**EVOLUÇÃO DE O₂, VIABILIDADE E VIRULÊNCIA DE *Metarhizium*
anisopliae (Metsch.) SOROKIN, DURANTE ARMAZENAMENTO**

RICARDO HENRI RODRIGUES DESTÉFANO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de concentração: Microbiologia Agrícola.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Agosto - 1993

EVOLUÇÃO DE O₂, VIABILIDADE E VIRULÊNCIA DE *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) SOROKIN, DURANTE ARMAZENAMENTO

RICARDO HENRI RODRIGUES DESTÉFANO

(Engenheiro Agrônomo)

Orientador: Prof.Dr. CLAUDIO LUIZ MESSIAS

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de concentração: Microbiologia Agrícola.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Agosto - 1993

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCLQ/USP

D476e Destéfano, Ricardo Henri Rodrigues
Evolução de O2, viabilidade e virulência de
Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorokin, durante
armazenamento. Piracicaba, 1993.

P.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Fungo entomopatogênico - Armazenamento 2. Fungo
entomopatogênico - Comportamento - Efeito da tempera
tura 3. Fungo para controle biológico I. Escola Supe
rior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 589.2

EVOLUÇÃO DE O₂, VIABILIDADE E VIRULÊNCIA DE *Metarhizium anisopliae* (Metsch)
SOROKIN, DURANTE ARMAZENAMENTO

Ricardo Henri Rodrigues Destéfano

Aprovado em: 09.12.93

Comissão Julgadora:

. Prof.Dr. Cláudio Luiz Messias

ESALQ/USP

. Prof.Dr. Aquiles Eugênio Piedrabuena

UNICAMP

. Profa.Dra. Aline A. Pizzirani-Kleiner

ESALQ/USP

Prof.Dr. Cláudio Luiz Messias

Orientador

Aos meus pais,

PEDRO

e

JACIRA (in memoriam)

À minha querida esposa **SUSI** e ao meu

filho **RICARDO HENRI** e...

OFEREÇO E DEDICO ESTE TRABALHO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização do presente trabalho e, em especial, às seguintes pessoas e instituições:

- Ao Prof.Dr. Cláudio Luiz Messias, pela orientação, pela oportunidade oferecida, pelas discussões construtivas e pelo empenho em propiciar condições para a realização deste trabalho;

- Ao Prof.Dr. Aquiles Eugênio Piedrabuena, pela paciência, prontidão, sugestões valiosas e pelos cálculos e análises estatísticas;

- Aos pesquisadores Antenor Nascimento Ferraz e Vera Rodrigues da SUCEN - Mogi-Guaçu, pela cessão dos insetos utilizados neste trabalho, e pelo acesso deste Órgão de Saúde Pública.

- A Profa.Dra. Aline A. Pizzirani-Kleiner, pelas sugestões e pela sempre constante atenção dispensada;

- Ao Prof.Dr. Luiz Gonzaga do Prado pelas críticas e colaboração prestada;

- Ao Biólogo Dráuzio Eduardo Naretto Rangel, da INBIOTER-Itatiba, pelo apoio estatístico e pela atenção amigável e sincera dispensada;

- A Profa.Dra. Yoko Bomura Rosato pelas sugestões;

- Ao Biólogo Juvierlandi Lugli, amigo e companheiro profissional, pelo incentivo, pela colaboração irrestrita em todos os sentidos para a realização deste trabalho;

- Ao Engenheiro Agrônomo Gilberto Ubida Leite Braga, a amizade, companheirismo, discussões e sugestões levantadas e colaboração;

- A Profa.Dra. Neiva Tinti Oliveira, pela amizade, incentivo e ajuda na revisão bibliográfica;

