

(X) Graduação () Pós-Graduação

POSTULADO DE KOCH: caracterização de doença em planta

Gabriéli Barbosa dos Santos Silva
Instituto Federal de Mato Grosso do Sul – IFMS
gabrieli.santos@estudante.ifms.edu.br

Kélly Capristo Silva
Instituto Federal de Mato Grosso do Sul – IFMS
kelly.silva@estudante.ifms.edu.br

Jaffer Dzieciol Fontes
Instituto Federal de Mato Grosso do Sul – IFMS
jaffer.campos@estudante.ifms.edu.br

Matheus Felipe dos Santos Silva Rocha
Instituto Federal de Mato Grosso do Sul – IFMS
matheus.rocha2@estudante.ifms.edu.br

Rafael Olivo Pontin
Instituto Federal de Mato Grosso do Sul – IFMS
rafaelpontin15@gmail.com

Cristiana Maia de Oliveira
Instituto Federal de Mato Grosso do Sul – IFMS
cristiana.oliveira@ifms.edu.br

RESUMO

O Postulado de Koch é um método utilizado para caracterizar doenças causadas por microrganismos em animais e vegetais em pesquisas e estudos laboratoriais. Este método foi proposto para ser realizado na prática, dentro da disciplina de fitopatologia aplicada, visando determinar o agente causal de doença em material vegetal. Foi escolhido a cultura da cenoura, que apresentava sinais de crescimento de organismo patogênico. O trabalho foi desenvolvido no laboratório de biologia do IFMS Campus Naviraí. Foram utilizadas técnicas básicas em fitopatologia como esterilização de materiais, uso de autoclave, estufa, fluxo laminar, câmara de crescimento, preparo de meio de cultura tipo Batata-dextrose-ágar, técnica de isolamento, preparo de lâminas para microscopia óptica, entre outros. Aplicando o postulado foram identificados dois organismos: *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. Com ênfase no *Fusarium* spp., determinou-se, por meio de pesquisas, que o agente causador da injúria na cenoura infectada foi o *Fusarium oxysporum*, que provocou uma doença denominada Podridão Basal ou Podridão do *Fusarium*. O grande desafio do trabalho foi a realização completa das etapas do postulado de Koch e a identificação dos organismos, contudo a prática contribui para relacionar teoria e prática permitindo maior compreensão dos conteúdos trabalhados em aula.

Palavras-chave: Doenças; Organismos; Aprendizado; Prática.

1 CONTEXTUALIZAÇÃO

Robert Koch publicou seu postulado em 1882 em um artigo sobre a etiologia da tuberculose, porém só em 1890 este postulado foi divulgado como conhecemos atualmente. O Postulado de Koch consiste na sequência de procedimentos utilizados para estabelecer a relação causal, entre um microrganismo e uma doença, ele é dividido em 4 etapas, sendo elas a associação contraste patógeno-hospedeiro, isolamento/cultivo, inoculação do organismo em plantas saudáveis e reisolamento (CASTILLO, 2007).

A cenoura (*Daucus carota* L.) é da família Apiaceae e do grupo de raízes tuberosas, sendo produzidas em todas as regiões do Brasil, destacando-se nas regiões Sudeste, Nordeste e Sul. A cenoura é uma das principais hortaliças consumidas no Brasil, sua produção atual é aproximadamente 800 mil toneladas, seu ciclo fenológico varia de 85 a 110 dias, dependendo do clima e da variedade das cultivares (LOPES et al, 2016).

O gênero *Fusarium* que pertence ao Reino Fungi, sendo da classe Sordariomycetes, são chamados hialohifomicetos e podem ocasionar doença em plantas. Os fungos do gênero *Fusarium* são microrganismos globalmente difundidos no mundo, vivendo como saprófitos no solo, água e plantas. O gênero *Fusarium* compreendem aproximadamente 200 espécies agrupadas em complexos de espécies filogenéticas que apresentam pouca ou nenhuma diferença morfológica entre si (CHAVES, 2015).

A doença podridão de Fusário é causada pelos fungos do gênero *Fusarium*, ela ocorre a partir de ferimentos onde apresenta como sintomas uma podridão seca ou escura em geral é recoberta por estruturas como micélio e esporos de coloração branca cotonosa. Os cultivos de verão são mais propícios ao ataque desta doença, seu controle deve ser preventivo, evitando-se ferimentos e o plantio em áreas cujo haja uma sucessão de culturas suscetíveis a doença (LOPES et al, 2016).

O gênero *Penicillium* pertence ao Reino Fungi, ele pode crescer em ambientes diversos principalmente em ambientes escuros e arejados e em alimentos como pão, frutas e cereais, levando a produção de mofo e em matéria orgânica biodegradável, podendo causar infecções chamadas Peniciloses e intoxicações em animais e seres humanos. O *Penicillium* apresenta mais de 1000 espécies, onde algumas espécies produzem bactericidas antibióticos como penicilina e griseofulvina que permitem ao fungo lutar contra a competição feroz das bactérias saprófitas pelo alimento (SEMESP).

