



Nota

Huevos de *Toxocara canis* como anzuelo para hongos geófilos en una ciudad subtropical



María Viviana Bojanich^{a,*}, María Mercedes Sarmiento^b, Gustavo Giusiano^b,
Magdalena Mangiaterra^b y Juan Ángel Basualdo^c

^a Cátedra de Microbiología General, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina

^b Área de Micología, Instituto de Medicina Regional, Universidad Nacional del Nordeste, Resistencia Chaco, Argentina

^c Centro Universitario de Estudios Microbiológicos y Parasitológicos, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de la Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 29 de junio de 2014

Aceptado el 26 de septiembre de 2014

Palabras clave:

Método de espolvoreado

Hongos nematófagos

Parasitismo fúngico

R E S U M E N

Antecedentes: Las diferentes técnicas de aislamiento permiten recuperar hongos en función de su capacidad para utilizar o no un determinado sustrato. La técnica de espolvoreado es un método para la recuperación de hongos nematófagos del suelo. Estos hongos son predadores naturales de los nematodos y están ampliamente distribuidos en la naturaleza.

Objetivos: Detectar hongos con posible capacidad nematófaga en suelos de parques de la ciudad de Corrientes (Argentina).

Métodos: Las muestras de tierra fueron tomadas eligiendo al azar una zona del suelo entre dos árboles, desechando la hojarasca y a no más de 2 cm de profundidad. El aislamiento se realizó según la técnica de espolvoreado utilizando huevos de *Toxocara canis* como anzuelo.

Resultados: Se recogieron 18 muestras de suelo, de las que se aislaron 6 géneros y 8 especies de hongos. El método del espolvoreado, simple y eficiente, tiene la ventaja de utilizar una pequeña cantidad de suelo sin tratamiento y permite aislar hongos que pueden crecer sobre huevos de geohelminths. Este estudio permitió recuperar hongos de los géneros *Bipolaris*, *Fusarium*, *Purpureocillium*, *Curvularia*, *Phoma* y *Scytalidium*.

Conclusiones: No se ha encontrado bibliografía de los géneros *Curvularia*, *Phoma* y *Scytalidium* que describa la interacción de estos hongos con huevos de nematodos y queda, por tanto, el desafío de investigar cuál es su verdadera acción sobre estos huevos.

© 2014 Revista Iberoamericana de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Toxocara canis eggs as bait for soil fungus in a subtropical city

A B S T R A C T

Background: The use of different isolation techniques allows the recovery of fungi based on their ability to use selective substrates. The sprinkle method is a technique for the recovery of nematophagous fungi in the soil. These fungi are natural predators of nematodes and are widely distributed in nature.

Aims: To detect possible fungi with nematophagous ability in the soil of city parks in Corrientes (Argentina).

Methods: The soil samples were taken from an area of ground between two trees and to no more than 2 cm deep. The isolation was performed according to the sprinkle method with *Toxocara canis* eggs as bait.

Results: Eighteen soil samples were collected, and 6 genera and 8 species of fungi were isolated. The sprinkle method, simple and efficient, has the advantage of using a small amount of untreated soil for the isolation of fungi that can grow on the eggs of geohelminths. The genera *Bipolaris*, *Fusarium*, *Purpureocillium*, *Curvularia*, *Phoma* and *Scytalidium* were isolated in this study.

Keywords:

Soil sprinkle method

Nematophagous fungi

Fungal parasitism

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: mavibojanich@yahoo.com.ar (M.V. Bojanich).

Conclusions: No other studies describing the interaction between the genera *Curvularia*, *Phoma* and *Scytalidium* with nematode eggs have been found in the literature, thus more studies are required to determine what is their real action on these eggs.

© 2014 Revista Iberoamericana de Micología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

El suelo, como ecosistema, constituye un hábitat complejo y heterogéneo que alberga una gran riqueza de especies vegetales, animales y microbianas, lo que hace de él un ambiente apropiado para el desarrollo de microorganismos tanto eucariotas (algas, hongos y protozoos) como procariotas (bacterias y arqueas). La interrelación de estos organismos es muy variada y compleja, y su distribución no es al azar, sino que sigue patrones espaciales de agregación²⁰.

Los procedimientos clásicos para estudiar los hongos del suelo se basan en cultivos *in vitro* que implican el aislamiento de conidias o hifas activas, y su crecimiento en un medio de cultivo axénico para su posterior identificación y cuantificación²².

