

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA *IN VITRO* DE DOIS ISOLADOS DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *BEAUVERIA BASSIANA* (BALS.) VUILL. EM FÊMEAS INGURGITADAS DE *BOOPHILUS MICROPLUS* (CANESTRINI, 1887) (ACARI: IXODIDAE).

V.R.E.P. BITTENCOURT¹, E.J. SOUZA¹, S.L.F.S. PERALVA¹, A.G. MASCARENHAS¹, & S.B. ALVES²

(1) Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Biologia, UFRRJ, 23.851-970, Seropédica, RJ. (2) Departamento de Entomologia ESALQ/USP, Piracicaba, SP.

SUMÁRIO: As ixodidoses acometem os animais domésticos, silvestres e o homem em quase todo o mundo, e especificamente, o carrapato *Boophilus microplus* apresenta grande importância na pecuária nacional. Estima-se que todo o território brasileiro esteja incluído em zona potencialmente favorável a esta parasitose. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e avaliar metodologia de bioensaio com este carrapato, verificando a patogenicidade *in vitro* de dois isolados do fungo *Beauveria bassiana* (isolados 986 e 747), inoculados sob forma de suspensão conidial em fêmeas ingurgitadas desta espécie de carrapato e calcular as doses letais (DL) 50 e 90%. Para tal, realizou-se a infecção de 180 fêmeas ingurgitadas por isolado, divididas em cinco grupos tratados (10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 e 10^4) e um grupo controle com 30 fêmeas cada, avaliando-se os seguintes parâmetros: peso das fêmeas antes da postura, peso da postura e percentual de eclosão. Os resultados evidenciaram um baixo índice de eclosão nos grupos tratados, ocorrendo um decréscimo progressivo neste percentual conforme os índices de concentração aumentavam. Conseqüentemente, o percentual de controle foi mais elevado nos grupos tratados com as concentrações 10^8 e 10^7 , sendo estas as concentrações mínimas indicadas para avaliação deste entomopatógeno em condições de campo. A possibilidade de encontrar um método para o uso deste fungo para o controle de *B. microplus* poderá ter, como conseqüência, aumento na produtividade e menor poluição ambiental.

PALAVRAS - CHAVE: : *Boophilus microplus*, *Beauveria bassiana*, fungos entomopatogênicos, controle microbiano.

INTRODUÇÃO

O carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) é originário do continente asiático, sendo introduzido na maioria dos países tropicais e subtropicais através da importação de gado bovino (WHARTON, 1974). Este carrapato apresenta grande importância para a pecuária nacional e estima-se que praticamente todo o território brasileiro esteja incluído em zona potencialmente favorável a esta parasitose (HORN & ARTECHE, 1985). Este carrapato é encontrado desde o paralelo 32° norte até o 32° sul, com alguns focos 35° norte e sul; e calcula-se que até 75% dos bovinos da América do Sul vivem em zonas infestadas.

Os prejuízos causados pelo *B. microplus* são de difícil cálculo e as perdas diretas e indiretas devidas a esta parasitose: mortalidade de gado, principalmente das raças européias; desenvolvimento lento de animais parasitados, acarretando diminuição da produção de carne e leite; transmissão de agentes patogênicos, perdas na produção de couro e gastos com produtos carrapaticidas (PENNA, 1990).

A utilização de carrapaticidas, quando feita de forma indiscriminada, tem acarretado sérios problemas no que se refere a poluição do ambiente e ao aparecimento de resistência. Portanto, os agentes de controle microbiano devem ser estudados e fazer parte de um conjunto de medidas, que quando aplicadas, resultem na manutenção da população do artrópode, de forma que não causem danos econômicos.

No Brasil há observações sobre o controle biológico do *B. microplus* com predadores naturais, entre eles podemos citar insetos *Forficulidae* (GOULART *et al.*, 1986), anu (IHERING, 1940), perdiz (MENEHETI & ARIGONY, 1982), formigas, aranhas, ratos, camundongos, gaviões e galinhas (ROCHA, 1984).

