OF THE FUNGUS *Aspergillus flavus* AND *Penicillium corylophilum* IN ADULTS OF *Musca domestica* (DIPTERA: MUSCIDAE)

*The aim of the present paper was to evaluate the effects of two isolates of **Aspergillus flavus** and two isolates of **Penicillium corylophilum** on adults of **Musca domestica**. The samples tested were isolated directly from **M. domestica** specimens. Adult flies were obtained from pupas of a laboratory colony. After hatching from pupa, 4 groups with 10 young adults each were formed for each one of the conidia suspensions tested (10^5 to 10^8 conidia/ml). 2,5 ml of solution was sprayed on each batch. Two control groups were made: one treated with spreading adhesive and other with no treatment at all. Adult insects were sensitive to treatments with these fungi isolates, mainly to those with higher conidia concentration. One of the **A. flavus** isolates killed 100% of flies on third day after treatment. The two **P. corylophilum** isolates killed 100% of flies seven days after treatment. The death rates were slower in the groups with smaller conidia concentrations, with death occurring up to the 15th day after treatment. Fungi were re isolated from dead flies.*

Key words: *Musca domestica*, biological control, *Penicillium corylophilum*, *Aspergillus flavus*.

INTRODUÇÃO

O controle de *Musca domestica* constitui um grande problema em saúde pública, principalmente devido a elevada resistência aos

inseticidas químicos¹. A possibilidade de utilização de espécies fúngicas para o controle de insetos, vem sendo discutida desde o século XIX². As espécies de fungos entomopatogênicos são referidas como as mais eficazes

---

* Departamento de Parasitologia, Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Iguazu, Av. Abílio Augusto Távora, 2134, 26260-000, Nova Iguaçu, RJ, Brasil.

** Departamento de Micologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, 21045-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

*** Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, Km 7, 23890-000, Seropédica, RJ, Brasil. vaniabit@ufrj.br (Endereço para correspondência)

em programas de controle de insetos³. A maioria dos fungos entomopatogênicos já relatados ocorrem no Brasil. A ocorrência destes fungos em condições naturais, tanto enzoótica como epizooticamente, tem sido aqui e em outros países um fator importante na redução das populações de pragas⁴. A ação de *Aspergillus flavus* é altamente patogênico sobre *M. domestica* nebuloso⁵, a mortalidade causada em adultos de *Glossina morsitans*, submetidos a infecção experimental com fungos entomopatogênicos⁶. Investigadores verificaram a mortalidade de adultos de *M. domestica* tratados com suspensões conidiais em diversas concentrações de seis espécies fúngicas⁷.

O objetivo do presente estudo foi o de avaliar o potencial patogênico de dois isolados fúngicos de *A. flavus* e dois isolados fúngicos de *Penicillium corylophilum* sobre adultos de *M. domestica*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido na EPPWON, DPA-IV/UFRRJ, no período de fevereiro de 1999 à junho de 2000. O estudo foi realizado sob condições de temperatura e umidade relativa controladas ($28^{\circ}\text{C} \pm 1$ e $\pm 80\%$) no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Veterinária e no Laboratório de Biologia de Insetos, ambos localizados na EPPWON.

A coleta dos insetos adultos de *M. domestica* foi realizada em dois locais (criadouros naturais). O primeiro criadouro foi em baias do Setor de Suinocultura do Instituto de Zootecnia (UFRRJ) e o segundo no Depósito de Lixo Urbano no bairro de Boa Esperança, município de Seropédica, RJ. Realizaram-se coletas das moscas utilizando puçá de tela de nylon e gaiola de madeira revestida lateralmente por tela nylon (28,5 cm de altura x 27,5 cm de largura x 32 cm de profundidade). Foram realizadas três coletas em cada criadouro nos meses de fevereiro, maio e setembro de 1999.