- Ao Prof. Marcos Carvalho, pelo coleguismo e ajuda nos cálculos estatísticos;
- À Célia, Ana Rita, Sílvia e Tereza, secretárias do Departamento de Genética e Evolução - UNICAMP, pelos serviços e camaradagens prestados;
- Aos colegas Regina Calil, Márcia Masiero, Cristina Mendes Costa, Alexandre Tortorelli, Cristina Oishi, Ephraim Medeiros, Welson de Paula Filho, pela colaboração;
- À Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello", pelo acesso ao seu acervo bibliográfico.
- CNPq - Processo nº 501488/91-O
- FINEP/PADCT - Processo: 42860448.00
- SUCEN - Superintendência de Controle de Endemias do Estado de São Paulo
- Convênio Cooperação SUCEN/UNICAMP.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	vi
SUMMARY	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 O fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> (METSCH.) SOROKIN	3
2.2. Característica de cultivo	4
2.3. Armazenamento	6
2.4. Respirometria	15
2.5. Patogenicidade e virulência	23
2.6. Patogenicidade ao <i>Panstrongylus megistus</i>	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1. Materiais	28
3.1.1. Linhagem de <i>Metarhizium anisopliae</i>	28
3.1.2. Meios de cultura e soluções	28
3.1.2.1. Meio de arroz	28
3.1.2.2. Meio completo	29
3.1.2.3. Solução de vitaminas	29
3.1.2.4. Meio de cultura basal	30
3.1.2.5. Meio de cultura basal enriquecido com uma fonte de Carbono.....	30
3.1.2.6. Soluções	30
3.1.2.7. Solução salina	30
3.1.2.8. Solução de Hipoclorito de Sódio	30
3.1.2.9. Solução saturada de Sulfato de Potássio	31
3.1.2.10. Solução padrão de glicose	31
3.1.3. Reagentes utilizados para dosagem de glicose	31
3.1.3.1. Reagente de Cobre A	31
3.1.3.2. Reagente de Cobre B	31
3.1.3.3. Reagente de Arsenomolibdato	31
3.2. Metodologia	32
3.2.1. Revigoração do patógeno	32
3.2.2. Obtenção de conídios para armazenamento, avaliação da evolução de O ₂ e bioensaios	32
3.2.3. Formulação do inóculo para armazenamento	33
3.3. Respirometria	34
3.3.1. Preparação do respirômetro.....	34
3.3.2. Determinação manométricas	35
3.3.1. Preparação da suspensão de conídios	35
3.3.4. Preparação das amostras dos diferentes tratamentos	35
3.3.5. Avaliação da evolução de O ₂	36
3.3.6. Consumo de glicose	37
3.3.6.1. Reta padrão de glicose	37
3.3.6.2. Dosagem da concentração da glicose nas amostras	37
3.4. Bioensaios	38
3.4.1. Reisolamento do fungo em insetos mortos nos bioensaios	39
4. RESULTADOS	40

4.1. Bioensaios	40
Tabela I - Valores obtidos para viabilidade e LT50 nas diferentes doses para conídios da Linhagem E9 de <i>M. anisopliae</i> , armazenados à -20°C com e sem glicerol.....	41
Tabela II - Valores mensais de viabilidade, consumo de O ₂ , LT50 e LD50, para diferentes dos conídios da linhagem E9 de <i>M. anisopliae</i> , durante o armazenamento à -20°C com e sem glicerol.....	43
Tabela III - Valores de potência relativa entre o LT50 dos conídios armazenados com glicerol e o LT50 dos conídios armazenados sem glicerol.....	44
4.2. Respirimetria	45
4.2.1. Cálculo do consumo de O ₂	45
4.2.2. Valores de QO ₂	45
4.2.3. Glicose residual	45
4.2.4. Consumo de glicose	46
4.2.5. Assimilação oxidativa	46
4.2.6. Avaliação do consumo de O ₂ para conídios vivos e conídios mortos	47
Tabela IV - Valores mensais de consumo de glicose, consumo de O ₂ , quociente de O ₂ e assimilação oxidativa obtidos à partir dos resultados obtidos nos testes de respirometria, para conídios da linhagem E9 de <i>M. anisopliae</i> , armazenados com e sem glicerol, em meio basal adicionado de glicose.....	48
Tabela V - Experimentos de respirometria para conídios mortos e vivos da linhagem E9 de <i>M. anisopliae</i> , as diferenças no consumo de O ₂ , variando-se a proporção entre estes.....	49
5. DISCUSSÃO	63
5.1. Armazenamento	63
5.2. Viabilidade e Tempo Leta 50	65
6. CONCLUSÃO	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
APÊNDICE	79

EVOLUÇÃO DE O_2 , VIABILIDADE E VIRULÊNCIA DE *Metarhizium anisopliae* (METSCH.)
SOROKIN, DURANTE ARMAZENAMENTO

Autor: Ricardo Henri Rodrigues Destéfano

Orientador: Prof.Dr. Cláudio Luiz Messias

RESUMO

No presente trabalho estudou-se a performance da linhagem E9 durante um processo de armazenamento, no qual conídios foram mantidos à $-20^{\circ}C$ com glicerol e sem glicerol. Esta linhagem foi alvo desse estudo por ser amplamente utilizada em nosso laboratório e por diversos laboratórios brasileiros, servindo como referência em estudos sobre entomopatógenos. Nestas condições os objetivos foram estimar as características do fungo quanto à evolução de O_2 , a variação na viabilidade determinada pela capacidade germinativa dos conídios, e a expressão de virulência, durante o processo.

