

IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS E FUNGOS PRESENTES NO TRATO INTESTINAL DE LARVAS DE *DROSOPHILA*

GIULIA FERNANDES DA VEIGA¹; JULIANA TRAPP JUNG DE SOUZA²; JULIANA CORDEIRO³; EDUARDO BERNARDI⁴

¹Universidade Federal de Pelotas – giuliafveiga27@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – trappjungjuliana@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – jlncdr@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – edu.bernardi@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) apresentam grande diversidade ecológica, ocupando diferentes nichos e explorando variados recursos para alimentação, acasalamento, oviposição e desenvolvimento larval (CARSON, 1971). Elas utilizam substratos como frutas em decomposição, seiva, fungos, flores e outros materiais orgânicos (MARKOW; O'GRADY, 2008). Muitas são saprófitas, onde a alimentação ocorre a partir de leveduras presentes na matéria orgânica em decomposição, e podem escolher diferentes locais para se alimentar e ovipositar (CARSON, 1971).

Entre essa diversidade, as moscas antófilas ou *flower-breeding drosophilids*, que se desenvolvem exclusivamente em flores e apresentam comportamento especializado, ganham destaque (BRNCIC, 1983). Embora os adultos sejam generalistas, consumindo diversas substâncias em decomposição, as larvas podem ter dieta mais específica, especialmente nos grupos associados a flores (DIAS, 2017). A dieta larval ainda não é totalmente conhecida, mas pesquisadores indicam que pólen e microrganismos presentes nas flores são fontes importantes de alimento (CARSON, 1971).

Diante disso, este trabalho teve como objetivo investigar as fontes alimentares de drosófilas antófilas por meio da análise dos microrganismos presentes no trato intestinal de larvas coletadas em flores de *Ipomoea alba* (Convolvulaceae). Os resultados servirão de base para futuras comparações entre os fungos encontrados nas flores e nas larvas.

2. METODOLOGIA

O trabalho foi desenvolvido em quatro etapas: (i) coleta de flores, (ii) produção dos meios de cultura, (iii) dissecação do intestino larval e (iv) isolamento dos microrganismos.

(i) coleta de flores: Para iniciar o experimento, foram coletadas flores de *Ipomoea alba*, de onde emergem indivíduos do grupo *lutzii* (CORDEIRO *et al.*, 2020), nos arredores do Campus Capão do Leão. O material foi armazenado em frascos de vidro tampados com um voil e levados a uma sala de criação com temperatura e umidade controladas (+25°C; 60%u.r.) até a eclosão das larvas.

(ii) produção dos meios de cultura: Foram preparados três tipos de meios: MacConkey (Mc), Chapman (Ms) e Ágar Batata Dextrose (Ab). As quantidades seguiram as instruções do fabricante: 10,3 g de Mc em 200 ml de água destilada; 22,2 g de Ms em 200 ml de água; e 7,8 g de Ab em 200 ml de água. Os produtos foram pesados, dissolvidos em água destilada e esterilizados em autoclave por 20

min a 100 °C/1 atm. Após o meio (Ab) recebeu 2ml de ácido tartárico na concentração de 10% para aumento da acidez e evitar o crescimento de bactérias, favorecendo apenas o crescimento fúngico. Os meios foram distribuídos igualmente em placas de petri identificadas e levados à geladeira até utilização.

(iii) dissecação do intestino larval: Foram utilizadas 10 larvas do grupo *lutzii*, coletadas entre o segundo e terceiro instar. A escolha dessa fase de desenvolvimento foi baseada na facilitação da dissecação, devido ao aumento do tamanho dos indivíduos, e na garantia de que a alimentação prévia fosse visível, uma vez que o corpo transparente das larvas permite observar os vestígios alimentares (BHATT; NECKAMEYER, 2013). Após esse procedimento, os indivíduos foram mantidos em baixa temperatura para induzir a morte de forma controlada, a fim de serem posteriormente utilizados (KOŠTÁL et al., 2016). Antes da dissecação, os indivíduos foram esterilizados com álcool 70% para prevenir qualquer risco de contaminação.

A dissecação ocorreu em placa escavada com água destilada, utilizando microestiletes e estereomicroscópio. Os intestinos foram colocados em frascos com 1 mL de água destilada e cinco pérolas de vidro, que foram agitadas por 1 minuto em vortex para maceração e homogeneização. Cinco intestinos foram colocados em cada frasco. O material resultante foi distribuído em placas de Petri (0,1 mL por placa), espalhado com alça descartável. Todo o processo foi realizado próximo à chama do bico de Bunsen para evitar contaminação. As placas com meios (Mc) e (Ms) foram incubadas a 36 °C e as com meio (Ab) a 25 °C até o crescimento das colônias.

(iv) identificação: Para a análise do material, foram preparadas lâminas de microscópio seguindo procedimentos microbiológicos padronizados (FREDERICK NATIONAL LABORATORY FOR CANCER RESEARCH, 2020). Primeiramente, cada lâmina foi devidamente limpa para evitar contaminações e garantir a qualidade da observação. Em seguida, a alça bacteriológica foi flambada. Após o resfriamento da alça, foi retirada uma amostra da cultura bacteriana e depositada no centro da lâmina, sendo espalhada cuidadosamente com movimentos circulares para formar uma camada uniforme de material. A coloração das bactérias foi realizada utilizando a técnica de Coloração de Gram, que permite diferenciar microrganismos pela estrutura da parede celular. O procedimento seguiu as etapas técnicas: cristal violeta (corante primário) por aproximadamente 1 minuto; lugol (solução de iodo) por 1 minuto; álcool (descorante) por poucos segundos; e safranina (contracorante) por cerca de 1 minuto (FREDERICK NATIONAL LABORATORY FOR CANCER RESEARCH, 2020). Após o término da coloração, as lâminas foram observadas ao microscópio óptico, possibilitando a caracterização morfológica e a diferenciação entre os tipos de bactérias presentes.

