

## Influência de diferentes temperaturas na eficácia de *Metarhizium anisopliae* sobre adultos de *Periplaneta americana*

LÁZARO GALLARRAGA<sup>1</sup>; JUCELIO PETER DUARTE<sup>2</sup>; MARCIAL CORRÊA CÂRCAMO<sup>3</sup>; EDUARDO BERNARDI<sup>4</sup>; PAULO BRETANHA RIBEIRO<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas, IB, Ciências Biológicas – lazarogallarraga@hotmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas, IB, PPG em Entomologia – juceliod@hotmail.com

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas, IB, PPG em Parasitologia – marcial.carcamo@gmail.com

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pelotas, IB – edubernardi@hotmail.com

<sup>5</sup> Universidade Federal de Pelotas, IB – bretanha@ufpel.edu.br

### 1. INTRODUÇÃO

Dentre as espécies de baratas, *Periplaneta americana* (Linnaeus, 1758) (Blattaria Blattidae) é a mais encontrada em ambientes modificados pelo homem (PAI; CHEN; PENG, 2004; PRADO et al., 2006). Este inseto possui alternância de habitat, durante o dia repousam em ambientes escuros, úmidos e quentes, como tubulações de esgoto, fossas sépticas e latrinas, à noite (em busca de alimentos) invadem habitações, como armazéns, restaurantes, cozinhas e hospitais (VIANNA, 1999). A principal importância dessa espécie para a saúde pública está no fato desta poder atuar como vetor mecânico de diversos patógenos do homem e de animais domésticos.

No Brasil o controle de insetos é geralmente realizado com o uso de agentes químicos, porém o uso de inseticidas de amplo espectro causa forte impacto ao meio ambiente, colocando em risco outras espécies de animais, incluindo os seres humanos (NUNES; TAJARA, 1998). Segundo PARRA et al. (2002) estes agentes podem trazer problemas como a contaminação do solo, da água, impacto sobre populações de inimigos naturais do inseto alvo, predadores, parasitoides e patógenos, além da pressão de seleção exercida pelo uso intensivo de agentes químicos, forçando o aparecimento de resistência na população do inseto em estatus de praga. Uma alternativa pode ser o uso de micopesticidas para o controle biológico das baratas, o que parece promissor já que o habitat destes insetos apresenta alta umidade, fator muito importante para a germinação e desenvolvimento de fungos entomopatogênicos (DAOUST; ROBERTS, 1983). *M. anisopliae* é um fungo filamentosamente distribuído mundialmente, capaz de infectar mais de 50 famílias de insetos e ácaros, como também é adaptado para o crescimento em raízes de plantas (ST. LEGER, 2008). Esse fungo já foi descrito infectando adultos e ninfas de *P. americana* a temperatura de 25°C (HUBNER-CAMPOS et al., 2013). No entanto, o impacto dos fungos sobre os hospedeiros pode variar em função da temperatura a que é exposto (MICHALAKI et al., 2006; GARRIDO-JURADO, 2011). Esta pesquisa foi realizada para avaliar a influência da temperatura na eficácia de *M. anisopliae* (CG34) sobre adultos de *P. americana*.

### 2. METODOLOGIA

A criação de *P. americana* foi realizada conforme VIANNA et al. (1999), diferindo apenas na dieta de ninfas e adultos, que foi substituída por farinha de carne e açúcar, na proporção de 1:1.

O isolado fúngico de *M. anisopliae* (CG34) foi repicado em tubos de ensaio contendo meio de cultivo batata-dextrose-agar (BDA), em seguida, incubados em estufa a 25° C com fotofase de 12h. Após a esporulação das culturas, foram realizadas suspensões de ambos os fungos utilizando água destilada estéril

adicionada de espalhante adesivo (Tween 80) na proporção de 0,01%. A estimativa das concentrações utilizadas nos bioensaios foi realizada com câmara de Neubauer.

A influência da temperatura na virulência de *M. anisopliae* sobre adultos de *P. americana* foi avaliada a partir de cinco temperaturas, 15, 20, 25, 30 e 35°C. Em cada temperatura foram utilizados 15 casais de *P. americana*, com no máximo 15 dias após a emergência, divididos em três réplicas de cinco casais cada.