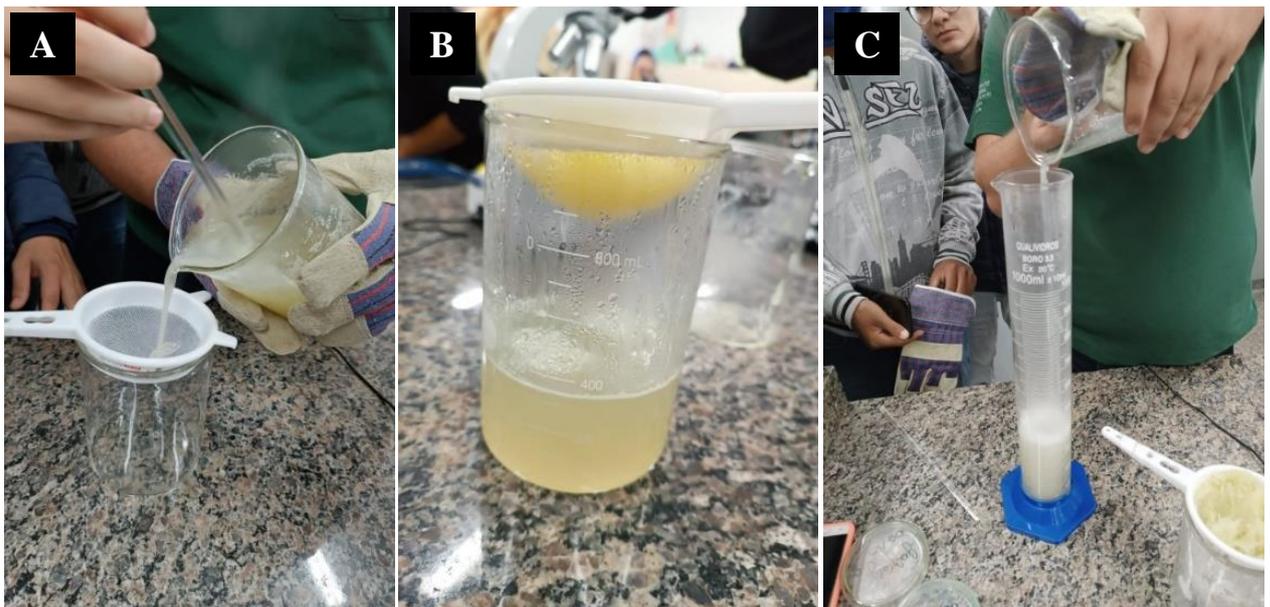
O trabalho teve como objetivo, aprender a executar o Postulado de Koch e definir o agente causador da doença na cenoura.

2 DESENVOLVIMENTO

A prática foi realizada no laboratório de biologia do Instituto Federal de Mato Grosso do Sul (IFMS) Campus de Naviraí. Teve início no dia 11 de Maio de 2022 e foi dividido em quatro semanas.

A primeira etapa a ser realizada foi o preparo do meio de cultura tipo Batata-Dextrose-Ágar (BDA) para o cultivo *in vitro* do organismos a ser isolado. Para isso foram realizados os seguintes procedimentos: ralou-se 100 g de batata inglesa comum em um béquer, adicionou-se 400 mL de água destilada e levou-se ao micro-ondas por 5 minutos, parando de 30 em 30 segundos até que a batata estivesse cozida e macia. Depois disso, com auxílio de uma peneira, a mistura foi coada em outro béquer e o líquido resultante foi transferido para uma proveta graduada e o volume foi ajustado para 500 mL adicionando-se água destilada (Figuras 1 a, b e c).

Figura 1 – Fotografias das práticas realizadas no dia 11 de Maio de 2022. A) Fotografia da mistura sendo coada. B) Fotografia do líquido resultante da mistura coada. C) Fotografia do líquido da mistura coada sendo transferido para uma proveta graduada.



Fonte: Elaborado pelos autores (2022).

O próximo passo foi pesar 5g de ágar e 5g de dextrose em balança analítica e colocar

em erlenmeyer (utilizou-se dois erlenmeyer com as respectivas quantidades dos reagentes), depois disso, acrescentou-se 250 mL do líquido proveniente do cozimento da batata em cada erlenmeyer, tapou-se com uma rolha de algodão, cobriu-se com papel manteiga, amarrou-se para manter uma boa vedação, cobriu-se com papel alumínio com seu lado fosco voltado para o ambiente, identificou-se e por fim, foi levado para a autoclave. Depois disso, o meio de cultura foi armazenado até a sua utilização (Figuras 2 a, b e c).

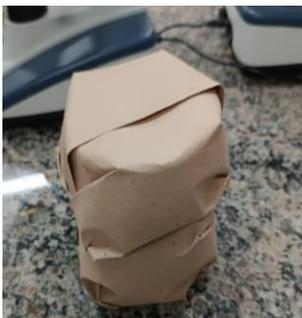
Figura 2 – Fotografia das práticas realizadas no dia 11 de Maio de 2022. A) Dextrose e Ágar dentro dos erlenmeyer. B) Mistura dos reagentes Dextrose e Ágar, com o líquido resultante da batata, tapado com rolha de algodão, papel manteiga, amarrado com barbante e coberto com papel alumínio. C) Erlenmeyers dentro da autoclave.