Na avaliação da evolução de O_2 , testes de respirometria foram realizados, utilizando-se a glicose como única fonte de carbono em um meio de cultivo simplificado. A virulência foi testada em bioensaios realizados com ninfas de 3^o e 4^o estágios do vetor da doença de Chagas *Panstrongylus megistus*; e a viabilidade foi obtida comparando-se conídios germinados e não germinados.

Os resultados obtidos mostraram a necessidade de uma melhor compreensão, para que estes testes realizados se interajam mais efetivamente, pois foi observado que os dados relativos a viabilidade e o quociente de oxigênio (QO_2) do fungo isoladamente, não fornecem subsídios suficientes para se avaliar a capacidade entomopatogênica de uma dada linhagem.

A ação do glicerol como crioprotetor, não foi eficiente no sentido de se representar diferenças significativas com relação à performance do entomopatógeno, uma vez que os valores de LT_{50} não foram muito divergentes.

O₂ UPTAKE, VIABILITY AND VIRULENCE OF *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROKIN,
UNDER STORAGE

Author: Ricardo Henri Rodrigues Destéfano

Adviser: Prof.Dr. Cláudio Luiz Messias

SUMMARY

Measurements of the performance of E₉ strain under freeze conditions at -20°C during 180 days long, being conidia with glycerol as cryoprotectant and conidia without glycerol. This strain has been investigated for many researchers. The aims were to estimate the fungus behavior about O₂ uptake, viability and virulence expression, during storage.

Respirometry assays has been done to do uptake O₂ measurements with glucose as the only carbon source in a simplified culture medium; bioassays with nymphs of *Panstrongylus megistus* were realized to take the virulence, and the viability obtained between germinating and no germinating conidia.

Results showing the difficult interation between the tests carried out, mainly about the understanding on viability and O₂ quocient separately, are not sufficients to explain the entomopathogenic efficiency of the strain.

In this case, glycerol as cryoprotectant was not efficient to maintenance the virulence under these conditions, once the LT₅₀ obtained are not very divergents.

1. INTRODUÇÃO

Os fungos entomopatogênicos, dentre outros microrganismos, constituem um importante grupo de agentes que vem sendo estudados por diversos pesquisadores em todo o mundo, para serem utilizados como inseticidas microbianos; e dentre estes o deuteromiceto *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) SOROKIN se apresenta como potente controlador de insetos praga de importância agrícola e médica.

VEEN (1968) e FARGUES et al. (1975), observaram o poder entomopatogênico deste fungo para mais de 200 espécies de insetos. Sua atuação e modo de ação sobre diferentes insetos já está e foi amplamente estudada e descrita por diversos autores.

No Brasil diversos trabalhos com *M. anisopliae* foram realizados e a sua aplicação é uma realidade em culturas como a cana-de-açúcar no nordeste do país, e pastagens no Estado de Goiás.

No atual estágio de desenvolvimento do controle microbiano, em particular para o *Metarhizium anisopliae*, cada vez mais se faz necessário a realização de trabalhos buscando avaliar de forma específica o comportamento do fungo não só quanto à sua performance diretamente como entomopatógeno, mas avaliando-se a viabilidade e virulência das unidades infectivas, os conídios.

O fungo, durante sua utilização como um inseticida biológico, está sujeito à ação de diferentes fatores bióticos e abióticos em dinâmica interação, sendo que estes são em grande parte determinantes para a expressão do entomopatógeno perante o hospedeiro.

Desta forma, a medição do quociente respiratório em diferentes tempos e condições de armazenamento realizada neste trabalho visa colaborar, numa melhor compreensão do comportamento do fungo quando mantido em condições adversas, como em processo de armazenamento à baixa temperatura e sua posterior performance como entomopatógeno, avaliando-se quantitativamente e qualitativamente em bioensaios com insetos hospedeiros.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O Fungo *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROKIN.

O deuteromiceto *Metarhizium anisopliae* pertence à ordem *Moniliales*, família *Moniliaceae* e foi descrito por Metschnikoff em 1879 pela primeira vez como *Entomophthora anisopliae*. O primeiro trabalho de controle microbiano realizado por este pesquisador, foi para o controle de larvas de *Anisopliae austriaca*, sendo finalmente classificado por SOROKIN em 1883 como *Metarhizium anisopliae*. Desde então, a utilização e ação deste patógeno vem sendo estudada sobre muitas espécies de insetos.

