

Avaliação do potencial do fungo *Pochonia chlamydosporia* (VC4) no controle biológico de *Alphitobius diaperinus* em condições laboratoriais

Evaluation of the potential of the fungus Pochonia chlamydosporia (VC4) in the biological control of Alphitobius diaperinus under laboratory conditions

João Pedro Barbosa Assis¹ , Carolina Magri Ferraz¹ , Luciara Paiva¹ , Debora Castro Souza² , Filippe Elias Freitas Soares² , Fernando Luiz Tobias¹ , Thaís Schmidt Ferreira¹ , Jackson Victor Araújo³ , Vinicius Longo Ribeiro Vilela^{4*} , Fabio Ribeiro Braga¹ 

¹Laboratório de Parasitologia Experimental e Controle Biológico, Universidade Vila Velha, Vila Velha-ES, Brasil.

²Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, Brasil.

³Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Brasil.

⁴Departamento de Medicina Veterinária, Instituto Federal da Paraíba, Sousa-PB, Brasil.

*Autor para correspondência: vinicius.vilela@ifpb.edu.br

Informações do artigo

Palavras-chave

Avicultura
Cascudinho
Fungos nematófagos
Controle de pragas

DOI

10.26605/medvet-v18n3-6846

Citação

Assis, J. P. B., Ferraz, C. M., Paiva, L., Souza, D. C., Soares, F. E. F., Tobias, F. L., Ferreira, T. S., Araújo, J. V., Vilela, V. L. R., & Braga, F. B. (2024). Avaliação do potencial do fungo *Pochonia chlamydosporia* (VC4) no controle biológico de *Alphitobius diaperinus* em condições laboratoriais. *Medicina Veterinária*, 18(3), 235-239. <https://doi.org/10.26605/medvet-v18n3-6846>

Recebido: 1º de abril de 2024

Aceito: 15 de julho de 2024



Resumo

Alphitobius diaperinus, popularmente conhecido como cascudinho, atualmente é um dos principais problemas da avicultura mundial. Objetivou-se avaliar o potencial do fungo *Pochonia chlamydosporia* (VC4) no controle biológico de *A. diaperinus* em condições laboratoriais. Exemplares adultos do inseto foram coletados em uma granja avícola, no sudeste do Brasil. Em seguida, foi realizado crescimento do fungo *P. chlamydosporia* em meio ágar quitina (AQ2%). Após 10 dias, foi obtida uma concentração de estruturas fúngicas (conídios/clamidósporos) de 1500/μL. Posteriormente, foram formados dois grupos: grupo tratamento (G1), que consistiu em placas de Petri contendo meio de cultura ágar-água a 2% (AA2%) com 10 insetos vivos + 10μL de solução fúngica (vertida) sobre cada inseto; e o grupo controle (G2), que foi constituído por placas de Petri contendo AA 2% + 10 insetos vivos + 10μL de água destilada vertidos sobre cada inseto. Ambos os grupos foram realizados em triplicata. As placas de ambos os grupos G1 e G2 foram incubadas em BOD a 25±1°C e 80±10% de umidade relativa, durante 7 dias. Ao final do sétimo dia de interação, no grupo G1 foi observada a colonização e morte de 100% de *A. diaperinus* e visualização de hifas de VC4 sobre os mesmos, sugerindo uma possível atividade entomopatogênica. No grupo G2 foram observados insetos vivos. Conclui-se que o controle biológico de *A. diaperinus* pelo fungo *P. chlamydosporia* (VC4) foi eficaz em condições laboratoriais e mais delineamentos experimentais, em condições a campo, podem vir a colaborar com a sua aplicabilidade.