Para obtenção dos isolados fúngicos, os insetos foram lavados em solução de hipoclorito de sódio a 0,1%, enxaguados em água destilada durante três minutos e transferidos para cadinhos, onde foram macerados em solução

salina 0,85% e inoculados em placas de Petri, contendo meio de cultura Batata Dextrose Agar a 2% (BDA) e mantidos em câmara climatizada sob condições controladas de temperatura, umidade relativa e fotofase. As espécies selecionadas para os bioensaios foram *A. flavus* e *P. corylophilum*, por serem as mais prevalentes⁸.

Selecionou-se dois isolados de *A. flavus* SP₃C₃ (baias da suinocultura) e LP₄C₅ (depósito de lixo) e dois de *P. corylophilum* SP₂C₈ (baias da suinocultura) e LP₃C₇ (depósito de lixo). Esta seleção foi feita de acordo com o melhor crescimento fúngico e com o local de coleta.

A criação estoque foi estabelecida a partir de espécimens adultos coletados nos dois criadouros naturais, onde foram realizadas as coletas para o isolamento dos fungos. Os procedimentos para manutenção e obtenção de outras gerações seguiram os métodos preconizados⁹.

As suspensões de conídios de cada isolado selecionado foram preparadas a partir de culturas fúngicas produzidas em meio BDA dentro de câmara asséptica de fluxo laminar. As culturas dos isolados selecionados para os testes de patogenicidade foram transplantadas para tubos de 28 x 150 mm, contendo meio inclinado e mantidos em câmara climatizada sob condições controladas, durante sete a dez dias para desenvolvimento fúngico. Para preparo das suspensões foram acrescentadas 10 ml de água destilada esterilizada com 0,01% de Tween 80, sobre a superfície de cada tubo, contendo as culturas esporuladas. Após homogeneização e quantificação da suspensão em câmara de Neubauer, as diluições foram realizadas a partir da concentração de 10⁸. Para as demais diluições foram sendo adicionadas 90 ml de água destilada estéril e três gotas de espalhante adesivo. Desta forma, preparou-se as suspensões 10⁸, 10⁷, 10⁶ e 10⁵.

Para os bioensaios, moscas adultas recém-emergidas foram separadas em quatro grupos com dez moscas cada, acondicionadas em recipientes plásticos transparentes de 200 ml, com 10 cm de diâmetro. Estes recipientes (gaiolas plásticas) foram forrados com papel de filtro na base, cobertos com tela de nylon presa por

um elástico e colocados na geladeira por três minutos para ficarem imóveis, permitindo assim a sua manipulação. Foram realizadas pulverizações nos grupos de moscas, com o auxílio de um atomizador. Para cada grupo foi aspergido 2,5 ml de cada suspensão conidial em cada repetição. Dois grupos controle foram mantidos simultaneamente. O primeiro foi pulverizado com 2,5 ml de solução 0,01% de Tween 80 em água destilada, em cada repetição e o segundo não foi tratado. Em todas as gaiolas plásticas contendo as moscas de cada cepa fúngica testada, foram colocadas solução de água e mel e leite em pó, acondicionadas em dois pequenos recipientes plásticos. Como as demais etapas, estes grupos foram mantidos em condições controladas. As observações foram diárias até o 15º dia e as moscas mortas foram retiradas das gaiolas e observadas em lupa para a visualização

de estruturas fúngicas. A avaliação da patogenicidade baseou-se na porcentagem de mortalidade total e ritmo de mortalidade das moscas.

A análise de variância foi seguida por aplicação do teste de Tukey, para comparação entre as médias, calculando-se o coeficiente de variação para verificar a precisão dos dados. Para calcular a concentração letal, CL50 e CL90, foi usada a análise de próbites¹⁰⁻¹².

RESULTADOS

Os insetos adultos foram sensíveis aos tratamentos com os diferentes isolados fúngicos, principalmente nas suspensões com maiores concentrações conidiais. Na Tabela 1 verifica-se a porcentagem de mortalidade no terceiro e

Tabela 1. Porcentagem de mortalidade de adultos de *Musca domestica*, no terceiro e no sétimo dia após moscas recém-emergidas terem sido tratadas com suspensões conidiais em diferentes concentrações de quatro isolados fúngicos, obtidos de moscas desta mesma espécie, capturadas em dois criadouros, Setor de Suinocultura - Zootecnia (UFRRJ) e Depósito de Lixo (bairro de Boa Esperança), no município de Seropédica, RJ.