VEEN (1968) já apontara este fungo como um agente de controle biológico com grandes potencialidades, tendo como hospedeiros mais de 200 espécies de insetos.

A espécie *M. anisopliae* apresenta duas variedades: a variedade *anisopliae* (minor) e a variedade *majus*, distintos quanto ao tamanho dos conídios. A variedade *anisopliae* apresenta-se com conídios de 3,5 a 9,0µm de comprimento e a var. *majus* com conídios de 9,0 a 18,0µm de comprimento (TULLOCH, 1976; MESSIAS & AZEVEDO, 1980).

Segundo TINLINE & NOVIELLO (1971), é possível que a variedade *majus* seja diplóide natural, sendo tais observações apoiadas por SAMUELS et al. (1989) e St. LEGER et al. (1993).

Este fungo apresenta geralmente conídios uninucleados TINLINE & NOVIELLO (1971), com pequena proporção de binucleados (LUNA, 1985; BAGALHI, 1987). Tendo LUNA & AZEVEDO, 1985 estudado várias linhagens de *M. anisopliae* obtiveram indicações de que a grande variação na

forma e tamanho de conídios parece ser característica do gênero, não se relacionando tão estritamente à condições de cultura.

Este fungo apresenta processo de heterocariose, o qual foi descrito por TINLINE & NOVIELLO, (1971). Sendo que o processo parassexual completo com obtenção de diplóides e segregantes foi descrito por MESSIAS (1979); MESSIAS & AZEVEDO (1980) E AL-AIDROOS (1980). SILVEIRA (1983), obteve protoplastos de *M. anisopliae* e a fusão entre protoplastos de mutantes morfológicos e auxotróficos.

2.2. CARACTERÍSTICA DE CULTIVO

A temperatura ótima para o desenvolvimento e esporulação de *M. anisopliae* está entre 25 e 30°C (LATCH, 1965; VILLACORTA, 1978), sendo que, à temperaturas inferiores ocorre um retardamento no desenvolvimento, aumento na formação de micélio e redução na formação de conídios (FERRON, 1978). Em temperaturas superiores à 32°C ocorre uma rápida redução na germinação e no desenvolvimento, a qual não se recupera após exposição à 37°C por 96 horas (SANTOS, 1978). A faixa de pH tolerável, vai de 2,0 a 8,5 sendo 6,9 o melhor ponto de pH para o seu desenvolvimento e esporulação (VEEN, 1968).

Quanto à nutrição este microrganismo é pouco exigente, crescendo bem em diferentes meios de cultivo, é evidente que alterações nas formulações deste meio podem resultar em maior ou menor esporulação, importante para a produção em grande escala (industrial), (SANTOS, 1978; DAOUST et al., 1982, 1983 a,b).

Meios minerais básicos como o meio de Czapeck (LATCH, 1965; VEEN, 1968; AL-AIDROOS & ROBERTS, 1978; MESSIAS & AZEVEDO, 1980); meio mínimo (PONTECORVO et al., 1953) ou em meios complexos como BDA (LATCH, 1965; SANTOS, 1978), meio completo (PONTECORVO et al., 1953), meio de Emerson Y_pS_s (AL-AIDROOS & ROBERTS, 1978) e uma série de outros meios sintéticos (CLERCK & MADELIN, 1965; CAMPBELL et al., 1978; DAOUST &

ROBERTS, 1983 a.), oferecem condições satisfatórias o desenvolvimento do fungo dada a sua baixa exigência nutricional.

SANTOS (1978) manteve a cultura de *M. anisopliae* em condições de escuro total e luz alternada, notando que as culturas submetidas às condições de ausência total de luz apresentavam grande dificuldade na produção de esporos, estimulando o crescimento micelial.

Desde que tornou-se necessário produzi-lo em grande escala, vários autores têm-se dedicado a estabelecer um meio de cultivo econômico, de fácil elaboração e que propicie um bom crescimento e esporulação do fungo. O meio que melhor tem atendido estes requisitos é o meio de arroz cozido, bastante utilizado para a produção em massa do fungo com muitas vantagens, tais como, boa produção de esporos, baixo custo e fácil manuseio (AQUINO et al., 1975, 1977; MARQUES et al., 1981; DAOUST & ROBERTS, 1983b).