Quanto ao controle microbiano desta espécie de carrapato, apenas dois patógenos foram estudados no Brasil, que possui clima do tipo tropical e subtropical, portanto ideal para o desenvolvimento de patógenos na natureza de forma endêmica. BRUM (1989) evidenciou a infecção natural de *B. microplus* pela bactéria *Cedecea lapagei*, que destrói o epitélio vaginal de fêmeas ingurgitadas, levando-as a morte, ocorrendo na natureza principalmente durante o inverno. BITTENCOURT (1992) promoveu a infecção artificial de ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* pelo fungo *Metarhizium anisopliae* observando elevada mortalidade e verificando o desenvolvimento do fungo na hemolinfa deste carrapato e alterações nas seguintes etapas da fase não parasitária: período de pré-postura, período de postura, índice de produção de ovos, período de incubação, período e percentual de eclosão.

Várias espécies de fungos entomopatogênicos que causam infecções em carrapatos das famílias Ixodidae e Argasidae já foram estudados em países de clima temperado. Entre elas podemos citar o *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *Beauveria bassiana*, *Penicillium insectivorum* e *Botrytis cinerea*. LIPA (1971) relatou que a importância de patógenos no controle de ácaros e carrapatos já foi demonstrada por vários pesquisadores, citando algumas epizootias causadas por vírus, protozoários e fungos.

O fungo *Beauveria bassiana* já foi encontrado promovendo infecções naturais em carrapatos das espécies *Hyalomma anatolicum* e *Ixodes ricinus* (SAMSINAKOVA, 1957), também foi utilizado em infecções artificiais, com resultados promissores, nesta última espécie (BOYCFV & RIZVANOV, 1960), e em *Hyalomma* sp. (TIAN, 1984), o que demonstra seu potencial patogênico para carrapatos.

A continuidade das pesquisas envolvendo o controle microbiano de pragas de importância veterinária é de extrema importância, visto que os resultados obtidos até o momento evidenciam a patogenicidade destes microrganismos para os artrópodes alvo.

MATERIAL E MÉTODOS

As fêmeas ingurgitadas, ovos e larvas não alimentadas de *B. microplus* utilizadas neste experimento foram mantidas na Estação para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz, a partir de amostras coletadas a campo, de animais naturalmente infestados.

As amostras de *B. bassiana* utilizadas neste experimento foram obtidas junto ao Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo.

Para manutenção da colônia de carrapatos foi mantido um bovino jovem de aproximadamente doze meses de idade, que foi submetido à infestações artificiais quinzenais com larvas de *B. microplus*.

As fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* utilizadas nas infecções foram coletadas 21 dias após a infestação artificial e levadas ao laboratório, lavadas, secas, pesadas, selecionadas com base nos seus aspectos, separadas em grupos de dez, colocadas em placas de Petri, para a infecção com os dois isolados de *B. bassiana* (isolado 747 obtido a partir de *Solenopsis invicta* naturalmente infectadas e isolado 986 obtido a partir de carrapatos de espécie não identificada e naturalmente infectados) e posteriormente levadas à câmara climatizada a 27°C e umidade relativa superior a 80%.

As suspensões de conídios foram preparadas a partir de fungos produzidos em meio de arroz dentro de sacos de polipropileno ou em meio de batata, dextrose e ágar (BDA) em tubos de ensaio, utilizando água destilada e espalhante adesivo Tween 80. Foram preparadas cinco suspensões com concentrações diferentes de conídios e quantificadas com auxílio de câmara de Neubauer. As suspensões de conídios foram preparadas em concentrações de 10^4 a 10^8 conídios por mililitro de solução (BITTENCOURT *et al.*, 1994).