Fonte: Elaborado pelos autores (2022).

Doravante esterilizou-se 2 placas de Petri, embaladas com papel pardo, em estufa à 180° por 2 horas (Figura 3).

Figura 3 – Placas de Petri esterilizadas e embaladas com papel pardo.



Fonte: Elaborado pelos autores (2022).

Uma semana depois, no dia 18 de Maio, o meio de cultura foi derretido, uma vez que estava sólido no erlenmeyer, com o auxílio do micro-ondas por 2 minutos, parando de 15 em 15 segundos para mexer. Depois, dentro de uma capela de fluxo laminar já esterilizada, verteu-se o meio de cultura nas duas placas de Petri esterilizadas, tapou-se, flambou-se no bico de Bunsen, em seguida, identificou-se e deixou-se repousando na capela para esfriar. Por último, flambou-se a abertura do erlenmeyer no bico de Bunsen, tapou-se com a rolha de algodão, o papel manteiga, amarrou-se com barbante e cobriu-se com papel alumínio com seu lado fosco voltado para o ambiente.

No dia 25 de Maio, passada uma semana, deu-se início a primeira etapa do postulado de Koch e o material infectado selecionado foi uma cenoura. Foi feita a etapa do Postulado associando a doença ao agente causal através dos sintomas apresentados no material (Figura 4).

Figura 4 – Cenoura infectada utilizada no postulado de Koch.

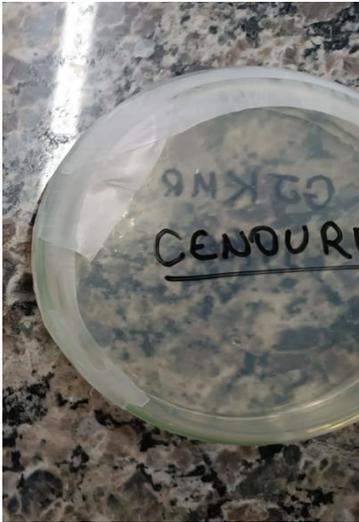


Fonte: Elaborado pelos autores (2022).

A segunda etapa do postulado, isolamento e cultivo, foi realizada na capela de fluxo laminar esterilizada, onde estabeleceu-se o isolamento direto em meio de cultura das estruturas encontradas na cenoura, da seguinte forma: Com as mãos esterilizadas com álcool 70 e a alça de platina esterilizada em álcool e em fogo (no bico de Bunsen), inseriu-se sobre a parte infectada da cenoura para remover frações da estrutura do organismo formado e

transferiu-se para a placa de Petri com o meio de cultura (em quatro pontos nas extremidades) (Figura 5).

Figura 5 – Fotografia da placa de Petri com o meio de cultura vertido.

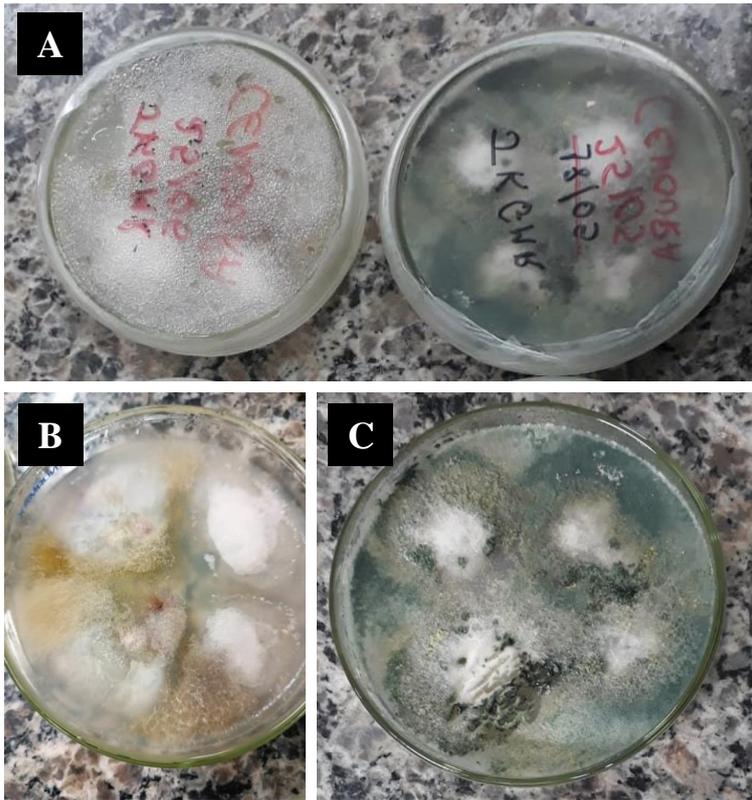


Fonte: Elaborado pelos autores (2022).