El uso de diferentes técnicas de aislamiento permite recuperar los hongos en función de su capacidad para utilizar o no un determinado sustrato. La técnica selectiva de espolvoreado (*soil sprinkling method*) es un método simple y efectivo para la recuperación de hongos nematofagos del suelo. Esta técnica fue diseñada por Duddington en 1955, con *Panagrellus redivivus* L, nematodo de vida libre, como señuelo para estimular el crecimiento de los hongos². Gortari et al.¹⁶ adaptaron la técnica utilizando como anzuelo huevos de *Toxocara canis*, y así poder recuperar aquellos hongos con capacidad para desarrollarse sobre los huevos de estos nematodos, cuya cubierta es muy diferente a la de los estadios larvarios o a la de los gusanos adultos.

Los hongos nematofagos son predadores naturales de los nematodos, aunque algunos tienen predilección por los huevos y larvas de los geohelminthos a los que parasitan y destruyen¹². Estos hongos están ampliamente distribuidos en la naturaleza, pudiéndose aislar una diversidad de especies de diferentes ecosistemas. Algunos investigadores han estudiado la influencia de factores ambientales en su distribución para poder establecer si los hongos nematofagos son ubicuos o si están limitados a un hábitat en particular¹⁶.

El objetivo de este trabajo fue detectar hongos con posible capacidad nematofaga en suelos de plazas de la ciudad de Corrientes (Argentina) mediante el método de espolvoreado con huevos de *T. canis* como anzuelo.

Materiales y métodos

Área de muestreo

El muestreo se realizó en plazas del casco céntrico de la ciudad de Corrientes, Argentina (27°28'S-58°49'O). Esta ciudad es la capital de la provincia homónima y está situada a 52 m sobre el nivel del mar, a orillas del río Paraná. Su clima es subtropical sin estación seca. La humedad relativa media anual es del 72%. La temperatura media anual es de 21,5 °C, con temperaturas extremas de 45 °C en verano y -4 °C en invierno. Su régimen de lluvias es regular, con precipitaciones que van de 950 a 1.400 mm anuales²⁵. El casco céntrico de la ciudad cuenta con cinco plazas clásicas; las cuatro restantes son de menor tamaño. Las primeras son de planta cuadrada, tienen una superficie de una hectárea, y poseen una frondosa y añosa arboleda con sendas peatonales y lugares de juego y de recreo para niños. Las plazas de menor tamaño son de planta irregular, con arboleda, sendas peatonales y lugares de juego y de recreo acordes al tamaño de la misma. Algunas son sede de vendedores ambulantes, kioscos, locales de comida rápida y semanalmente se instala la

feria municipal de forma alternada. En todos los casos, se convierten en pulmones de la ciudad junto con las avenidas y bulevares²⁴.

Muestras de tierra

Las muestras de tierra fueron tomadas de acuerdo con la metodología utilizada por Ciarmela et al.⁹, con la elección al azar de una zona del suelo entre dos árboles, desechando la hojarasca y a no más de 2 cm de profundidad. Las muestras fueron colocadas en bolsas de papel estériles y conservadas en refrigeración hasta su procesamiento. El muestreo se realizó en la primavera del año 2011 y en el otoño de 2012, con la toma de una muestra de tierra por parque y por momento del año.

Aislamiento fúngico e identificación de los hongos

Para el aislamiento de los hongos que pudieran estar presentes en las muestras de tierra se utilizó la técnica selectiva de espolvoreado, siguiendo los pasos de Gortari et al.¹⁶, que utilizan huevos de *T. canis* como anzuelo, con la variante de que las placas fueron incubadas a temperatura ambiente sin estar envueltas en bolsas plásticas, y el tiempo de la primera observación fue reducido a 14 días. Cada muestra de tierra fue procesada por duplicado. Cuando se observó el desarrollo de hongos sobre los huevos, se procedió al aislamiento de los mismos con subcultivos en agar patata-cloranfenicol. Para determinar la identidad de los hongos se utilizaron diversas obras^{5,10,11,13–15,23,26,28–30}.

Resultados y discusión

De las 18 muestras se aislaron, por desarrollo sobre los huevos de *T. canis*, 44 cepas. Las mismas se clasificaron en 6 géneros y 8 especies (tabla 1).