Tratamento (conídios/ml)		<i>Aspergillus flavus</i> SP ₃ C ₃		<i>Aspergillus flavus</i> LP ₄ C ₅		<i>Penicillium corylophilum</i> SP ₂ C ₈		<i>Penicillium corylophilum</i> LP ₃ C ₇	
		3º dia	7º dia	3º dia	7º dia	3º dia	7º dia	3º dia	7º dia
Controle negativo	$\bar{x}$ s	17,50 a 12,58	42,50 a 5,00	15,00 a 6,45	25,00 a 25,17	2,50 a 5,00	15,00 a 5,77	2,50 a 5,00	15,00 a 5,00
Controle	$\bar{x}$ s	32,50 a 9,57	52,50a 15,00	22,50 ab 15,00	45,00 ab 17,32	7,50,ab 9,57	25,00 ab 10,00	7,50 ab 5,00	25,00 a 10,00
10 ⁵	$\bar{x}$ s	50,00 a 29,44	77,50 ab 15,00	36,50 ab 9,46	60,00 ab 29,44	12,50 ab 9,57	47,50 bc 17,08	7,50 ab 9,57	37,50 ab 15,00
10 ⁶	$\bar{x}$ s	75,00 b 36,97	92,50 b 15,00	50,00 ab 27,08	65,00 ab 31,09	27,50 bc 9,57	47,50 bc 12,58	27,50 c 9,57	50,00 bc 0,00
10 ⁷	$\bar{x}$ s	75,00 b 32,02	82,50 ab 20,62	67,50 bc 32,02	67,50 ab 32,02	27,50 bc 12,58	65,00 c 19,15	22,50 bc 9,57	65,00 c 12,91
10 ⁸	$\bar{x}$ s	80,00 b 8,16	100,00 b 0,00	100,00 c 0,00	100,00 b 0,00	47,50 c 5,00	100,00 d 0,00	55,00 d 5,77	100,00 d 0,00

Média seguida pela mesma letra e na mesma coluna, não difere entre si (P < 0,05).

x = Porcentagem média.

s = Desvio padrão.

sétimo dias após a infecção, com os diferentes isolados fúngicos. No isolado *A. flavus* LP₄C₅, todas as moscas morreram até o terceiro dia com a suspensão de 10⁸ conídios/ml. Nos demais, *A. flavus* SP₃C₃ e *P. corylophilum* SP₂C₈ e LP₃C₇, esta mortalidade foi até o terceiro dia de 80, 47,50 e 55%, respectivamente. No sétimo dia após a infecção, verificou-se mortalidade de 100% das moscas em todos os bioensaios cujas moscas foram tratadas com suspensões com 10⁸ conídios/ml.

Diferença significativa foi registrada entre os grupos tratados com os isolados em suspensões mais concentradas, em relação aos grupos controle no terceiro e no sétimo dia após infecção (Tabela 1). Os maiores percentuais de mortalidade de adultos de *M. domestica*, foram verificados nos grupos de moscas tratados com os dois isolados de *A. flavus*.

Nos grupos de moscas tratados com o isolado *A. flavus* SP₃C₃, o ritmo de mortalidade foi proporcional à concentração conidial da suspensão utilizada. A partir do quinto, 10^o e 15^o dias pós-tratamento, registrou-se mortalidade de 100% nos grupos de moscas tratados com as suspensões conidiais de 10⁸, 10⁷ e 10⁶, respectivamente. Nos demais grupos (10⁵ e controles) algumas moscas sobreviveram após o 15^o dia. O ritmo de mortalidade verificado nos tratamentos com o isolado *A. flavus* LP₄C₅, foi mais lento nos bioensaios com as concentrações de 10⁷, 10⁶ e 10⁵, apresentando pouca diferença

dos resultados registrados nos grupos controle.