Depois disso, tapou-se, vedou-se com fita Parafilm e a placa foi transferida para a câmara de crescimento (BOB) com Temperatura de 25°C e Fotoperíodo de 12 horas para que os organismos se desenvolvessem. O processo se repetiu para a segunda placa com meio de cultura.

Depois de uma semana, no dia 8 de Junho, percebeu-se que mais de um tipo de organismo havia se desenvolvido no meio de cultura nas placas de Petri, ambos apresentando estruturas “cotonosas” característica de fungo (Figuras 6 a, b e c).

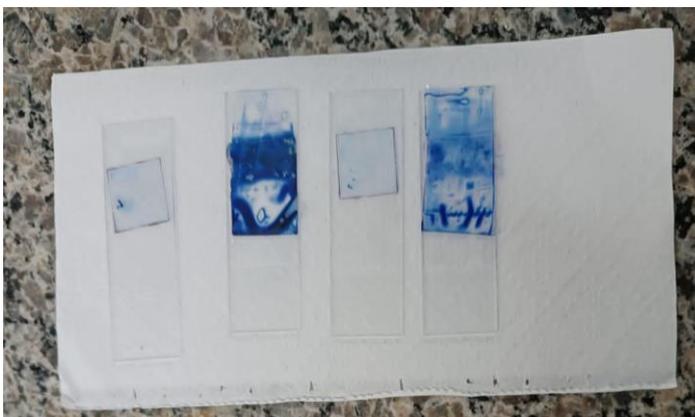
Figuras 6 – Fotografias de placas de Petri com meio de cultura contaminado. A) Placas de Petri tapadas, vedadas e identificadas. B) Placa de Petri aberta contaminada. C) Placa de Petri aberta contaminada.



Fonte: Elaborado pelos autores (2022).

Preparou-se quatro lâminas para observar os fungos desenvolvidos no microscópio óptico, sendo que duas das placas foram preparadas com fita adesiva transparente, substituindo a lamínula, e também foi desenvolvida uma suspensão de fungos (Figura 7).

Figura 7 – Fotografia de lâminas preparadas para a microscopia óptica.



Fonte: Elaborado pelos autores (2022).

Esterilizou-se a alça de platina em álcool e em fogo (na lamparina), com um conta gotas, depositou-se uma gota de corante azul de etileno na lâmina, introduziu-se a alça no

organismo fúngico e transferiu-se frações dele para a lâmina com corante e cobriu-se com a lamínula. No caso das lâminas com fita adesiva transparente, recortou-se a fita com tamanho aproximado ao da lamínula, com o auxílio de uma pinça, inserimos ela diretamente sobre o organismo e depois colou-se sobre o corante na lâmina para visualizar as estruturas no microscópio.

Para a aplicação de inoculação do organismo em cenoura sadia, Depositou-se água destilada sobre uma das placa de Petri com os organismos fúngicos e utilizou-se um pincel limpo para mexer, formando uma suspensão de fungo. Nesta etapa, foi utilizado uma cenoura sadia (sem contaminação por microrganismos) para realizar-se uma infecção artificial com a suspensão de fungos preparada e proceder com o postulado (Figura 8).

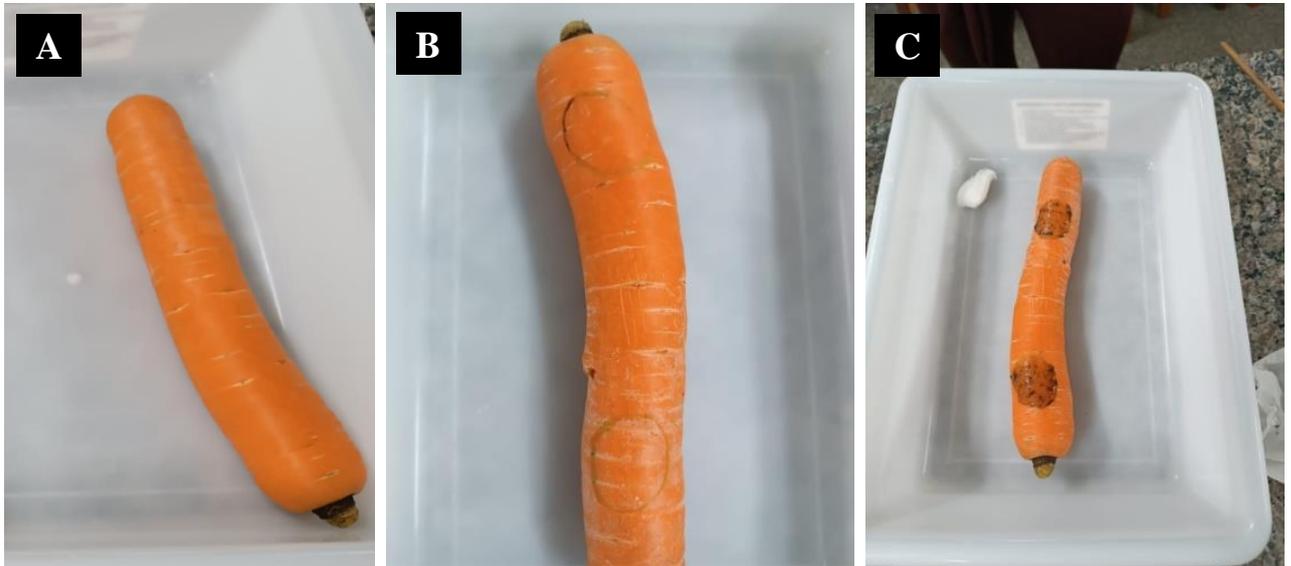
Figura 8 – Fotografia da suspensão de fungos sendo preparada.