LI & HOLDON (1990), trabalharam com dois isolados de *M. anisopliae* e testaram o efeito de 8 carboidratos, 6 ácidos orgânicos, 17 fontes de nitrogênio e 6 vitaminas sobre a germinação de conídios, crescimento micelial e esporulação em meio de ágar. Os carboidratos foram testados sempre com peptona ou com nitrato de potássio como fonte de nitrogênio. Todos os carboidratos aumentaram a esporulação. A sorbose inibiu o crescimento com ambas as fontes de nitrogênio e inibiu a germinação dos conídios no meio onde a fonte de nitrogênio era o nitrato de potássio. O amido produziu grande esporulação em meio onde a fonte de nitrogênio era peptona mas, a glicose, maltose e manose produziram maior esporulação em meio onde a fonte de nitrogênio era nitrato de potássio. Os ácidos orgânicos, oxálico, sórbico e tartárico, inibiram completamente a germinação dos conídios enquanto que os ácidos acético, cítrico e málico, reduziram o crescimento e a esporulação mas não inibiram a germinação. O *M. anisopliae* foi capaz de utilizar o nitrato de sódio e de amônia como fonte de nitrogênio. Apenas a cisteína inibiu o crescimento e a esporulação. A treonina, lisina e sulfato de amônia produziram os melhores níveis de esporulação. Nenhuma vitamina aumentou o crescimento ou a esporulação dos isolados. A piridoxina inibiu a germinação de ambos os isolados e a biotina e riboflavina de apenas um deles.

BARNES et al. (1975) analisaram o efeito de substratos orgânicos sobre o crescimento e esporulação de *M. anisopliae* e *B. bassiana* e verificaram que triptona, casitona e o extrato de levedura foram eficientes para o crescimento de *M. anisopliae*, enquanto soytone, casitona, neopeptona e caseína hidrolizada foram mais efetivas para *B. bassiana*; extrato de levedura foi eficiente para a esporulação de ambos os fungos. ROBERTS (1966a) investigando o efeito de várias fontes orgânicas e inorgânicas sobre o crescimento e produção de toxinas por *M. anisopliae* encontrou que a neopeptona produz maior rendimento micelial que nitrato de sódio.-

2.3. ARMAZENAMENTO

Tentativas de conservação de fungos, sem perda da viabilidade e patogenicidade, têm sido realizadas por diversos autores. BASTOS & MATTA (1976) verificaram após a aplicação do método de CASTELLANI - "conservação de fungo em água destilada" - que a preservação do *M. anisopliae* através deste método, mantém sua viabilidade por 26 meses e através da realização de testes, salienta que os aspectos morfológicos e fisiológicos do fungo não apresentaram diferenças quando comparados com a cultura original sem sofrer qualquer armazenamento. Quanto à sua virulência, num período de 9 dias, registrou-se uma mortalidade de insetos de 75%, confirmando-se dessa forma a preservação do poder de virulência.

BELL & HAMALLE (1974) testaram várias espécies de fungos, entre elas, linhagens de *M. anisopliae*, as quais tinham sido estocadas por um longo período de tempo em sílica-gel à -20°C. Estas linhagens foram testadas contra insetos-praga, constatando-se que o fungo foi capaz de manter o seu alto grau de virulência e patogenicidade por 3 anos de estocagem, porém, somente uma das 3 linhagens testadas conseguiu o grau de potência desejável, as outras duas restantes morreram após 24 e 33 meses.

DAOUST & ROBERTS (1983b), investigando o efeito do substrato de crescimento sobre a sobrevivência e virulência de conídios de *M. anisopliae* contra mosquitos, concluíram que as condições de estocagem em que se obtiveram melhores resultados no sentido de manutenção da

viabilidade e virulência do fungo, situou-se nos parâmetros de 19°C à 97% de umidade relativa e 4°C à 0% de umidade relativa; concluindo-se também que as condições de armazenamento foram mais críticas para a sobrevivência e virulência de *M. anisopliae* do que o meio de cultivo utilizado na produção do fungo.

Um inseticida microbiano deve ser obtido (produzido), sofrer formulação e ser estabilizado de maneira que suas atribuições entomopatogênicas sejam estabelecidas e se mantenham preservadas quando em condições normais de armazenamento. Um inseticida microbiano racional deve ter preservada sua viabilidade, sob condição ambiente, em prateleiras para comercialização por, no mínimo, 18 meses, sendo assim economicamente viável. A não ser que o mesmo, seja contratado por produção estabelecida, com entrega e utilização programadas, devendo neste caso, as propriedades inseticidas serem mantidas por 3 a 6 meses, COUCH & IGNOFFO (1981).