Estas suspensões conidiais foram utilizadas para imersão *in vitro* de fêmeas ingurgitadas de *B. microplus*, com base nas técnicas de avaliação de carrapaticidas descritas por TORRADO & GUTIERREZ (1969) e STENDEL (1980). Após a imersão *in vitro*, as fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* foram acondicionadas em placas de Petri previamente preparadas, sendo dez fêmeas por placa perfazendo 30 fêmeas por cada grupo tratado e 30 fêmeas para o grupo controle. As fêmeas foram fixadas às placas por meio de uma fita adesiva de dupla face, para evitar que os ovos se misturassem e para que fosse mantida a identificação de cada fêmea através de números. Com isto foi possível a observação diária e a coleta de dados para avaliação do:

. Peso inicial da fêmea, valor obtido com a pesagem inicial das fêmeas ingurgitadas, em balança analítica, antes de serem fixadas à placa de Petri.

. Peso da postura, sendo obtido através da separação das posturas e pesagens feitas diariamente, sendo as mesmas acondicionadas em tubos de ensaio numerados, respectivos a cada fêmea; essa separação e pesagem de ovos diária se estendeu até a última postura observada, o peso da postura referente a cada fêmea corresponde ao somatório das pesagens parciais diárias.

. Percentual de eclosão de larvas, obtido por avaliação visual em método comparativo a um padrão pré estabelecido

O cálculo do percentual de controle foi realizado utilizando as seguintes fórmulas:

$$ER = \frac{\text{peso dos ovos (g)}}{\text{peso inicial das fêmeas (g)}} \times \% \text{ eclosão}$$

$$\% \text{ Controle} = \frac{ER (\text{testemunha}) - ER (\text{tratado})}{ER (\text{testemunha})} \times 100$$

Sendo, ER = eficiência reprodutiva

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação ao isolado 986, podemos verificar que os valores dos percentuais de eficiência reprodutiva e de eclosão decrescem progressivamente de acordo com o aumento das concentrações dos tratamentos, sendo que a concentração 10^8 conídios/ml apresenta menores percentuais de eclosão e de eficiência reprodutiva. Verifica-se também, que com o aumento nas concentrações há um aumento no percentual de controle (Tabela 1). Através da análise de próbites obtivemos os valores das CL_{50} e CL_{90} deste isolado que são respectivamente $2,23 \times 10^6$ conídios/ml e $1,41 \times 10^8$ conídios/ml.

Em relação ao isolado 747, podemos observar que os valores percentuais de eficiência reprodutiva e percentual de eclosão decrescem progressivamente à medida que aumentam as concentrações nos tratamentos, com exceção dos valores de percentual de eclosão e eficiência reprodutiva observadas na concentração 10^5 conídios/ml, que são de valores menores aos encontrados na concentração 10^6 conídios/ml. Na concentração 10^7 encontramos valor de percentual de eclosão menor do que o encontrado na concentração 10^8 conídios/ml. Observa-se também que com o aumento nas concentrações ocorre por conseguinte o aumento no percentual de controle (Tabela 2). Através da análise de próbites obtivemos os valores da CL_{50} e CL_{90} deste isolado que são respectivamente $3,21 \times 10^6$ conídios/ml e $8,74 \times 10^8$ conídios/ml.

Todos os dados obtidos no grupo controle foram similares aos encontrados no trabalho de DAVEY *et alii* (1984) que trabalharam com condições de umidade e temperatura similares as deste experimento.

Tabela 1 Dados relativos a infecção de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* com o fungo *Beauveria bassiana* (isolado 986).

Tratamento	Parâmetros Avaliados		
	% Eclosão ¹	Eficiência Reprodutiva ¹	% Controle
Controle	82,76 a	44,79 a	0
10^2	74,67 a	40,11 a	10,45
10^3	34,40 b	19,30 b	56,91
10^6	35,65 b	14,77 bc	67,02
10^7	18,18 b	5,24 c	88,30
10^8	20,20 b	5,92 c	86,78

¹ As médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna, não diferem entre si, a 5% de probabilidade.

Tabela 2. Dados relativos a infecção de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* com o fungo *Beauveria bassiana* (isolado 747).