Abstract

Alphitobius diaperinus, commonly known as lesser mealworm or darkling beetle, is currently one of the main problems in global poultry farming. The aim of this study was to evaluate the potential of the fungus *Pochonia chlamydosporia* (VC4) in the biological control of *A. diaperinus* under laboratory conditions. Adult specimens of the insect were collected from a poultry farm in southeast Brazil. Subsequently, the fungus *P. chlamydosporia* was grown on chitin agar medium (2% AQ). After 10 days, a concentration of fungal structures (conidia/chlamydo spores) of 1500/μL was obtained. Later, two groups were formed: group (G1), consisting of Petri dishes containing 2% water agar culture medium (AA2%) with 10 live insects + 10μL of fungal solution (poured) over each insect; and the control group (G2), which consisted of Petri dishes containing 2% AA + 10 live insects + 10μL of distilled water poured over each insect. Both groups were conducted in triplicate. The plates of both groups G1 and G2 were incubated in a

BOD at $25\pm 1^\circ\text{C}$ and $80\pm 10\%$ relative humidity for 7 days. At the end of the seventh day of interaction, in group G1, colonization and death of 100% of *A. diaperinus* were observed, along with the visualization of VC4 hyphae on them, suggesting a possible entomopathogenic activity. In group G2, live insects were observed. It is concluded that the biological control of *A. diaperinus* by the fungus *P. chlamydosporia* (VC4) was effective under laboratory conditions, and further experimental designs under field conditions may contribute to its applicability.

Keywords: poultry farming; lesser mealworm; nematophagous fungi; pest control.

1 | Introdução

Segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal, o Brasil é o segundo maior produtor de carne de frango do mundo, atingindo em 2022 uma produção de 14,5 milhões de toneladas e gerando ao país 9,7 bilhões de dólares somente com as exportações para mais de 140 países no mundo (ABPA, 2023). Nesse sentido, justifica-se o fato de que a avicultura é um setor importante da economia brasileira e responsável por uma grande parcela da produção de alimentos no país e no mundo, gerando direta e indiretamente mais de 5 milhões de empregos (Schmidt e Silva, 2018). No entanto, tanto a avicultura brasileira quanto a mundial enfrentam desafios, como doenças, aumento dos custos de produção e problemas ambientais.

Dentre estes problemas, cita-se *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae), conhecido popularmente como cascudinho, um artrópode (besouro) atraído pela umidade e odor produzidos pelos excrementos das aves, potencialmente transmissor de inúmeros patógenos que interferem diretamente na saúde animal (Dinev, 2013; Crippen et al., 2018; Smith et al., 2022). Além disso, a presença deste artrópode nas granjas avícolas pode levar ao acúmulo de matéria orgânica no ambiente, aumentando o risco de contaminação ambiental e de doenças associadas a esses detritos (Gehring et al., 2020). A literatura tem disponibilizado diversos trabalhos que mencionam a dificuldade no controle deste inseto e, atualmente, têm sido utilizados três métodos como medidas de controle: (1) o método químico (Wolf et al., 2014); (2) o método físico (Wolf et al., 2015), e (3) o método biológico (Daniel et al., 2019). Entretanto, Singh e Johnson (2015) chamam a atenção em relação ao uso de inseticidas, uma vez que seu uso prolongado tem gerado resistência, além de custos adicionais aos produtores avícolas e danos à saúde humana.

Neste contexto, o controle biológico tem sido uma ferramenta importante no combate às pragas

agrícolas, principalmente de insetos (Senna et al., 2018; Ferraz et al., 2021). Rohde et al. (2006) demonstraram que a utilização do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* apresentou efeito nocivo às fases do ciclo biológico do cascudinho, com exceção do inseto adulto. Por outro lado, o trabalho pioneiro de Braga et al. (2013) demonstrou que o fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* poderia colonizar e destruir o exoesqueleto dos artrópodes, isolando uma enzima quitinase durante seus ensaios experimentais. Nesse sentido, Senna et al. (2018) e Ferraz et al. (2021) registraram uma possível atividade entomopatogênica de *P. chlamydosporia* em ensaios *in vitro*, o que gerou novas vertentes no controle biológico utilizando este fungo e, com isso, novos delineamentos experimentais.

Objetivou-se, com o presente trabalho, avaliar o potencial do fungo *Pochonia chlamydosporia* (VC4) no controle biológico do *Alphitobius diaperinus* em condições laboratoriais.

2 | Material e Métodos

Exemplares adultos de *Alphitobius diaperinus* foram coletados diretamente da cama aviária, em uma granja avícola localizada no município de Marechal Floriano (Latitude: $20^\circ 24' 46''$ S; Longitude: $40^\circ 40' 59''$ W), estado do Espírito Santo, na região Sudeste do Brasil. Os insetos foram armazenados junto com amostras da cama aviária e enviados para o Laboratório de Parasitologia Experimental e Controle Biológico da Universidade Vila Velha.