El método del espolvoreado, simple y eficiente, tiene la ventaja de que al utilizar una pequeña cantidad de suelo sin tratamiento, brinda una información que es representativa de la mayoría de los hongos nematofagos presentes². Asimismo, permite aislar hongos que pueden crecer sobre huevos de geohelminthos; esto permitió cumplir con el objetivo del presente trabajo, al demostrarse la presencia de hongos con actividad antagonista sobre huevos de *T. canis* en el suelo de plazas de la ciudad de Corrientes.

Pocos autores han usado el método del espolvoreado. Lýsek et al.¹⁹ utilizaron como señuelo huevos de *Ascaris lumbricoides*, que permitieron aislar de varias regiones de Cuba hongos de los géneros *Cunninghamella*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Humicola*, *Mortierella*, *Paecilomyces*, *Penicillium* y *Verticillium*. En Costa Rica, Soto-Barrientos et al.²⁷, con el uso de tres métodos para el aislamiento del suelo de hongos nematofagos, obtuvieron con la técnica del espolvoreado el 83% de los aislamientos; tres especies de *Arthrobotrys*, y los géneros *Candelabrella*, *Trichoderma*, *Beauveria*, *Clonostachys* y *Lecanicillium* fueron los organismos aislados. En Argentina, Gortari et al.¹⁶ lograron aislar *Acremonium*, *Aspergillus*, *Chrysosporium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mortierella*, *Mucor*, *Paecilomyces* y *Penicillium* con la técnica del espolvoreado y huevos de *T. canis*. Finalmente, de Souza Maia Filho et al.¹², en Río Grande del Sur (Brasil), con el mismo señuelo que Gortari et al.¹⁶, recuperaron cepas de *Aspergillus*, *Acremonium*, *Bipolaris*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Mucor* y *Trichoderma*.

Tabla 1
Géneros y especies que crecieron sobre los huevos de *Toxocara canis*

Géneros y especies	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Número de cepas	%
<i>Bipolaris australiensis</i>		Xx							x	3	6,8
<i>Curvularia clavata</i>	X		x	X	Xx		x			6	14,6
<i>Curvularia lunata</i>	X	x	x	x		Xx			Xx	8	18,2
<i>Curvularia pallescens</i>			x							1	2,3
<i>Fusarium chlamydosporum</i>	X	X						X		3	6,8
<i>Purpureocillium lilacinus</i>	Xx		x	X	xx	X		X		8	18,2
<i>Phoma</i> sp.	x	x	x	x						4	9
<i>Scytalidium</i> sp.	Xx	Xx	x	x	x	Xx			Xx	11	24,1
Total	44	100									

X: otoño; x: primavera.

Nuestro estudio nos permitió recuperar 6 géneros, de los cuales 3, *Bipolaris*, *Fusarium* y *Purpureocillium*, fueron hallados también por los autores nombrados anteriormente, y 3 géneros (*Curvularia*, *Phoma* y *Scytalidium*) no se habían encontrado hasta ahora parasitando o interactuando con huevos de nematodos.

Respecto a los cambios introducidos en la técnica de Gortari, cabe aclarar que por ser Corrientes una ciudad más húmeda y calurosa que La Plata (Argentina), las incubaciones no se realizaron en bolsas plásticas: debido a las condiciones climáticas se generaba una alta concentración de humedad dentro de las placas. El otro cambio fue acortar el tiempo de observación de los cultivos, ya que en 3 semanas el crecimiento era tal que no permitía distinguir los huevos de *T. canis*, ni tampoco si había desarrollo fúngico sobre ellos. Cuando la temperatura era templada la primera observación se realizó a los 14 días, y cuando superaba los 28 °C, a partir del día 7.

Purpureocillium lilacinus, también aislado en otros estudios, es una de las especies que se halló con mayor frecuencia en este trabajo. Este hongo tiene una reconocida acción sobre los huevos de *T. canis*^{1,3,4,7,17}. Dentro del género *Fusarium*, varias especies han sido citadas como antagonistas de huevos de *T. canis*: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium pallidoroseum* y *Fusarium solani*^{8,12,16}. La presencia de *Fusarium chlamydosporum* ampliaría el espectro de especies de este género con capacidad ovicida. El género *Curvularia* representó, con tres especies, el 34% de los aislamientos. Este género es conocido por su capacidad celulolítica y queratinolítica como patógeno de vegetales y de animales, respectivamente^{6,21}. No se han encontrado referencias de su actividad sobre huevos de *T. canis* ni de otros geohelminths. Sin embargo, su desarrollo sobre los huevos fue frecuente y abundante (fig. 1).