Tratamento	Parâmetros Avaliados		
	% Eclosão ¹	Eficiência Reprodutiva ¹	% Controle
Controle	88,27 a	45,87 a	0
10^4	83,33 a	43,85 a	4,40
10^5	39,20 b	16,65 b	63,70
10^6	53,85 b	17,53 b	61,78
10^7	23,63 b	8,04 b	82,47
10^8	31,58 b	7,62 b	83,39

¹ As médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna, não diferem entre si, a 5% de probabilidade.

BOYCEV & RIZVANOV (1960) trabalhando com um isolado de *B. bassiana* infectou fêmeas de *I. ricinus* em postura observando que a mortalidade após 20 dias foi de 100% e o percentual de eclosão dos ovos oriundos destas fêmeas foi de 6,5%. No presente trabalho, o percentual de eclosão obtido nos grupos tratados com os dois isolados não foi inferior a 18,18%, obtido na concentração 10^7 do isolado 986. A diferença observada nos dados dos dois trabalhos pode ser devida à diferença entre espécies de carrapatos, isolados do fungo e também pela falta de informação sobre a concentração da suspensão conidial utilizada na infecção de *I. ricinus*.

TIAN (1984) avaliou a efetividade de *B. bassiana* em ninfas ingurgitadas de *Hyalomma* e observou elevada eficácia trabalhando com formulações em pó, porém não observou resultados expressivos quando trabalhou com suspensões, mas não citou o uso de espalhantes adesivos para obter as suspensões conidiais, fato este que pode ter sido a causa dos diferentes resultados obtidos por este autor e o presente trabalho.

KAAYA *et al.* (1996) trabalharam à campo com *B. bassiana* e *M. anisopliae* e os carrapatos *Rhipicephalus appendiculatus* e *Amblyomma variegatum* e observaram que *B. bassiana* promoveu um percentual de eclosão de 0% em *A. variegatum* e em *R. appendiculatus* este mesmo percentual variou de 0 a 6%. Estes resultados obtidos a campo demonstram o potencial destes patógenos para o controle de carrapatos. No presente trabalho, os percentuais de eclosão observados nos grupos tratados não foram tão baixos quanto os observados por KAAYA *et al.* (1996), porém deve-se observar que as condições são distintas, as espécies avaliadas por este último possuem o hábito de se alojar em locais do corpo do hospedeiro, sombreados e úmidos, como por exemplo, o pavilhão auditivo, o que propicia um desenvolvimento ótimo de fungos entomopatogênicos.

Com base nos dados analisados e nas observações diárias podemos concluir que o fungo *B. bassiana* possui elevada eficiência no controle biológico de fêmeas ingurgitadas de *B. microplus*, sendo portanto recomendados mais estudos para o desenvolvimento de métodos para sua utilização no controle integrado deste parasita, na tentativa de diminuir a poluição ambiental. A continuidade das pesquisas envolvendo o controle microbiano de pragas de importância veterinária é de extrema importância, visto que os resultados

obtidos até o momento evidenciam a patogenicidade destes microrganismos para os artrópodes alvos.

SUMMARY

The ticks are obligatory parasites that attack the man, domestic and wild animals throughout the world. The tick *Boophilus microplus* is one of the most important concerns in the national cattle raising and it is estimated that the whole Brazilian territory is favorable for this parasitosis. The purposes of this work were the developing and evaluating a bioassay with this tick, by checking the *in vitro* pathogeny of two different isolates of the fungus *Beauveria bassiana* (isolates 747 and 986). Engorged females were exposed to the fungus by immersion in conidial suspensions and the lethal doses 50% and 90% were calculated. Each isolate with 180 engorged females were infected and divided in five treated groups (10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8) and one control group. There were 30 ticks for each one. The evaluated parameters were: weight of females before oviposition, weight of egg masses and larval percentage of eclosion. The results showed a low percentage of larval eclosion in the treated groups. A progressive decrease of eclosion was observed following the increase of concentration. Consequently the 10^7 and 10^8 concentrations groups were the ones with high potential for controlling the tick. These are the minimum concentrations for the fungus testing under field conditions. It's very possible that the use of *B. bassiana* for *B. microplus* control would raise the cattle productivity and decrease the environmental pollution.