Para o ensaio experimental foi utilizado o fungo *Pochonia chlamydosporia* (isolado VC4). *P. chlamydosporia* é um fungo encontrado em diversos ambientes ao redor do mundo, especialmente em solos agrícolas. O VC4, especificamente, foi isolado do solo brasileiro e é mantido em condições laboratoriais ao longo dos anos pelo Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Viçosa. Foi realizado um repique para placa de Petri contendo o

meio de cultura ágar quitina (AQ2%) (Braga et al., 2013) modificado. Após 10 dias do crescimento do fungo, foi preparada uma solução de conídios e clamidósporos por meio da raspagem do micélio fúngico crescido na superfície do ágar. A raspagem foi realizada com auxílio de água destilada e uma lâmina, ambas estéreis. Posteriormente, a solução contendo os conídios e clamidósporos foi vertida em um béquer estéril e a concentração de conídios/clamidósporos foi calculada por meio de alíquotas. Foi obtida uma concentração de 1500 estruturas fúngicas/ μL , segundo Braga et al. (2013), modificado.

Dois grupos experimentais foram formados: grupo tratamento (G1) e grupo controle (G2). Ambos os grupos foram formados em placa de Petri contendo meio ágar-ágar 2%. No G1, 10 exemplares de *A. diaperinus* foram distribuídos em placa de Petri

+ 10 μL da solução de conídios e clamidósporos (vertida) sob cada exemplar. No G2, 10 exemplares de *A. diaperinus* foram distribuídos na placa e 10 μL de água destilada estéril foi vertida sobre cada exemplar do *A. diaperinus*. Os ensaios foram realizados em triplicata. As placas foram incubadas em temperatura ambiente ($25\pm 2^\circ\text{C}$), durante sete dias. Diariamente as placas foram inspecionadas para avaliar o crescimento do fungo *P. chlamydosporia*.

3 | Resultados e Discussão

Ao final do sétimo dia de interação, no grupo G1 foi observada a colonização e morte de 100% de *A. diaperinus* (Figura 1B-F) e visualização de hifas de VC4 sobre os mesmos, sugerindo uma possível atividade entomopatogênica. No grupo G2, foram observados insetos vivos (Figura 1A).