Nos grupos de moscas tratados com o isolado *P. corylophilum* SP₂C₈, registrou-se 100% de mortalidade dos adultos de *M. domestica* a partir do sétimo dia após tratamento com a suspensão com 10⁸ conídios/ml. Enquanto nos grupos tratados com as suspensões 10⁷ e 10⁶, a mortalidade foi mais tardia, ocorrendo no 15^o dia. No grupo cujo tratamento foi com suspensões 10⁵ conídios/ml deste isolado fúngico a mortalidade não atingiu 100% até o 15^o dia após tratamento. Resultados semelhantes aos descritos acima, foram verificados nos bioensaios com o isolado *P. corylophilum* LP₃C₇. A mortalidade de *M. domestica* na fase adulta foi mais rápida nos tratamentos com suspensões conidiais mais concentradas.

Na Tabela 2 estão apresentados os valores de concentrações letais calculados em análise de próbites para mortalidade de 50 e 90% de adultos de *M. domestica*. O isolado fúngico *A. flavus* SP₃C₃ apresentou os menores valores de CL50 (1,74 x 10⁶ conídios/ml), enquanto o menor de CL90 foi registrado no isolado *A. flavus* LP₄C₅ (7,92 x 10⁸ conídios/ml).

Os espécimens mortos, adultos de *M. domestica*, dos diversos tratamentos, foram separados em câmara úmida para a conidiogênese. As espécies de fungos que cresceram após isolamento em BDA, foram as mesmas usadas nas infecções de adultos de *M. domestica* recém-emergidas.

Tabela 2. Concentrações letais (CL50 e CL90) visando a mortalidade de adultos de *Musca domestica*, após moscas recém-emergidas terem sido tratadas com suspensões conidiais em diferentes concentrações de quatro isolados fúngicos, obtidos de moscas desta mesma espécie, capturadas em dois criadouros, Setor de Suinocultura - Zootecnia (UFRRJ) e Depósito de Lixo (bairro de Boa Esperança), no município de Seropédica, RJ.

Isolados	Mortalidade de adultos	
	CL50 (conídios/ml)	CL90 (conídios/ml)
<i>Aspergillus flavus</i> SP ₃ C ₃	1,74 x 10 ⁶	3,76 x 10 ¹⁰
<i>Aspergillus flavus</i> LP ₄ C ₅	1,51 x 10 ⁷	7,92 x 10 ⁸
<i>Penicillium corylophilum</i> SP ₂ C ₈	3,08 x 10 ⁹	4,25 x 10 ¹²
<i>Penicillium corylophilum</i> LP ₃ C ₇	1,16 x 10 ⁹	2,07 x 10 ¹¹

DISCUSSÃO

A eficácia dos isolados fúngicos testados foi maior em adultos do que em larvas de *M. domestica*. Os dois isolados de *A. flavus* testados, provocaram maior taxa de mortalidade no intervalo de tempo menor após o tratamento do que os dois isolados de *P. corylophilum*. No entanto, com o passar do tempo, foram registrados maiores percentuais de mortalidade também nos tratamentos com as duas cepas de *P. corylophilum*.

Amonkar e Nair⁵ avaliando a patogenicidade de *A. flavus* para adultos de *M. domestica* *nebuloso*, encontraram no sétimo dia após a infecção, percentuais de mortalidade de 6,5 e 12,5% para os grupos de moscas tratados com 10^3 e 10^4 conídios/ml, respectivamente; porém, nos tratamentos com concentrações de 10^7 a 10^9 conídios/ml, as taxas de mortalidade foram entre 46 a 57%. Após o 14º dia de tratadas, 90 a 97% de mortalidade foram observadas em todos os tratamentos nas diferentes concentrações. Os resultados apresentados por estes autores, demonstram que o potencial patogênico de *A. flavus* aumentou proporcionalmente à concentrações conidiais, no intervalo de tempo menor após a infecção. Porém com o passar do tempo, altos percentuais de mortalidade foram verificados em todos os tratamentos nas diferentes concentrações. No presente estudo, o efeito dos dois isolados de *A. flavus* testados sobre adultos de *M. domestica*, foi avaliado em um intervalo de tempo menor, mostrando que a partir do terceiro dia após infecção, a mortalidade verificada era proporcional à concentração das suspensões utilizadas nos tratamentos. A partir do sétimo dia, esta tendência aumentou e os percentuais de mortalidade registrados foram maiores que os verificados⁵. A tendência do aumento de percentuais de mortalidade ocorre com o passar do tempo, mesmo nos tratamentos com baixas concentrações conidiais, o que também foi verificado no presente estudo. Apesar de tratar-se de outra espécie fúngica os resultados observados para os tratamentos com os dois isolados de *P. corylophilum*, apresentam a mesma tendência dos discutidos acima, evidenciando que a ação do fungo aumenta com o passar do