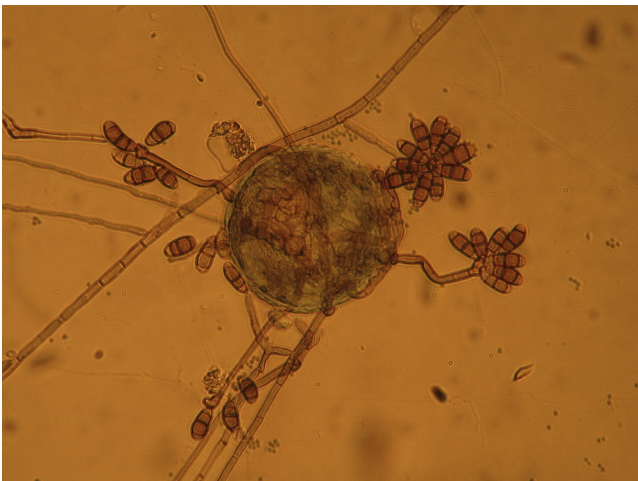


Figura 1. *Curvularia lunata* en crecimiento sobre un huevo de *Toxocara canis* (×40).

Los hongos considerados tradicionalmente como coelomicetos son un vasto y heterogéneo grupo de *taxa* dispersos en numerosos y variados nichos ecológicos, tales como suelo, desechos orgánicos o agua. Asimismo, pueden ser parásitos de hongos, líquenes, plantas, insectos y vertebrados, actuando unas veces como simbiontes y otras como patógenos^{18,23}. Los géneros *Scytalidium* y *Phoma*, que aparecieron con asiduidad en este estudio, están incluidos en este grupo. De ellos tampoco se han encontrado informes relacionados con su actividad sobre huevos de *T. canis* o de otros geohelminths.

Los hongos de este estudio cuya capacidad ovicida no se conoce dejan el desafío de investigar cuál es su verdadera acción sobre los huevos de los nematodos.

El interés de conocer la presencia de hongos nematófagos en distintos lugares radica en que uno de los factores que condiciona el desarrollo y permanencia de los huevos de helmintos en el suelo es su destrucción por organismos antagonistas, como son los hongos. Este informe es un aporte al conocimiento de la distribución de aquellos hongos que pueden crecer sobre huevos de geohelminths para, a partir de ello, evaluar su acción sobre los mismos.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Nordeste el apoyo económico, y a la Sra. Liliana Alegre su asistencia en la preparación de materiales.

Bibliografía

- Araujo JM, Araújo JV, Braga FR, Ferreira SR, Oliveira Tavela A. Predatory activity of chlamydospores of the fungus *Pochonia chlamydosporia* on *Toxocara canis* eggs under laboratory conditions. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2013;22:171–4.
- Bailey F, Gray NF. The comparison of isolation techniques for nematophagous fungi from soil. *Ann Appl Biol.* 1989;114:125–32.
- Basualdo JA, Ciarmela ML, Sarmiento PL, Minvielle MC. Biological activity of *Paecilomyces* genus against *Toxocara canis* eggs. *Parasitol Res.* 2000;86:854–9.
- Braga FR, Ferreira SR, Araújo JV, Araujo JM, Silva AR, Carvalho RO, et al. Predatory activity of *Pochonia chlamydosporia* fungus on *Toxocara* (syn. *Neoscaris*) *vitulorum* eggs. *Trop Anim Health Prod.* 2010;42:309–14.
- Cano J, Guarro J. The genus *Aphanascus*. *Mycol Res.* 1990;94:355–433.
- Carter E, Boudreaux C. Fatal cerebral phaeohiphomycosis due to *Curvularia lunata* in an immunocompetent patient. *J Clin Microbiol.* 2004;42:5419–23.
- Carvalho RO, Araújo JV, Braga FR, Araujo JM, Alves CD. Ovicidal activity of *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* on *Toxocara canis* eggs. *Vet Parasitol.* 2010;169:123–7, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.12.037>.
- Ciarmela ML, Arambarri AM, Basualdo JA, Minvielle MC. Effect of saprotrophic soil fungi on *Toxocara canis* eggs. *MJM.* 2010;6:75–80.
- Ciarmela ML, Minvielle MC, Lori G, Basualdo JA. Biological interaction between soil fungi and *Toxocara canis* eggs. *Vet Parasitol.* 2002;103:251–7.
- Currah RS. Taxonomy of the Onygenales: Arthrodermataceae, Gymnoascaceae, Myxotrichaceae and Onygenaceae. *Mycotaxon.* 1985;24:1–216.
- De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas of clinical fungi. Utrecht/Reus: Centraal Bureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili; 2000. p. 1126.