KEY-WORDS: *Boophilus microplus*, *Beauveria bassiana*, entomopathogenic fungus, microbial control.

REFERÊNCIAS

- BITTENCOURT, V. R. E. P. 1992. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 105p.
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; C.L. MASSARD. & A.F. LIMA. 1994. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre a fase não parasitária do ciclo biológico de *Boophilus microplus*. *Revista Universidade Rural. Série Ciências da Vida*, 16: 49 - 55.
- BOYCEV, D. & K. RIZVANOV. 1960. Relation of *Botrytis cinerea* to ixodid ticks. *Zoologie Zeitschrift Ukrainien*, 39:460.
- BRUM, J. G. W. 1989. Infecção em teleogina de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) por *Cedecea lapagei* (Grescott, 1981): etiopatologia e sazonalidade. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 44p.
- DAVEY, R.B.; R.L. OSBURN & J.A. MILLER. 1984. Ovipositional and morphological comparisons of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) collected from different geographical areas. *Annals of the Entomological Society of America*, 77: 1-5.
- GOULART, S.; CHRISTOFORO, M.T.; AMEIXEIRO, A.R.. Ecologia de carrapatos. XVII. Predatismo de insetos forficulidae sobre ovos de *B. microplus* (Canestrini). *Ars. Veterinária*, 2:233-236, 1986.
- HORN, S.C. & C.C.P. ARTECHE. 1985. Situação parasitária da pecuária no Brasil. *A hora Veterinária*, 4: 12-32.
- HIRERING, R. 1940. *Dicionário dos Animais do Brasil*. São Paulo, Diretoria de Publicações Agropecuárias da Secretaria de Agricultura, Ind. e Comércio do Estado de São Paulo, 898p.
- KAAYA, G.P., E.N. MWANGI & E.A. OUNA. 1996. Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 67: 15-20.
- LIPA, J. J. 1971. Microbial control of mites and ticks. In: *Microbial control of insects and mites*. BURGESS, H. D. & N.W. HUSSEY (ed.), Academic Press, London, UK. p.357- 374.
- MENEGHETTI, J.O.; T.H.A. ARIGONY. 1982. Insetos, aranhas e carrapatos na alimentação da perdiz. *Natureza em revista*, 9: 40-5.
- PENNA, V.M. 1990. *Boophilus microplus*: A resistência genética do hospedeiro como forma de controle. *Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais*, Belo Horizonte, MG, 4: 3-65.
- ROCHA, U.F. 1984. Biologia e controle biológico do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini). *Boletim Técnico/Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal*, 3: 1-32.
- SAMSINAKOVA, A. 1957. *Beauveria globulifera* (Speg.) Pic. Iako Parasit. Klistete *Ixodes ricinus*. *Zoologie List.*, 6:329-30.
- STENDEL, W. 1980. The relevance of different test methods for the evaluation of tick controlling substances. *Journal of the South African Veterinary Association*, 51:147-152.
- TORRADO, J. M. G. & R.O. GUTIERREZ. 1969. Método para medir la actividad de los acaricidas sobre larvas de garrapata. Evolucion de sensibilidad. *Revista Instituto Agropecuario de Patologia Animal*, 6: 135-158.
- TIAN, G.F. 1984. Infecting and Killing *Hyalomma detritum* with fungi. *Journal of Veterinary Science and Tecnology*, 7: 11-13.
- WHARTON, R.H. 1974. Ticks with special emphasis on *Boophilus microplus* In: Control of artropods of medical and veterinary importance. PAL, R. & R.H. WHARTON (ed.). Plenum Press, London, UK, p. 134-177.

(Received 1 november 1996, Accepted 4 July 1997)