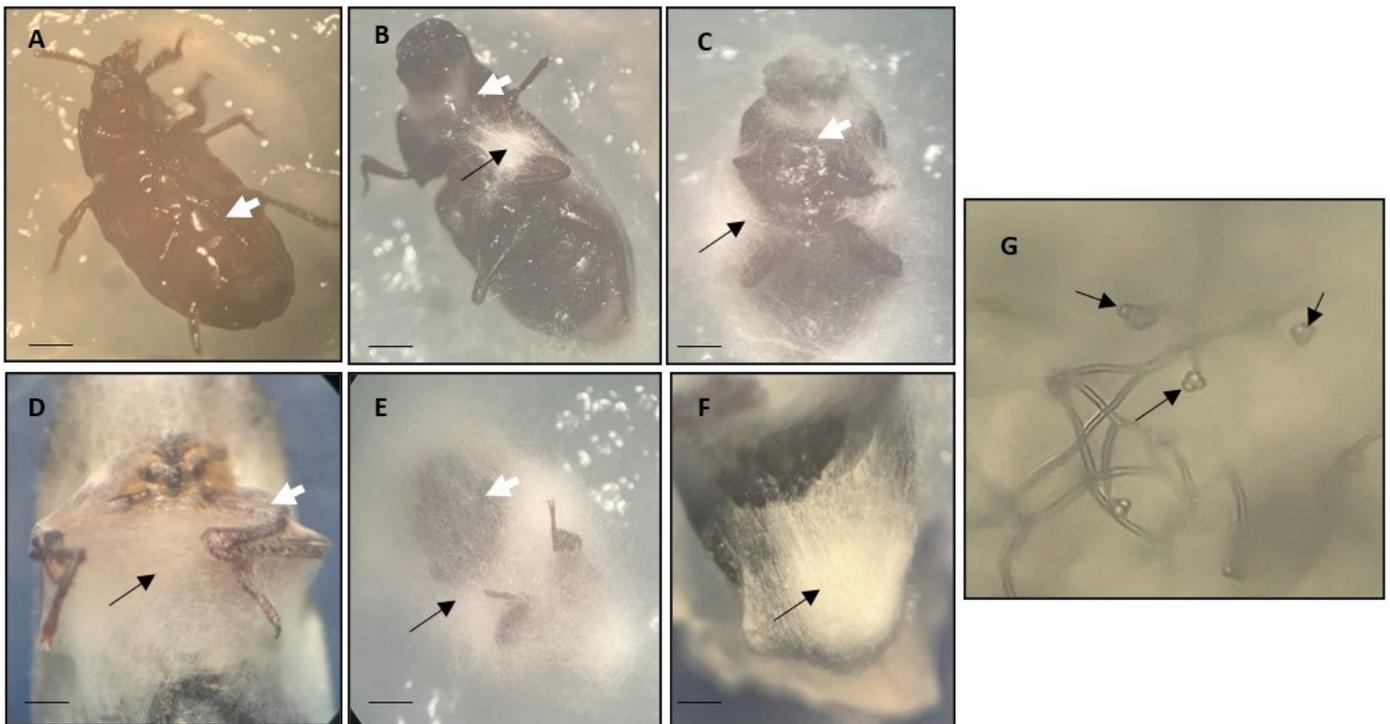


Figura 1. (A) Grupo controle. (B-F) Espécimes de *Alphitobius diaperinus* (seta branca) colonizados pelo fungo *Pochonia chlamydosporia* (seta preta) ao longo do ensaio experimental. (G) Clamidósporos e hifas de *P. chlamydosporia* obtidos da interação com os insetos.

No presente trabalho a atividade do fungo VC4 sobre insetos pode ter sido resultado direto da sua alta capacidade em expressar enzimas quitinolíticas durante o processo de colonização dos exoesqueletos e, com isso, sugerindo uma possível ação entomopatogênica. Em estudos pioneiros, Senna et al. (2018) e Ferraz et al. (2021) registraram que a possível atividade entomopatogênica de *P.*

chlamydosporia se deu a partir do crescimento do fungo em meio rico em quitina e com isso produção de quitinases extracelulares. Estes autores demonstraram a eficiência de *P. chlamydosporia* (VC4) em colonizar e eliminar formigas urbanas, sugerindo aplicações potenciais e sua eficácia *in vitro* contra *Spartocera dentiventris* (Berg) (Hemiptera: Coreidae), comumente conhecido como "percevejo

do tabaco", uma praga significativa no cultivo de tabaco no Brasil, respectivamente. No entanto, não existem relatos científicos da atividade de VC4 sobre *A. diaperinus*, o que pode vir a ser no futuro uma ferramenta no controle desta praga avícola.

Em uma outra vertente, Esteves et al. (2009) descreveram a produção e secreção de enzimas hidrolíticas por *P. chlamydosporia* (incluindo proteases-EC 3.4, quitinases-EC 3.2.1.14, e lipases-EC 3.1.1.3) a partir de vários meios de cultura e dessa forma o controle biológico com um fungo nematófago ovicida poderia expressar uma grande versatilidade para a sua utilização. Nesse sentido, *P. chlamydosporia* demonstra versatilidade na sua atividade ovicida e larvicida sobre nematoides e entomopatogênica (Braga e Araújo, 2014; Fonseca et al., 2023).

Fabritius et al. (2011) mencionaram que os artrópodes, incluindo *A. diaperinus*, possuem um exoesqueleto responsável pelo suporte externo e proteção, composto principalmente por proteínas e quitina, sendo este último um como componente estrutural em inúmeros organismos, como insetos, crustáceos e ovos de nematoides (Cohen, 1993). Dessa forma, como discutido por Braga et al. (2013), os meios de cultura podem influenciar a produção de enzimas extracelulares, como quitinases. Neste estudo, o meio de AQ2% foi utilizado, provavelmente promovendo a produção de quitinase. Além disso, Braga e Araújo (2014) discutiram a importância da quitina como alvo para fungos nematófagos na colonização de formas pré-parasitárias de nematoides e artrópodes.

