



Paulo: Cortez, 2007.

WALL, Marilene Loewen; PRADO, Marta Lenise do; CARRARO, Telma Elisa. **A experiência de realizar um Estágio Docência aplicando metodologias ativas.** São Paulo: Revista Acta Paulista de Enfermagem, nº 21, 3ª ed., p. 515-9, 2008.

MÉTODO E TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS APLICADAS AO ISOLAMENTO DE FUNGOS ENTOMOPATÓGENICOS *Beauveria Sp.* EM LABORATÓRIO

Tereza Raquel Lopes Torres
Aluna do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas (CFP/UFCCG)

Michel Avelino de Alencar
Aluno do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas (CFP/UFCCG)

Francisca Amanda Abreu Martins
Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Horticultura Tropical (CCTA/UFCCG)
amandaabreu123@gmail.com

José Cezario de Almeida
Professor Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia)(CFP/UFCCG)
cezario@cfp.ufccg.edu.br

Resumo

Fungos entomopatogênicos podem ser isolados do ambiente para serem utilizados como redutores e colonizadores de insetos-praga em áreas agrícolas. Este estudo teve como objetivo prospectar, isolamentos de insetos moribundos, estruturas fúngicas de *Beauveria bassiana*, relatados como promissores entomopatogênicos. Delimitou-se o estudo em importante área de cultivos de hortaliças no município de Cajazeiras, Alto Sertão paraibano, buscando a ocorrência de insetos moribundos sobre o solo, os quais foram coletados com auxílio de pinças entomológicas e acondicionados em placas de *Petri*, conduzidos para laboratório de Microbiologia da Central de Saúde (UFCCG), como atividade integrativas dos alunos vinculados à monitoria da Disciplina Microbiologia e Biologia Celular. Nessas condições, ocorreram os procedimentos de assepsia e submissão do material coletado à análise estereoscópica, encontrando hifas e resíduos miceliais intra-inter-inseto. As estruturas foram transferidas para meio *Saborround Dextrose Ágar*, adicionando cloranfenicol a 2%. Os isolados, avaliados diariamente, foram incubados por 12 dias sob temperatura de 28 ± 2 °C. Em decorrência das impurezas provenientes do campo foram feitos repicagens, a fim de obter a seleção dos isolados de *B. bassiana*. Obteve-se 10 linhagens de *B. bassiana* que estão incubados em meios de culturas no



Laboratório de Microbiologia da Central de Saúde da UFCCG, para serem empregados em bioensaios em controle biológico.

Palavras-Chave: Monitoria, Fungos, Controle.

Introdução

Fungos entomopatogênicos podem ser isolados do ambiente para serem utilizados como redutores e colonizadores de insetos-praga em áreas agrícolas. O interesse na utilização do controle biológico tem aumentado significativamente nas últimas décadas, constituindo-se em importante ferramenta no manejo integrado de insetos-praga, uma vez que utiliza inimigos naturais para manter a população de pragas abaixo dos níveis de dano econômico, evitando, ao mesmo tempo, prejuízos ambientais e para a saúde humana decorrentes do uso de inseticidas químicos.

Dentro desse contexto, os agentes biocontroladores apresentam importante propriedade de conferir proteção às plantas causando doenças a insetos-praga. Em contrapartida ao uso de agrotóxicos, o controle biológico oferece vantagens, quanto à seletividade de hospedeiros, capacidade de dispersão a partir de indivíduos da população, controle mais duradouro, podendo o patógeno permanecer por vários anos no ambiente, sinergismo com inseticidas químicos em subdosagens e inibição de desenvolvimento de resistência pela praga.

Os fungos entomopatogênicos produzem metabólitos tóxicos aos seus hospedeiros que auxiliam esses agentes no estabelecimento de infecções em insetos. Esses compostos incluem enzimas de vários tipos e moléculas biologicamente ativas; dentre essas, destacam-se os depsipeptídios, formados por aminoácidos e hidroxíácidos alternados. As funções desses compostos na patogenicidade incluem a dissolução da cutícula de insetos para a indução da doença, supressão do sistema imunológico, interferência com os canais de íons e funções celulares nos hospedeiros. A cutícula esclerotizada dos insetos é utilizável de maneira muito limitada pelos fungos em geral, mas os entomopatogênicos, que penetram no hospedeiro através da cutícula, desenvolveram eficientes enzimas para a degradação dessa camada protetora dos insetos, transformando-a em nutrientes (ALVES, 2002).