tempo. Alves⁴ considera que a velocidade do processo germinativo depende do isolado fúngico, porém em geral estão envolvidos processos importantes para que ocorra a penetração e colonização do fungo, conforme já foi discutido anteriormente.

Uma certa densidade de conídios é requerida para que ocorra a penetração efetiva do fungo na cutícula¹³, como um mecanismo de ação em massa, o que explica a baixa patogenicidade de encontrada nas suspensões de menor concentração de conídios/ml.

Isolados de *A. flavus* foi a espécie mais patogênica para adultos de *G. morsitans*, induzindo a mortalidade de 26% das moscas tratadas com suspensões de 10^7 conídios/ml, o que nos leva a concluir que a patogenicidade é variável entre espécies de muscídeos¹⁴. Em estudos anteriores a este, testaram outras espécies de fungos para avaliarem a ação entomopatogênica para *G. morsitans* e verificaram que os isolados fúngicos de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* foram altamente patogênicos para adultos deste muscídeo, alcançando aproximadamente 100% de mortalidade nos grupos tratados^{8,15}. No entanto, outros isolados como *Paecilomyces farinosus* e *Paecilomyces fumosoroseus*, foram pouco patogênicos, causando mortalidade entre 28 a 35% dos adultos tratados.

O percentuais de mortalidade de adultos de *M. domestica* expostos a tratamento com suspensões conidiais em diversas concentrações de seis espécies fúngicas, também foram avaliados⁷. Estes autores verificaram que houve mortalidade de moscas em todos os tratamentos; porém, nos testes com *M. anisopliae*, foram registrados 100 e 94% de mortalidade nos tratamentos com as maiores concentrações conidiais, em seis dias após infecção. Este trabalho e outros já citados, falam da importância do *M. anisopliae* em controle biológico de *M. domestica*, porém em nenhum deles a espécie *M. anisopliae* foi isolada a partir de uma espécie de muscídeo naturalmente infectada. Autores¹⁶ afirma que, em geral os experimentos realizados com dípteros utilizam isolados fúngicos que não foram originalmente obtidos de dípteros.

Na análise de próbites realizada com os

dados referentes ao percentual de mortalidade de adultos de *M. domestica*, tratadas com isolados de *A. flavus* e *P. corylophilum*, os valores verificados foram bem menores do que os observados em CL50 e CL90 para mortalidade de pupas oriundas de larvas de terceiro instar, tratadas para inibição da emergência de adultos do pupário, significando que a ação dos fungos sobre adultos foi mais eficaz.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi o de avaliar o potencial de dois isolados fúngicos de *Aspergillus flavus* e dois isolados de *Penicillium corylophilum* sobre adultos de *Musca domestica*. Para a realização dos bioensaios foram selecionados dois isolados de cada espécie fúngica. Os adultos de *M. domestica* para os bioensaios foram obtidos a partir de pupas da colônia desta espécie. Moscas adultas recém-emergidas foram separadas em quatro grupos com dez moscas para cada uma das diluições das suspensões conidiais (10^5 a 10^8 conídios/ml). Foram realizadas pulverizações de 2,5 ml das suspensões conidiais para cada repetição. Dois grupos controles foram mantidos, no primeiro as moscas foram tratadas com espalhante adesivo e o segundo sem nenhum tratamento. Os insetos adultos foram sensíveis aos tratamentos com diferentes isolados fúngicos, principalmente nos tratamentos com suspensões com maiores concentrações conidiais. No bioensaio com um dos isolados de *A. flavus* ocorreu a mortalidade de 100% das moscas no terceiro dia após a infecção. Nos bioensaios com os dois isolados de *P. corylophilum*, 100% das moscas tratadas morreram até o sétimo dia após infecção. O ritmo de mortalidade foi mais lento nos tratamentos com menores concentrações conidiais prolongando-se até o 15º dia.