Cada espécime foi colocado em um tubo contendo 1ml de suspensão fúngica na concentração de  $2 \times 10^7$  conídeos/ml, sendo agitado moderadamente por cinco segundos, logo após foram deixados por 10 minutos em frascos contendo papel filtro para retirar o excedente de suspensão. Os indivíduos foram colocados em caixas teladas de 30x30x30cm, de forma a compor as réplicas. Para cada temperatura foi montado um grupo controle, neste os indivíduos foram manipulados da mesma forma dos tratamentos, porém foram mergulhados em água destilada estéril contendo apenas Tween 80 (0,01%), sem a presença de conídeos. Durante todo o período de experimentação os indivíduos foram alimentados da mesma forma que a colônia de manutenção, com água e dieta disponíveis por todo o tempo. As réplicas foram colocadas em BOD com uma das temperaturas supracitadas, umidade relativa de  $70 \pm 10\%$  e fotofase de 12h.

A mortalidade foi monitorada diariamente, durante 15 dias, e os adultos mortos transferidos para uma câmara úmida (25°C, UR  $70 \pm 10\%$  e fotofase de 12h). O desenvolvimento de fungos nos cadáveres foi avaliado com estereomicroscópio por até 15 dias após a morte do indivíduo.

As mortalidades foram analisadas por análise de variância (ANOVA), e a diferença entre as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p=0,05$ ). Para realização da ANOVA as porcentagens foram transformadas em arco seno %. O tempo letal médio (TL50) foram calculadas pela análise de probit. Todas as análises foram feitas no programa estatístico SPSS 11.0 for Windows (SPSS, 2002).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A temperatura influenciou significativamente na mortalidade dos adultos de *P. americana* causada por *M. anisopliae* ( $F= 307.22$ ;  $DF= 5$ ;  $p<0,001$ ). A cepa de *M. anisopliae* testada causou mortalidade nas temperaturas 20°C, 25°C e 30°C (Tab. 1). Todos os indivíduos mortos durante o período de experimentação apresentaram crescimento fúngico em no máximo 15 dias.

O tempo de sobrevivência dos adultos de *P. americana* infectados por *M. anisopliae* ( $\chi^2= 19,43$ ;  $DF= 2$ ;  $p< 0.001$ ) foi influenciado significativamente pelas temperaturas a que os insetos infectados foram expostos. Adultos de *P. americana* infectados com *M. anisopliae* tem um menor tempo de sobrevivência em 20°C e 25°C, e maior quando expostos a 30°C (Tab. 1).

As temperaturas influenciaram a mortalidade acumulada de adultos de *P. americana* bem como a velocidade que essa mortalidade ocorre quando causada *M. anisopliae* (CG 34). Esses resultados já eram esperados, pois alguns autores ressaltam a importância da temperatura no uso de fungos entomopatogênicos (BORISADE; MAGANA, 2014), no entanto é importante testar as diferentes cepas fúngicas, pois o impacto sobre o inseto que se deseja controlar pode estar relacionadas com a origem do isolado, do clima e região, como mostrado por Imoulan et al. (2011).

Tabela 1 Mortalidade acumulada em 15 dias (Média  $\pm$  DP) e tempo letal médio (50%) (IC 95%) para adultos de *Periplaneta americana* tratados com *Metarhizium anisopliae* (CG34) expostos a diferentes temperaturas

Temperaturas	Mortalidade (mean $\pm$ SE)	Lethal time			
		N	Slope	LT <sub>50</sub>	$\chi^2$
20°C	100 A	30	0,18 $\pm$ 0,05	4,0 (3,8-4,2) a	148,55
25°C	100 A	30	0,18 $\pm$ 0,06	3,7 (3,5-4,0) a	151,22
30°C	53,33 $\pm$ 15,25 B	30	0,07 $\pm$ 0,01	6,5 (6,3-6,6) b	33,05
15°C, 35°C e controles	0,0 C	*	*	*	*

Na mesma coluna, médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

Na mesma coluna, os valores seguidos por letras minúsculas iguais representam não diferem significativamente entre si quando avaliados por Log-rank test ( $p < 0,05$ ).