Fonte: Elaborado pelos autores (2022).

Portanto, lavou-se a cenoura com água e sabão, secou-se com papel absorvente e perfurou-se alguns locais previamente demarcados para que a suspensão pudesse penetra-la mais precisamente, em seguida, depositou-se com o pincel a suspensão sobre ela (Figuras 9 a, b e c). Depois disso, a cenoura já contaminada de forma artificial foi colocada em uma bandeja, junto de um pedaço de algodão umedecido com água destilada para manter a umidade, coberta por um plástico filme e levada para câmara de crescimento com 25°C de temperatura e 12 horas de fotoperíodo.

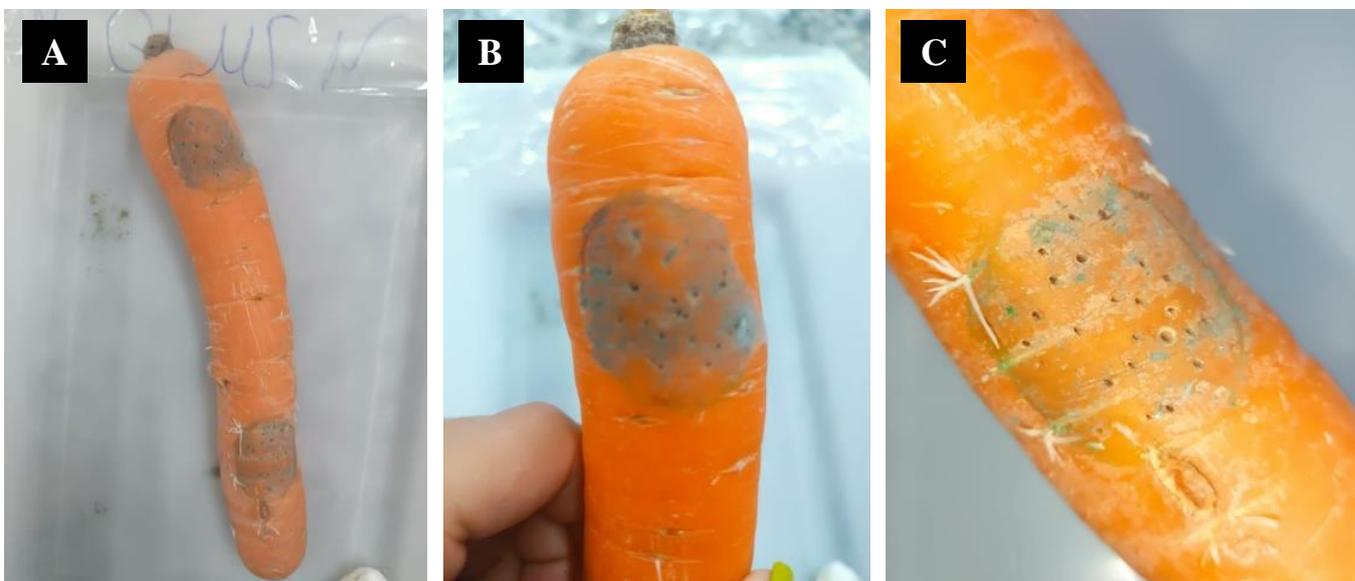
Figuras 9 – Fotografias da cenoura sadia sendo infectada artificialmente. A) Cenoura sadia seca, depois de lavada com água e sabão. B) Cenoura com suas áreas de infecção demarcadas. C) Cenoura já infectada com a suspensão de fungos e algodão umedecido com água destilada.



Fonte: Elaborado pelos autores (2022).

Em 17 de Junho, foi feito o isolamento dos organismos que cresceram no material infectado artificialmente (Figuras 10 a, b e c). Preparou-se lâminas para visualizar comparar o fungo desenvolvido no material atual, com o fungo crescido no material inicialmente doente.