Para a análise do material fúngico, foi utilizada a técnica de impressão com fita adesiva, que é amplamente reconhecida na micologia para a observação de estruturas fúngicas. Esse método envolve a aplicação de um pedaço de fita adesiva sobre a superfície onde o fungo está presente, seguida da remoção da fita e sua fixação em uma lâmina de microscópio contendo uma gota de corante azul de algodão, para facilitar a visualização das estruturas celulares dos fungos, como hifas e esporos, devido à afinidade do corante com a quitina presente na parede celular dos fungos (CBS MED, 2022). Após a preparação das lâminas, estas foram observadas ao microscópio óptico, permitindo a identificação dos gêneros fúngicos com base nas características morfológicas das estruturas reprodutivas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os dados obtidos a partir do isolamento de microrganismos do trato intestinal de larvas do grupo *lutzii*.

Tabela 1: Microrganismos isolados do trato intestinal de larvas do grupo *lutzii* em diferentes meios de cultura.

Meio de cultura	Tipo de microrganismo observado	Observações
MS (Meio Chapman)	Cocos em cachos; bacilos gram-negativos	Predominância de cocos; bacilos presentes
Mc (Meio MacConkey)	Bacilos gram-negativos e gram-positivos	Presença de bactérias diversas
AB (Ágar Batata Dextrose)	Fungos	Colônias identificadas como <i>Paecilomyces</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Penicillium</i> e <i>Aspergillus</i>

A análise das placas provenientes do trato intestinal de larvas de *Drosophila lutzii* revelou predominância de cocos em cachos, bacilos gram-negativos no meio MS, bacilos gram-positivos e gram-negativos no meio Mc, e colônias fúngicas dos gêneros *Paecilomyces*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus* no meio AB. A presença de *Fusarium* e *Paecilomyces* é consistente com estudos anteriores (DIAS, 2017), indicando que esses gêneros podem representar fontes alimentares importantes para as larvas. A ausência de alguns fungos sugere que a alimentação larval pode ser seletiva, possivelmente influenciada pela digestibilidade, competição microbiana ou características específicas das flores e do estágio larval. Esses resultados destacam a importância de estudar a microbiota intestinal para entender a ecologia alimentar das larvas e o papel das flores como fontes de nutrientes, incluindo microrganismos associados.

4. CONCLUSÕES

As larvas pertencentes ao grupo *lutzii* possuem microbiota intestinal diversificada e dietas larvais relativamente específicas, apesar do caráter generalista dos adultos. O estudo amplia o conhecimento sobre a dieta de drosófilas antófilas, indicando que microrganismos presentes nas flores podem ter papel importante na alimentação larval, e fornece base para futuras comparações entre a microbiota floral e intestinal dessas espécies.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BHATT, P. K.; NECKAMEYER, W. S. Functional analysis of the larval feeding circuit in *Drosophila*. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, n. 81, p. 51062, 2013.
- BRNCIC, D. Ecology of flower-breeding *Drosophila*. In: GENETICS AND BIOLOGY OF DROSOPHILA. v. 3b, p. 333–382, 1983.
- CARSON, H. L. The ecology of *Drosophila* breeding sites. **Honolulu: University of Hawaii**, 1971.
- CBS MED. Azul de Algodão. 2022. Disponível em: <https://cbsmed.com.br/wp-content/uploads/2022/11/005762.pdf..>
- CORDEIRO, J.; DE OLIVEIRA, J. H.; SCHMITZ, H. J.; VIZENTIN-BUGONI, J. High niche partitioning promotes highly specialized, modular and non-nested florivore–plant networks across spatial scales and reveals drivers of specialization. *Oikos*, v. 129, n. 5, p. 619–629, 2020.
- DIAS, N. P. Espécies dos grupos Bromeliae, Flavopilosa e subgênero Phloridosa do gênero *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae): uma revisão de literatura aliada à análise de dieta de larvas antofílicas. 2017. 55 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – **Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Pelotas**, 2017.
- FREDERICK NATIONAL LABORATORY FOR CANCER RESEARCH. Preparation of a Gram Stain: Manual Method – SOP Number 22137. **Frederick, MD: National Cancer Institute**, 2020. 7 p. Disponível em: https://frederick.cancer.gov/sites/default/files/2022-04/Preparation_of_a_Gram_Stain_Manual_Method.pdf.
- KOŠTÁL, V.; KORBELOVÁ, J.; ŠTĚTINA, T.; POUPARDIN, R.; COLINET, H.; ZAHRADNÍČKOVÁ, H.; ŠIMEK, P. Physiological basis for low-temperature survival and storage of quiescent larvae of the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, p. 32346, 2016.
- MARKOW, T. A.; O'GRADY, P. M. Reproductive ecology of *Drosophila*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 363, n. 1497, p. 1737–1748, 2008.