Em estudo conduzido por Valadão et al. (2020), foi registrado que *P. chlamydosporia* foi capaz de sobreviver após passar pelo trato gastrointestinal de galinhas domésticas e ainda germinar após ser excretada com as fezes. Há segurança em relação à saúde dos animais na administração de *P. chlamydosporia* (García et al., 2004). Dessa forma, sua utilização a campo poderia ser viável com a sua disponibilidade na ração em um futuro produto à base deste fungo (García et al., 2004).

Ressalta-se que o manejo do cascudinho apresenta desafios devido ao seu comportamento, pois muitas vezes ele se esconde em locais escuros e inacessíveis, como fendas, rachaduras, perto de pilares, sob comedouros e no solo, onde completa seu ciclo de vida (Alves et al., 2004). As medidas de controle tradicionalmente dependem de inseticidas químicos aplicados na superfície da cama, mas o uso

indiscriminado levou a problemas no contexto da Saúde Única e controle ineficaz de infestações em granjas avícolas (Chernaki-leffer e Almeida, 2001). Conclui-se que o controle biológico de *A. diaperinus* pelo fungo *P. chlamydosporia* (VC4) foi eficaz em condições laboratoriais e mais delineamentos experimentais em condições a campo podem vir a colaborar com a sua aplicabilidade.

4 | Declaração de Conflito de Interesse

Os autores declaram não existir conflito de interesse.

5 | Comitê de Ética

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Federal da Paraíba, sob registro 23000.000663.2021-17.]

6 | Agradecimentos

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FAPES (Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais), pelo apoio financeiro em toda a pesquisa do grupo.

7 | Referências

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. **Dados gerais da avicultura e suinocultura em 2022**. Relatório Anual 2023. Disponível em: <<https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2023/04/Relatorio-Anual-2023.pdf>>. Acesso em: 1º mar. 2024.

Alves, L.F.A.; Alvez, V.S.; Bressan, D.F.; Pedro, M.O.J.; Neves, P.M.O.J.; Alves, S.B. Ocorrência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Moniliales: Moniliaceae) em adultos de cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae), em aviários comerciais em Cascavel, PR. **Neotropical Entomology**, 33: 793-795, 2004.

Braga, F.R.; Araújo, J.V.; Soares, F.E.F.; Araujo, J.M.; Tavela, A.O.; Carvalho, L.M.; Mello, I.N.K.; de Paula, A.T.; Lelis, R.; Queiroz, J.H. Interaction of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on *Amblyomma cajannense* engorged females and enzymatic characterisation of its chitinase. **Biocontrol Science and Technology**, 23(5): 584-594, 2013.