O fungo *M. anisopliae* é facilmente produzido por diversos métodos e em diferentes substratos, mas são pouco estáveis quando armazenados sob condição ambiente. A estabilidade, entendida como viabilidade e virulência do patógeno, no armazenamento é afetada principalmente por fatores como a temperatura, umidade, concentração de CO₂, luminosidade e formulação. CLERCK & MADELIN (1965) estudaram a influência destes fatores, exceto formulação, na longevidade de conídios de *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces farinosus* e *M. anisopliae*. A longevidade dos conídios destes fungos foi reduzida pela exposição à luz e por aumento da temperatura de 8 até 25°C. Os conídios de *B. bassiana* e *P. farinosus* perderam a capacidade de germinação mais rapidamente nas umidades mais altas, enquanto que o *M. anisopliae* sobreviveu mais tempo nas umidades extremas. Na combinação escuro, 8°C e 0% de umidade relativa (UR) os conídios de *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *P. farinosus* apresentaram germinação de conídios próxima dos 90% após 635, 28 e 140 dias, respectivamente. O *M. anisopliae* apresentou 92% de conídios germinados após 252 dias de combinação escuro, 8°C e 75% UR. O aumento na concentração de CO₂ ou retirada de O₂ eliminou o efeito desfavorável de umidades relativas intermediárias, na longevidade dos conídios de *M. anisopliae*.

Trabalho realizado para estudar os efeitos de fatores ambientais sobre *B. bassiana* e *M. anisopliae* por WALSTAD et al. (1970), mostrou a influência do fator temperatura na longevidade de conídios. Após 12 meses à temperatura de 8°C os conídios dos dois fungos apresentaram germinação acima de 80%, sendo que a 21°C o tempo foi reduzido para 15 dias (*B.bassiana*) e 75 dias (*M. anisopliae*).

Os efeitos de diferentes combinações de temperatura e umidade relativa na viabilidade de conídios e sua virulência a insetos foram estudados por DAOUST & ROBERTS (1983 a) onde temperaturas de 4, 19, 26 e 37°C e umidades relativas (U.R.) de 0, 12, 33, 53, 75 e 98% e ainda a combinação 0% de U.R. e -20°C, foram testados quanto à viabilidade e virulência utilizando-se mosquitos como hospedeiros, 3 linhagens de *Metarhizium anisopliae* armazenados por um período de 24 meses. As temperaturas combinadas com alta U.R. (19 ou 26°C à 97% U.R.) e as temperaturas combinadas com baixa U.R. (4°C e 0% U.R.) permitiram um maior tempo de sobrevivência aos conídios, onde 80% desses conídios germinaram após 8 meses no mínimo. Dependendo da linhagem, as U.R. intermediárias entre 33 e 75%, foram menos favoráveis à manutenção da viabilidade dos conídios, principalmente à 19 a 26°C. Nestas faixas as linhagens perderam a viabilidade em menos de 30 dias. A longevidade dos conídios foi maior de uma maneira geral, quando a temperatura foi reduzida de 37 até 4°C. O fator virulência, determinante para controle microbiano, foi mantido em alto grau nas linhagens testadas, sendo elevado por 18 meses sobre *Culex pipiens pipiens* e por 12 meses sobre *Anopheles stephensi*, desde que os mesmos tenham sido armazenados nas condições mais favoráveis citadas anteriormente.

COUCH & IGNOFFO (1981) discutem os efeitos de diferentes formulações na sobrevivência das estruturas infectivas e na manutenção da virulência à insetos, de fungos entomopatogênicos como o *Metarhizium anisopliae* e a *Beauveria bassiana*, entre outros, citando que, tal estudo tem sido muito intensificado nos últimos anos, e mesmo assim, uma formulação que mantenha a viabilidade e virulência destes entomopatógenos em níveis satisfatórios, além da forma eficiente para aplicação em campo, ainda não haviam sido encontradas.

DAOUST et al. (1982) estudaram diferentes formulações de *M. anisopliae* em vários óleos, minerais e vegetais, veículos inertes aquosos ou não, pós e grânulos, na viabilidade de conídios armazenados em diferentes temperaturas durante 12 meses. Independente da temperatura, nas formulações oleosas e aquosas, os conídios sofreram redução na longevidade quando comparados com conídios não formulados. As formulações granuladas e pós-molháveis mantiveram altas as viabilidades dos conídios por um período de 12 meses a 4°C, sendo que a -20°C a germinação dos conídios foi em torno de 80% após 6 meses e inferior a 50% após 12 meses, mas de um modo geral não diferiam dos conídios não formulados (testemunha).