O autor citado estudou o efeito de *B. bassiana* sobre *D. saccharalis*, aplicando um elevado potencial de inóculo a temperatura média de 25°C e umidade relativa de 90%, em



condições de laboratório, verificando que os insetos paravam de se alimentar após 72 horas, com mortalidade de 100% dos insetos inoculados depois de 96 horas. Este mesmo autor relatou que *B. bassiana* tem condições de colonizar diversas ordens de insetos, tanto em laboratório quanto no campo, tendo registrado infecções enzoóticas e epizoóticas em coleópteros, lepidópteros, hemípteros, dípteros, himenópteros e ortópteros.

Os requisitos nutricionais para a germinação e o crescimento de *B. bassiana* não são complexos, crescendo em diversos ambientes, facilmente cultivado em meios naturais e sintéticos, envolvendo fatores fisiológicos quanto à fonte de carbono e nitrogênio necessários ao desenvolvimento hifal. A infecção desse fungo é resultante da penetração de suas hifas via tegumento facilitada por mecanismos físicos e enzimáticos; os insetos atacados apresentam-se cobertos por micélio branco, que esporula em condições adequadas de umidade e luz, expressando a característica da doença denominada de muscardine branca.

O ciclo biológico de *B. bassiana* apresenta duas fases distintas na infecção de insetos: a parasitária, que se inicia com a penetração tegumentar, em aproximadamente 12 horas. Os conídios, unidades infectivas, geminam em qualquer parte da cutícula do inseto. O tubo germinativo penetra através da cutícula, atinge a hemolinfa, diferencia-se em estruturas leveduriformes e conseqüentemente ocorre a morte do inseto; a sapróbia ocorre depois que os conidióforos se exteriorizam, formando os conídios que se dispersam no ambiente (ALMEIDA et. al., 2015, p.475).

Este trabalho teve como objetivo prospectar de insetos moribundos estruturas viáveis fúngicas de *Beauveria bassiana*, com potencial biotecnológico, que possam ser cultivados, armazenados e aplicados em estudos específicos na área de controle biológico. Assim, a obtenção de suas estruturas viáveis serão recuperadas em diversos ambientes laborais e empregadas em pesquisas.

Desenvolvimento

Estratificou-se uma importante área de cultivos de hortaliças no município de Cajazeiras, Alto Sertão paraibano, buscando-se a ocorrência de insetos moribundos sobre o



solo, os quais foram coletados com auxílio de pinças entomológicas e acondicionados em placas de *Petri*, conduzidos para laboratório de Microbiologia da Central de Saúde (UFCEG). Nessas condições, ocorreram os procedimentos de assepsia e submissão do material coletado à análise estereoscópica, encontrando hifas e resíduos miceliais intra-inter-inseto. As estruturas foram transferidas para meio *Saborround Dextrose Ágar*, adicionando cloranfenicol a 2%. Os isolados, avaliados diariamente, foram incubados por 12 dias sob temperatura de 28 ± 2 °C. Em decorrência das impurezas provenientes do campo foram feitos repicagens, a fim de obter a seleção dos isolados de *B. bassiana*. Obteve-se 10 linhagens de *B. bassiana* que estão mantidas em meios de culturas na UFCEG, para serem empregados em bioensaios de pragas agrícolas no Laboratório de Entomologia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). Espera-se que os isolados de *B. bassiana* sejam eficientes em testes *in vitro*, para possíveis aplicações em campo, visando à segurança agrícola, ambiental e obtenção de cultivos sustentáveis.

As estruturas esporulantes de *B. bassiana*, originalmente isolada de inseto moribundo coletado sobre o solo em áreas de cultivo agrícola foram processadas no Laboratório de Microbiologia da Central de Laboratórios de Saúde do Centro de Formação de Professores da UFCEG, a partir das atividades integradoras dos estudantes monitores e voluntários da monitoria das disciplinas Microbiologia e Biologia Celular (períodos 2015-1 e 2015-2). Essas formas do inseto foram utilizadas no processo de reisolamento de *B. bassiana*. Os cadáveres foram lavados com soluções de hipoclorito de sódio a 2% por dois minutos, em álcool a 70% por três minutos e duas vezes em água destilada autoclavada por três minutos, depois foram transferidos para placas de *Petri* (6,5 x 2,5cm) forradas com papel-filtro esterilizado e umedecido em água destilada autoclavada e, então; mantidos nessa câmara úmida para confirmação do agente causal.