12. De Souza Maia Filho F, Nunes Vieira J, Aires Berne ME, Stoll FE, da Silva Nascente P, Pötter L, et al. Fungal ovicidal activity on *Toxocara canis* eggs. *Rev Iberoam Micol.* 2013;30:226–30.
13. Domsch KH, Gams W, Anderson T. *Compendium of soil fungi*, 1. London: Academic Press; 1980.
14. Ellis MB. *Dematiaceous Hyphomycetes*. Kew, UK: Commonwealth Mycological Institute; 1971.
15. Gams W. *Cephalosporium-artige Schimmelpilze (Hyphomycetes)*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1971.
16. Gortari C, Cazau C, Hours R. Hongos nematófagos de huevos de *Toxocara canis* en un paseo público de La Plata, Argentina. *Rev Iberoam Micol.* 2007;24:24–8.
17. Gortari MC, Galarza BC, Cazau MC, Hours RA. Comparison of the biological properties of two strains of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson associated to their antagonistic effect onto *Toxocara canis* eggs. *MJM.* 2008;4:35–41.
18. Ikram A, Hussain W, Satti ML, Wiqar MA. Invasive infection in a young immunocompetent soldier caused by *Scytalidium dimidiatum*. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2009;19:64–6.
19. Lýsek H, Fassatiová O, Cuervo Pineda N, Lorenzo Hernández N. Ovicidal fungi in soils of Cuba. *Folia Parasitol (Praha).* 1982;29:265–70.
20. Nogales B. La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. *Ecosistemas.* 2005;14:41–51.
21. Pereira Freire SV, Mesquita Paiva L, de Luna-Alves Lima EA, Maia LC. Morphological, cytological, and cultural aspects of *Curvularia pallescens*. *Rev Microbiol.* 1998;29.
22. Pfenning LH, Magalhães de Abreu L. Hongos del suelo saprófitos y patógenos de plantas. Capítulo 8. En: Moreira F, Huising EJ, Bignell DE, editores. *Manual de Biología de suelos tropicales. Muestreo y caracterización de la biodiversidad bajo suelo*. México: 2008.p. 337.
23. Piontelli Laforet E. *Manual de microhongos filamentosos comunes. I. Claves, descripciones, imágenes y literatura*. 2.ª ed. Valparaíso, Chile: Alba Producciones; 2013.
24. Salas AA. Plazas de Corrientes. Capítulo 2. En: *Corrientes: calles, plazas y túneles de la ciudad. Otra mirada (desde 1588 a la actualidad)*. Buenos Aires: Artpress; 2009. p. 41–55.
25. Servicio Meteorológico Nacional. [Marzo 2014]. Disponible en: <http://www.smn.gov.ar/>
26. Solé M, Cano J, Pitarch LB, Stchigel AM, Guarro J. Molecular phylogeny of *Gymnoascus* and related genera. *Stud Mycol.* 2002;47:141–52.
27. Soto-Barrientos N, de Oliveira J, Obando Vega R, Montero-Caballero D, Vargas B, Hernández-Gamboa J, et al. *In-vitro* predatory activity of nematophagous fungi from Costa Rica with potential use for controlling sheep and goat parasitic nematodes. *Rev Biol Trop.* 2011;59:37–52.
28. Van Oorschot CAN. A revision of *Chrysosporium* and allied genera. *Studies in Mycology*. No. 20. Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures; 1980. p. 46–9.
29. Von Arx JA. *The genera of fungi sporulating in pure culture*. 3.ª ed. Vaduz: J. Cramer; 1981.
30. Von Arx JA. The ascomycete genus *Gymnoascus*. *Persoonia.* 1986;13:173–83.