Ainda, DAOUST et al. (1982) verificaram os efeitos de diferentes formulações, pós e granulados na virulência de *M. anisopliae* à larvas de mosquitos, após um armazenamento de 8 a 12 meses à 4 e 20°C. Nas formulações granuladas houve menor porcentagem de mortalidade e maiores tempos letais em relação aos conídios não formulados, após 8 meses de armazenamento a 4°C. Houve a obtenção de tempos letais menores que o controle (conídios não formulados) em uma das formulações em pó, após um período de armazenamento de 10 meses à 4°C. Ficou concluído segundo o autor, a necessidade de se determinar a eficiência de uma formulação micoinseticida, através de bioensaios para se obter a virulência àquela praga alvo, antes da utilização e aplicação do produto no campo.

Outro estudo sobre a influência de várias formulações de *M. anisopliae* em diferentes condições de armazenamento, sobre a longevidade de seus conídios foi realizado por ALVES et al. (1987). Os conídios foram armazenados em geladeira, freezer e a temperatura ambiente, onde 64 formulações foram preparadas pela adição dos inertes: talco, sílica-gel, caulin, bentonita, farinha de arroz, ácido básico, pirofilita OB-MBY, filito OB-YB, LE-36SMO. O fungo não formulado (controle), perdeu totalmente a viabilidade antes dos 220 dias enquanto as formulações 14 (50% fungo e 50% de filito OB-YB), 18 (50% fungo e 50% farinha de arroz) e 27 (formulação 18 + 0,10g de ácido básico) apresentaram viabilidade dos conídios próxima a 80% após 270 dias no ambiente. Armazenado em geladeiras (4 - 6°C) os conídios ficaram totalmente inviáveis aos 420 dias, enquanto algumas formulações mantiveram a viabilidade em torno de 70% até os 510 dias. No freezer os conídios puros

perderam a viabilidade aos 420 dias, obtendo-se até 70% de viabilidade em algumas formulações até 660 dias, concluindo-se dessa forma que independente do ambiente, a formulação pode aumentar significativamente a longevidade dos conídios de *M. anisopliae*.

FERNANDES (1991) utilizando diversos produtos inertes como talco, caulim, arroz, cartão de cupinzeiro em diferentes formulações e temperaturas, observou que apenas os inertes cartão e leucita contribuíram para manter alguma viabilidade de conídios de *Beauveria bassiana* aos 120 dias e de *Metarhizium anisopliae* aos 180 dias de armazenamento à temperatura ambiente. Os conídios de *M. anisopliae* não formulados tornaram-se inviáveis entre 90 e 120 dias à temperatura ambiente, já em condições de geladeira os conídios formulados ou não com os diferentes inertes apresentaram viabilidade acima de 92% após 180 dias de armazenamento.

Ao se discutir o comportamento microbiano frente aos fatores extrínsecos, particularmente a temperatura ambiental, evidenciou-se que muitos microrganismos são capazes de se desenvolver nas temperaturas de refrigeração, entre +2° e +7°C, por exemplo bactérias psicrófilas e psicrotróficas.

A maior ou menor conservação ou manutenção de baixos níveis metabólicos nos microrganismos sob refrigeração e congelamento é alcançada principalmente pela extensão do período de fase de ajuste ou "Lag Fase" e do tempo de geração dilatado, sendo o efeito letal de redução de temperatura praticamente desprezível (OLSON Jr. & NOTTINGHAM, 1980; NICKERSON & SINSKEY, 1972).

Modificações de natureza morfológica ou fisiológica nas células podem ocorrer quando há crescimento abaixo da temperatura ótima, entre outras, são mencionadas o aumento do tamanho celular em leveduras, formação de filamentos em *E. coli*, estímulo à produção de enzimas como lipases e proteinases, etc. (OLSON Jr. & NOTTINGHAM, 1980).

Em alimentos, por exemplo o congelamento exerce um efeito inibitório ou letal muito mais acentuado sobre a microbiota contaminante em relação à benéfica. Pesquisas têm evidenciado que, de modo geral, organismos eucarióticos, caso de protozoários, nematelmintos e platelmintos, são muito mais sensíveis ao congelamento do que as bactérias. É interessante observar que o efeito letal

do congelamento é muito mais pronunciado em temperaturas mais elevadas do que naquelas bastante baixas; a maioria dos microrganismos é destruída ou injuriada de forma mais intensa na faixa de -2° a -10°C do que a -15°C , sendo que a -30°C , o efeito letal é ainda menos marcante (OLSON Jr. & NOTTINGHAM, 1980).