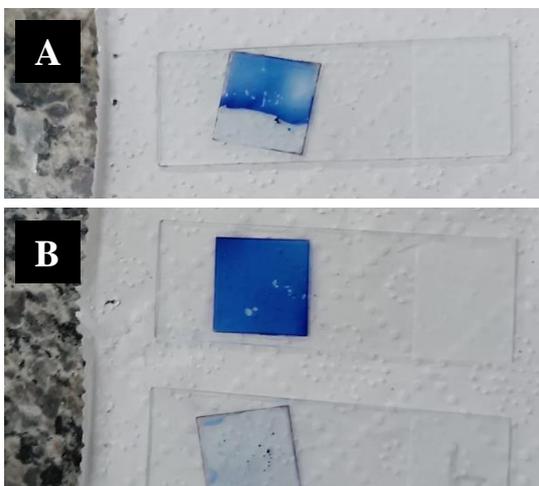
Figuras 10 – Fotografias da cenoura infectada artificialmente com os organismos desenvolvidos. A) Cenoura inteira com áreas demarcadas e os organismos desenvolvidos. B) Parte superior da cenoura demarcada e contaminada com os organismos desenvolvidos. C) Parte inferior da cenoura demarcada e contaminada com os organismos desenvolvidos.



Fonte: Elaborado pelos autores (2022).

Inicialmente esterilizou-se a alça de platina em álcool e em fogo (lâmparina), pingou-se corante azul de etileno na lâmina, inseriu-se a alça de platina no local infectado artificialmente da cenoura e depositou-se na lâmina, cobriu-se com a lamínula e visualizou-se no microscópio (Figuras 11 a e b).

Figuras 11 – Fotografia de lâminas preparadas para a microscopia óptica. A) Lâmina preparada para a microscopia óptica. B) Lâminas preparadas para a microscopia óptica

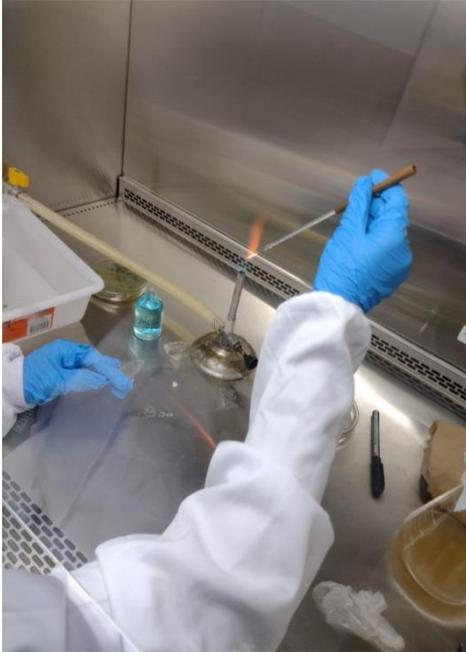


Fonte: Elaborado pelos autores (2022).

Por fim, para a realização da última etapa do Postulado de Koch chamada de reisolamento do patógeno, derreteu-se o meio de cultura no micro-ondas por 2 minutos, parando de 15 em 15 segundos, depois disso, na capela de fluxo laminar já esterilizada, verteu-se 2 placas de Petri também esterilizada e deixou-se esfriar por aproximadamente 30 minutos dentro da capela. Após isso, ainda na capela, inoculou-se a estrutura fúngica da cenoura no meio de cultura (dentro da placa de Petri), utilizando-se a alça de platina esterilizada em álcool e em fogo (Bico de Bunsen), introduziu-se no material contagioso e transferiu-se para a quatro pontos no meio de cultura, tapou-se a placa, flambou-se no bico de Bunsen, vedou-se com fita Parafilm, identificou-se e foi colocado para crescimento em BOD com fotoperíodo 12 horas e temperatura de 25° C, para o desenvolvimento pleno das estruturas fúngicas (Figura 12).

Figura 12 – Fotografia da prática de inoculação do organismo no meio de cultura puro, dentro

da Capela de Fluxo Laminar.

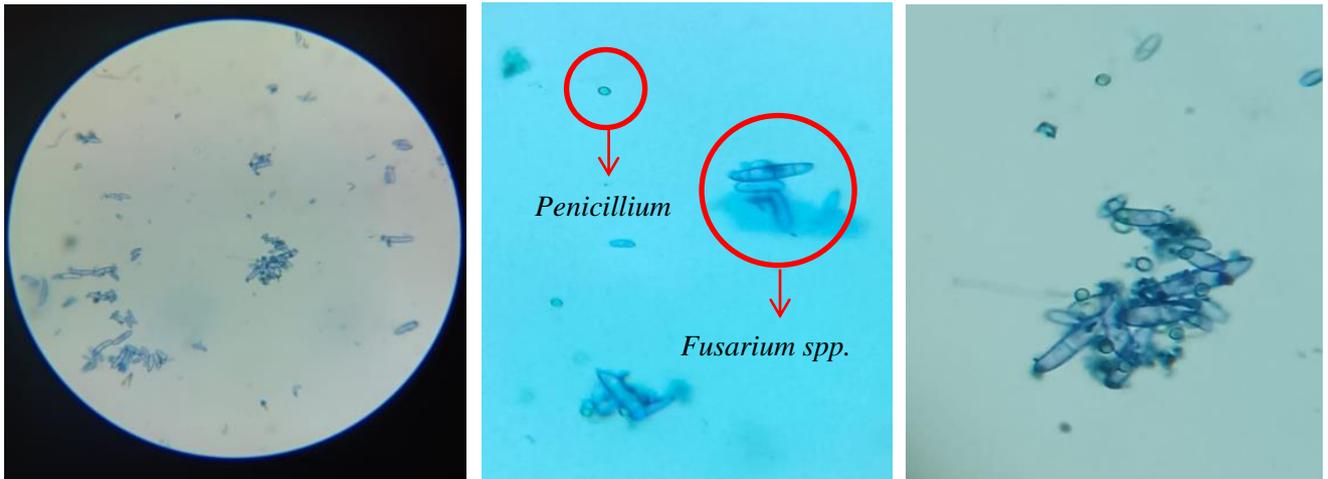


Fonte: Elaborado pelos autores (2022).