REFERÊNCIAS

- 1.- CHAPMAN P A, WELB D P, WALKER S J. The potential of some newer photostable pyrethroids to select for resistance in the house fly *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). Bull Entomol Res 1993; 83: 517-21.
- 2.- HALL I M. Use of microorganisms in biological

- control, p.610-628. In: DE BACH P. Biological Control of Insect Pests and Weed. Reinhold Publishing Corporation, New York, 1964, 820 p.
- 3.- MESSIAS L C. Fungos, sua utilização para controle de insetos de importância médica e agrícola. Mem Inst Oswaldo Cruz 1989; 84(supl. III): 57-9.
- 4.- ALVES S B. Controle Microbiano de Insetos. 2a ed., vol. 4, FEALQ, São Paulo, 1998, 1163 p.
- 5.- AMONKAR S V, NAIR K K. Pathogenicity of *Aspergillus flavus* Lind to *Musca domestica* nebulosus Fabricius. Biology Division, Atomic Energy Establishment Trombay, 1965; 513-154.
- 6.- KAAYA G P. *Glossina morsitans morsitans*: mortalities caused in adults by experimental infection with entomopathogenic fungi. Acta Tropica 1989; 46: 107-14.
- 7.- BARSON G, RENN N, BYWATER A F. Laboratory evaluation of six species of Entomopathogenic fungi for the control of the house fly (*Musca domestica*), a pest of intensive animal units. J Invert Pathol 1994; 64: 107-13.
- 8.- SENNA-NUNES M S, COSTA G L, BITTENCOURT V R E P, DAEMON E. Isolamento de fungos em *Musca domestica* capturadas em dois criadouros naturais no município de Seropédica, RJ. XI Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Salvador, BA, Resumos, 1999; p. 72.
- 9.- SENNA-NUNES M S, MILWARD-DE-AZEVEDO E M V, CARVALHO E H P S, MELLO R P. Estudo comparado do desenvolvimento pós-embrionário de *Musca domestica* L. 1758, criada em fezes de animais domésticos, sob condições de laboratório. Revta Bras Ent 1991; 35: 203-21.
- 10.- LITCHFIELD J T, WILCOXON F. Simple method of sitting dose effects curve. J Pharmacol Exp Therapy 1949; 95: 99-113.
- 11.- FINNEY D J. Statistical Method in Biological Assay. 2a ed., Charles Grissin, London, 1964, 68 p.
- 12.- FINNEY D J. Probit Analysis. 3a ed., Cambridge University Press, London, 1971, 333 p.
- 13.- ZHIOUA E, BROWNING M, JOHNSON P W et al. Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) to *Ixodes acapulcaris* (Acari: Ixodidae). J Parasitol 1997; 83: 815-8.
- 14.- KAAYA G P, OKECH M A. Microorganisms associated with tsetse in nature: preliminary results on isolation, identification and pathogenicity. Insect Sci Applic 1990; 11: 443-8.
- 15.- KAAYA G P, OKECH M A. Horizontal transmission of mycotic infection in adult tsetse, *Glossina morsitans morsitans*. Entomophaga 1990; 35: 589-600.
- 16.- STEINKRAUS D C, GEDEN C J, RUTZ D A, KRAMER J P. First report of the natural occurrence of *Beauveria bassiana* (Moniliales - Moniliaceae) in *Musca domestica* (Diptera, Muscidae). J Med Entomol 1990; 27: 309-12.

Agradecimentos. Os autores agradecem ao Técnico de Laboratório Ivan Serafim da Silva, pelo auxílio nas coletas de insetos e manutenção das colônias.