A viabilidade do patógeno foi avaliada, determinando-se o percentual de germinação dos conídios, conidiogênese e crescimento da colônia em meio BDA (Oxoid). Para se estimar a viabilidade da germinação dos conídios, 100µL de cada CL₅₀ foi espalhada com uma alça de *Drigalsky* sobre a superfície do meio de cultura em placas de *Petri* de 9cm de diâmetro, em triplicata e incubadas em câmara (BOD). O percentual de germinação foi aferido 18 horas depois da inoculação, contando-se 500 conídios germinados e não germinados, de acordo com o método adotado por ALBUQUERQUE *et al.*



(2005), em faixas que corresponderam aos diâmetros vertical e horizontal do campo de leitura de 1mm em microscópio ótico (400x).

O crescimento colonial foi mensurado com o auxílio de um paquímetro a partir de discos de 5mm de diâmetro, obtidos das subculturas. Esses discos foram transferidos para o centro de placas de Petri de 9cm de diâmetro contendo BDA, em triplicata. As leituras do crescimento radial foram feitas em milímetros nos intervalos de 3, 6, 9, 12 e 15 dias de incubação.

Na determinação da conidiogênese, 100 μ L de cada CL₅₀ foi transferido para tubos de ensaio com 10mL de suspensão aquosa com Tween-80[®] (0,05%). Essa suspensão foi agitada por 5min em *vortex* (400rpm), em seguida, com o auxílio de uma pipeta de *Pasteur* foi transferida uma alíquota de 100 μ L para uma câmara de *Neubauer*, onde procedeu-se a quantificação dos conídios em cada intervalo de 3, 6, 9, 12 e 15 dias de incubação, conforme metodologia de LI & HOLDOM (1995).

Considerações

Os resultados obtidos neste estudo indicaram que *B. bassiana* possui excelente viabilidade antes e depois do reisolamento, parâmetro que recomenda seu emprego em programa de controle da praga, considerando os meios de produção in vitro, fatores ambientais e métodos de exposição no campo.

Novos estudos e pesquisas aplicadas devem ser desenvolvidas, vez que, preliminarmente, os ensaios em laboratório promovidos no desenvolvimento desse estudo, atem-se ao a versatilidade e participação dos estudantes monitores, que ao fazerem suas atividades inerentes à monitoria, também, despertam as suas atenções e habilidades em pesquisas.

Nesta perspectiva, a monitoria conseguiu promover a interação aluno-professor e aluno-aluno, no processamento de coletas a campo e manuseio em laboratório, a partir das técnicas e métodos de esterilização de materiais, formulação de meio de cultivo para microorganismos, uso de equipamentos, como estufas, microscópios, lupas, vidrarias. Além da compreensão e interpretação de resultados e desenvolvimento de escrita científica e produção de relatórios.



Contudo, a monitoria constitui-se em importante ferramenta integrativa e de possibilidade crítica na construção do conhecimento, na vertente do aprender fazendo. E consequentemente possibilitar a socialização desse saber.

Referências

ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ – SP. v.1, p.765-777. 2002.

ALMEIDA, J. C.; ALBUQUERQUE, A. C.; LUNA, E. A. A. L. Viabilidade de *Beauveria bassiana* (BALS.) Vuill. reisolado de ovos, larvas e adultos de *Anthonomus grandis* (Boheman) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) artificialmente infectado. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.72, n.4, p.473-480, 2005.

Li, D. P.; Holdom, D. G. Effects of nutrients on colony formation, growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **J. Invertebr. Pathol.**, v.65, n.4, p.253-260. 1995.

AS CONTRIBUIÇÕES DA MONITORIA DE HISTOLOGIA PARA OS MONITORES DOS CURSOS DE MEDICINA E CIÊNCIAS BIOLÓGICAS UACV/UACEN/CFP/UFCG – RELATO DE EXPERIÊNCIA

Maria Geilza dos Santos
Estudante do curso de Ciências biológicas UFCG/CFP
geylzasantos@gmail.com

Ewerton Ferreira Fernandes
Estudante do curso de Ciências Biológicas UACEN/UFCG/CFP
ewertonstfernandes@hotmail.com

Andrezza Lobo Rodrigues
Estudante do Curso de Medicina UACV/CFP/UFCG
andrezalobo3@gmail.com

Neuzelito Cavalcanti Sobral Filho
Estudante do Curso de Medicina UACV/CFP/UFCG
neuzelitofilho@gmail.com

Valcleberson Elias Farias
Estudante do Curso de Medicina UACV/CFP/UFCG