3 RESULTADOS, DESAFIOS E APRENDIZADO

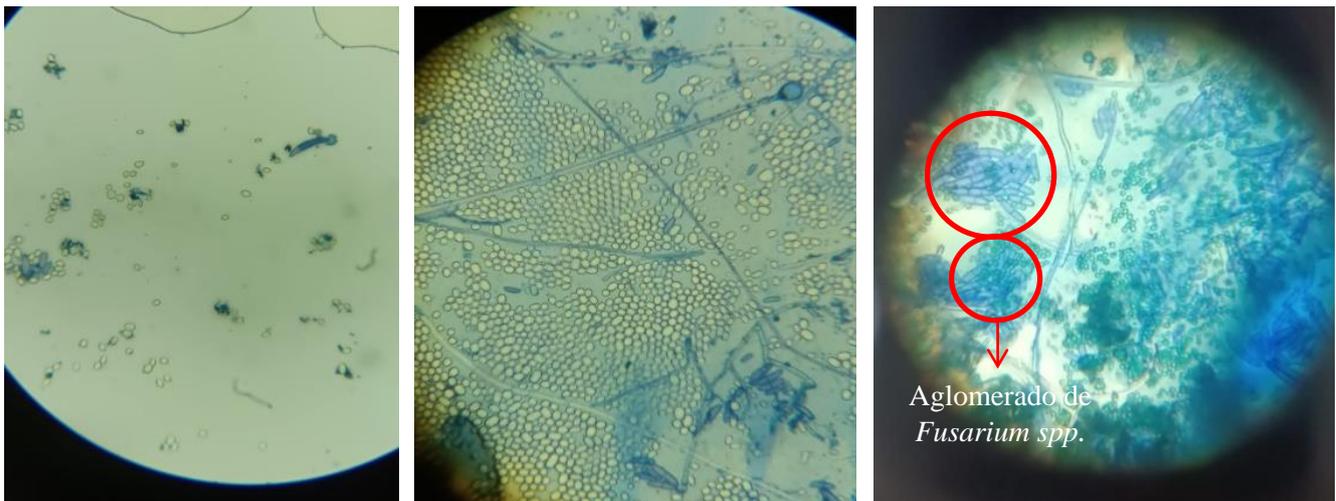
Encontrou-se mais de um organismo fúngico em uma mesma placa (Figuras 13), dentre eles, fungos do gênero *Fusarium spp.* e fungos do gênero *Penicillium spp.* (Figuras 14).

Figuras 13 – Fotografias de organismos desenvolvidos na placa de Petri. A) Organismos diferentes desenvolvidos na placa de Petri. B) Organismos diferentes desenvolvidos na placa de Petri, *Fusarium spp.* e *Penicillium spp.*. C) Organismos diferentes desenvolvidos na placa de Petri, *Fusarium spp.* e *Penicillium spp.*



Fonte: Elaborado pelos autores (2022).

Figuras 14 – Fotografias de organismos desenvolvidos no meio de cultura. A) Organismos diferentes desenvolvidos na placa de Petri. B) Organismos diferentes desenvolvidos na placa de Petri, *Penicillium spp.* em maior quantidade. C) Organismos diferentes desenvolvidos na placa de Petri, *Fusarium spp.* e *Penicillium spp.*



Fonte: Elaborado pelos autores (2022).

Para fins de identificação do *Fusarium spp.*, nas avaliações macroscópicas observou-se as peculiaridades da colônia, como sua coloração, já nas avaliações microscópicas por sua vez, foram analisadas a morfologia dos microconídios, macroconídio, fiálides e clamidósporos.

Os organismos encontrados foram *Penicillium spp.* e *Fusarium oxysporum*, as hipóteses levantadas para esse incidente são: 1. Contaminação do meio de cultura quando inoculado com o patógeno, devido á alguma falha de vedação na placa de Petri ou má esterilização, visto que muitos outros meios de culturas de outros alunos foram identificados com *Penicillium*

spp. e 2. Contaminação devido a má esterilização da alça de platina, visto que outros alunos também estavam realizando o trabalho na mesma bancada e, por vezes, partilhando a alça de platina.

A doença identificada na cenoura foi a Podridão basal ou Podridão do *Fusarium*, causada pelo agente *Fusarium oxysporum*, que causa amarelecimento progressivo das folhas, no sentido das inferiores para as superiores e infecta uma grande variedade de hospedeiros (AGROLINK, 2022).