A cepa de *M. anisopliae* apresentou os melhores resultados nas temperaturas de 20°C e 25°C, estando de acordo com o descrito por DIMBI et al. (2004) e ZIMMERMANN (2007) que consideram as temperaturas entre 20°C e 25°C como ótimas para o crescimento desse fungo.

Segundo CHAGAS (2000), no Brasil (normalmente) a temperatura nos esgotos está acima da temperatura do ar, a exceção dos meses mais quentes do verão, sendo típica a faixa de 20 a 25°C. O esgoto é o principal habitat de *P. americana* nos ambientes urbanos, a semelhança entre a condição térmica desses ambientes e a maior eficácia do fungo testado aponta essa espécie fúngica como potencial agente para o controle biológico desse blatódeo em condições de campo.

#### 4. CONCLUSÕES

A temperatura influencia na eficácia de *M. anisopliae* sobre adultos de *P. americana*, causando mortalidade nas temperaturas entre 20°C e 30°C, porém sendo mais eficaz nas temperaturas de 20°C e 25°C.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BORISADE, O. A.; MAGANA, N. Growth and sporulation of entomopathogenic *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria farinosa* and *Isaria fumosorosea* strains in relation to water activity and temperature interactions. **Biocontrol Science and Technology**, v. 24, n. 9. 2014.

CHAGAS, W. F. **Estudo de patógenos e metais em lodo digerido bruto e higienizado para fins agrícolas, das estações de tratamento de esgotos da ilha do governador e da Penha no estado do Rio de Janeiro**. [Mestrado] Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública; 2000. 89 p.

DAOUST, R. A.; ROBERTS, D. W. Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia: Effect of temperature and relative humidity on conidial viability and virulence against mosquitoes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 41, n. 2, p. 143–150. 1983.

DIMBI, S.; MANIANIA, N. K.; LUX, S. A.; MUEKE, J. M. Effect of constant temperatures on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* to three species of African tephritid fruit flies. **Biological Control**. v.49, n. 1, p. 83-94. 2004.

GARRIDO-JURADO, I.; VALVERDE-GARCÍA, P.; QUESADA-MORAGA E. Use of a multiple logistic regression model to determine the effects of soil moisture and temperature on the virulence of entomopathogenic fungi against pre-imaginal Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. **Biological Control**, v. 59, n.3, p. 366–372. 2011.

HUBNER-CAMPOS, R. F.; LELES, R. N.; RODRIGUES, J.; LUZ, C. Efficacy of entomopathogenic hypocrealean fungi against *Periplaneta Americana*. **Parasitology International**. v.62, p. 517–521. 2013.

MICHALAKI, M. P.; ATHANASSIOUA, C. G.; KAVALLIERATOSB, N. G.; BATTAC, Y. A.; BALOTISD G. N. Effectiveness of *Metarhizium anisopliae* (Metschinkoff) Sorokin applied alone or in combination with diatomaceous earth against *Tribolium confusum* Du Val larvae: Influence of temperature, relative humidity and type of commodity. **Crop Protection**, v. 25, n. 5, p.418–425. 2006

NUNES, M. V.; TAJARA, E. H. Efeitos tardios dos praguicidas organoclorados no homem. **Revista de Saúde Pública**, v. 32, n. 4, p. 372-383, 1998.

PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORREA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Editora Manole. 2002. 609p.

PAI, H. H.; CHEN W. C.; PENG, C. F. Cockroaches as Potential Vectors of Nosocomial Infections. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.25, n.11, p. 979-984. 2004.

PRADO, M. A.; GIR, E.; PEREIRA, M. S.; REIS, C.; PIMENTA, F. C. Profile of antimicrobial resistance of bacteria isolated from cockroaches (*Periplaneta americana*) in a Brazilian health care institution. Brazilian Journal of Infectious protozoan parasites by insects. **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, n.1, p.128-132, 2006.

ST. LEGER, R.J. Studies on adaptations of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, p. 271-276, 2008.

VIANNA, E. E. S. Bionomia de *Periplaneta Americana* Linnaeus, 1758 (Blattodea: Blattidae). Porto Alegre, 1999. 194p. Tese (Doutorado em Zoologia) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto alegre.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**. v. 17, n. 9. 2007. 17:879–920.