- Braga, F.R.; de Araújo, J.V. Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 98(1): 71-82, 2014.
- Chernaki-leffer, A.M.; Almeida, L.M. Exigências térmicas, período de desenvolvimento e sobrevivência de imaturos *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, 30: 365-368, 2001.
- Cohen, E. Chitin synthesis and degradation as targets for pesticide action. **Archives of Insect Biochemistry Physiology**, 22: 245-261, 1993.
- Crippen, T.L.; Sheffield, C.L.; Beier, R.C.; Nisbet, D.J. The horizontal transfer of *Salmonella* between the lesser mealworm (*Alphitobius diaperinus*) and poultry manure. **Zoonosis and Public Health**, 65: 23-33, 2018.
- Daniel, J.F.S.; Scalco, A.V.; Souza, R.M.; Ocampos, F.M.M.; Barison, A.; Alves, L.F.A.; Neves, P.M.O.J. Susceptibility of *Alphitobius diaperinus* to *Beauveria bassiana* extracts. **Natural Product Research**, 33: 3033-3036, 2019.
- Dinev, I. The darkling beetle (*Alphitobius diaperinus*) - a health hazard for broiler chicken production. **Trakia Journal of Science**, 1: 1-4, 2013.
- Esteves, I.; Peteira, B.; Atkins, S.D.; Magan, N.; Kerry, B. Production of extracellular enzymes by different isolates of *Pochonia chlamydosporia*. **Mycological Research**, 113(8): 867-76, 2009.
- Fabritius, H.; Sachs, C.; Raabe, D.; Nikolov, S.; Friák, M.; Neugebauer, J. Chitin in the exoskeletons of Arthropoda: From Ancient Design to Novel Materials Science. In: Gupta, N.S. **Chitin: topics in geobiology**. Dordrecht: Springer, 2011. p.35-60.
- Ferraz, C.M.; Soares, F.E.F.; Sena, C.C.; Silva, L.P.C.; Araújo, J.V.; Moreira, T.F.; Monteiro, F.C.; Braga, F.B. Interaction of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* on eggs of *Spartocera dentiventris* (Berg) (Hemiptera: Coreidae) under laboratory conditions. **Brazilian Journal of Biology**, 81(4): 1122-1124, 2021.
- Fonseca, J.S.; Altoé, L.S.C.; Carvalho, L.M.; Soares, F.E.F.; Braga, F.R.; Araújo, J.V. Nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* to control parasitic diseases in animals. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 107(12): 3859-3868, 2023.
- García, L.; Bulnes, C.; Melchor, G.; Vega, E.; Ileana, M.; de Oca, N.M.; Hidalgo, L.; Marrero, E. Safety of *Pochonia chlamydosporia* var *catenulata* in acute oral and dermal toxicity/pathogenicity evaluations in rats and rabbits. **Veterinary and Human Toxicology**, 46(5): 248-250, 2004.
- Gehring, V.S.; Santos, E.D.; Mendonça, B.S.; Santos, L.R.; Rodrigues, L.B.; Dickel, E.L.; et al. *Alphitobius diaperinus* control and physicochemical study of poultry litters treated with quicklime and shallow fermentation. **Poultry Science**, 99: 2120-2124, 2020.
- Rohde, C.; Alves, L.F.A.; Neves, P.M.O.J.; Alves, S.B.; da Silva, E.R.L.; de Almeida, J.E.M. Selection of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. isolates against *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, 35(2): 231-240, 2006.
- Schmidt, N.S.; Silva, C.L. Pesquisa e Desenvolvimento na Cadeia Produtiva de Frangos de Corte no Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, 56(3): 467-482, 2018.
- Senna, C.C.; Sena, F.P.; da Paz, J.S.; de Barros Rios, A.; Ferraz, C.M.; Lenz, D.; Soares, F.E.F.; Tobias, F.L.; Hiura, E.; de Araújo, J.V.; Braga, F.R. Colonization and destruction of ants of the genus *Camponotus* sp. (Hymenoptera: Formicidae) in vitro by the fungus *Pochonia chlamydosporia* in the southeast region of Brazil. **3 Biotech**, 8(8): 333, 2018.
- Singh, N.; Johnson, D. Baseline Susceptibility and Cross-Resistance in Adult and Larval *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) Collected from Poultry Farms in Arkansas. **Journal of Economic Entomology**, 108: 1994-1999, 2015.
- Smith, R.; Hauck, R.; Macklin, K.; Price, S.; Dormitorio, T.; Wang, C. A review of the lesser mealworm beetle (*Alphitobius diaperinus*) as a reservoir for poultry bacterial pathogens and antimicrobial resistance. **World's Poultry Science Journal**, 78(1): 197-214, 2022.
- Valadão, M.C.; Carvalho, L.M.; Vieira, I.S.; Neves, P.H.; Ferreira, V.M.; Campos, A.K.; Soares, F.E.F.; Ferraz, C.M.; Vilela, V.L.R.; Braga, F.R.; Araújo, J.V. Germination capacity of the *Pochonia chlamydosporia* fungus after its passage through the gastrointestinal tract of domestic chickens (*Gallus gallus domesticus*). **Experimental Parasitology**, 216: 107936-107940, 2020.
- Wolf, J.; Gouvea, A.; Silva, E.R.L.; Potrich, M.; Appel, A. Physical methods and hydrated lime for management of lesser mealworm. **Ciência Rural**, 44(1): 161-166, 2014.
- Wolf, J.; Potrich, M.; Lozano, E.R.; Gouvea, A.; Pegorini, C.S. Combined physical and chemical methods to control lesser mealworm beetles under laboratory conditions. **Poultry Science**, 94(6): 1145-1149, 2015.