Com relação aos desafios enfrentados, na prática do dia 25 de Maio, não preparou-se lâminas do material contaminado para observar os organismos no microscópio antes de iniciar o postulado, isso dificultou a purificação e seleção de apenas um organismo fúngico para prosseguir com o postulado.

De acordo com o postulado de Koch, quando se desenvolve organismos distintos no mesmo meio de cultura, deve-se purificar o meio, a fim de selecionar apenas um organismo específico e replicá-lo em um novo meio de cultura, para seu desenvolvimento ser único (REVISTA BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS, 2019).

A suspensão preparada para a inoculação no material sadio deve ser coada com gases para que seja realizada uma contagem de esporos, utilizando um hemacitômetro, para garantir que a quantidade de esporos (em n° de esporos/ ml) será suficiente para contaminar um material sadio (CAROLLO e FILHO, 2016).

Entretanto, na prática do dia 8 de Junho, não foi realizada nenhuma destas etapas acima dispostas.

A microscopia óptica consiste na etapa final de identificação de microrganismos (CAROLLO e FILHO, 2016) e é utilizado dentro do Protocolo de Koch para comparação das características entre o organismo desenvolvido no material doente (do início do postulado) e o organismo desenvolvido no material infectado de forma artificial, observando se as características continuam as mesmas. Contudo, neste trabalho essa etapa não foi realizada para a finalização do Postulado.

Para a finalização completa do postulado de Koch faltou a realização e visualização das lâminas a partir do isolamento feito em meio BDA da cenoura infectada no laboratório. Contudo podemos comprovar que eram os mesmo do material inicialmente doente pela realização de lâminas a partir das estruturas/sinais do patógeno crescido sobre a cenoura infectada artificialmente.

Este trabalho de prática somou no aprendizado do grupo de alunos por proporcionar a

oportunidade de juntar a teoria com a prática, o que contribuiu para a melhor compreensão de todo o processo por trás de algumas práticas fitopatológicas realizadas por profissionais nos laboratórios que visam detectar doenças em plantas e que tanto importam para os estudos de agronomia e biologia.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Federal de Mato Grosso do Sul, Campus Naviraí, bem como da professora que leciona a disciplina de Fitopatologia Aplicada e demais servidores técnicos e docentes que nos auxiliaram para a realização do trabalho.

REFERÊNCIAS

- AGRO LINK. **Podridão basal (*Fusarium oxysporum*)**. c2022. Disponível em: <https://www.agrolink.com.br/problemas/podridao-basal_1949.html>. Acesso em: 24 jun. 2022.
- APARECIDO, C.C.; ROSA, E.C. **Avaliação Morfológica e Molecular para Identificação de *Fusarium sp.***. Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal - CPDSV. v81, p.1-7. São Paulo, 2019. Disponível em: <http://www.biologico.agricultura.sp.gov.br/uploads/docs/bio/V81_1/ca944888-18a7-44ba-895f-d72f37b59535.pdf>. Acesso em: 24 jun. 2022.
- CAROLLO, Eliane Mazzoni; FILHO, Hermes Peixoto Santos. **Manual Básico de Técnicas Fitopatológicas Laboratório de Fitopatologia Embrapa Mandioca e Fruticultura**. Embrapa. Brasília – DF, 2016. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/148757/1/Cartilha-ManualFito-215-14-Hermes.pdf>>. Acesso em: 24 jun. 2022.
- CHAVES, Alessandra Leal da Silva. Análise microbiológica de isolados de *Fusarium spp.* obtidos em um hospital de oncologia do Rio de Janeiro, Brasil. 2015. 88 f. Dissertação (Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) - **Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas**, Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/25117>>. Acesso em: 23 jun. 2022.
- FUENTES CASTILLO, C. Los postulados de Koch: revisión histórica y perspectiva actual. **Revista Complutense de Ciencias Veterinarias**, v. 1, n. 2, p. 262–266, 2007.
- LOPES, C. A; REIS, A. Doenças da Cenoura. **Embrapa**. ed. 1, Brasília – DF, 2016. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1050943/doencas-da-cenoura>>. Acesso em: 23 jun. 2022.
- NEUFELD, Paulo Murillo. Personagem da História da Saúde V: Robert Koch. **RBAC – Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 51, n. 1. p. 4-8, 2019. Disponível em: <<http://www.rbac.org.br/wp-content/uploads/2019/07/RBAC-vol-51-1-2019-Editorial.pdf>>.

Acesso em: 24 jun. 2022.

ESCANI, Juliana Cahales. **Avaliação da extração de DNA genômico de *Penicillium sp.* pela técnica de Salting Out modificada.** CONIC – SEMESP 14º Congresso Nacional de Iniciação Científica, v. 2, 2014. UNICID São Paulo, 2014. Disponível em:<
<https://www.conic-semesp.org.br/anais/files/2014/trabalho-1000017444.pdf>>. Acesso em: 23 jun. 2022.