Em alimentos, um aspecto importante se observa quando congelados, o crescimento microbiano cessa por completo em temperaturas abaixo de -10°C .

No armazenamento de microrganismos e outros organismos à baixas temperaturas, um fator muito preocupante é a injúria a qual os mesmos podem ser submetidos, por exemplo, em bactérias duas teorias diversas foram levantadas para explicar as razões da injúria ou morte das mesmas quando expostas ao congelamento; a primeira delas propõe que a célula é afetada devido ao aumento na concentração de solutos intracelulares, à medida que o gelo se forma durante o congelamento progressivo de uma solução aquosa; a segunda teoria assume que a injúria é decorrente da formação de cristais de gelo, principalmente a nível intracelular (NICKERSON & SINSKEY, 1972).

O congelamento rápido geralmente resulta na formação de cristais de gelo no interior das células, as quais, no entanto, mantêm seu tamanho normal, ao passo que células congeladas lentamente sofrem uma contração de volume. As condições de congelamento, geralmente podem resultar, quando em ambiente com alta umidade, na formação de cristais de gelo a nível extracelular, os quais exercem forças de tensão e pressão nas células, podendo causar sua injúria, além de ocorrer perda de água, aumento na concentração de solutos e contração da célula microbiana, igualmente com efeitos deletérios à sua viabilidade. Quando analisado comparativamente, maiores percentagens de células microbianas são capazes de sobreviver ao congelamento lento do que ao rápido; no entanto, ocorrem maiores proporções de células injuriadas (NICKERSON & SINSKEY, 1972).

Outro aspecto a se considerar é o efeito do descongelamento após um período qualquer em baixas temperaturas. Uma vez que o comportamento dos microrganismos é bastante diverso em relação ao congelamento, frequentemente serão constatadas alterações marcantes da

morfologia e fisiologia dos mesmos, antes e após o armazenamento em baixas temperaturas. (OLSON Jr. & NOTTINGHAM, 1980).

Todo processo de formulação e ou armazenamento envolvendo microrganismos deve considerar o fator injúria ao qual o mesmo pode ser submetido no decorrer desse processo, tradicionalmente, uma célula microbiana é considerada morta, quando perde a capacidade de se multiplicar, não sendo, portanto, passível de isolamento.

No entanto, pesquisas têm revelado que células aparentemente mortas, quando semeadas em meios de cultivo adequados, efetuam uma reparação de suas lesões e, após períodos variáveis, reassumem as condições normais de multiplicação e crescimento; tais células, aparentemente mortas e por vezes não recuperadas pela utilização de metodologias tradicionais de isolamento, são denominadas injuriadas (HURST, 1980).

Sabe-se que o aquecimento, refrigeração, congelamento, desidratação, liofilização e redução da atividade de água, irradiação, acidificação, contacto com conservantes e desinfetantes particularmente em alimentos, são fatores capazes de provocar a injúria microbiana (HURST, 1980).

Células microbianas submetidas a tratamentos subletais revelam uma série de alterações características do fenômeno da injúria (HURST, 1977) sendo elas principalmente:

a) aumento da sensibilidade a:

- antibióticos
- sais e elementos químicos tóxicos
- pequenas variações de pH, etc.

b) perda de componentes celulares

c) danos e alterações nas funções da parede celular

d) danos à membrana celular

e) danos aos ribossomos e cromossomos

f) aumento da fase de ajuste "Lag fase"

g) incapacidade de se multiplicar

Os microrganismos injuriados, por qualquer que seja a adversidade sofrida, podem ser recuperados satisfatoriamente utilizando-se, de meios de cultivo para reparação (enriquecidos), não seletivos, seguindo-se para posterior passagem dos mesmos aos meios seletivos ou específicos para aquela espécie em questão.

Alterações no sistema respiratório de microrganismos decorrentes de alguma injúria sofrida durante um processo, no caso o congelamento e descongelamento, podem significar grandes perdas na capacidade de recuperação desses organismos, ou pelo menos numa porção bastante grande da população exposta ao processo.

MORI et al. (1986) estudou em leveduras algumas alterações no sistema respiratório, decorrentes da injúria causada por congelamento. As principais perturbações foram observadas à nível mitocondrial, mais especificamente atingindo os citocromos, em suas atividades de oxidação e redução, resultando num decréscimo da atividade respiratória.

Numerosos experimentos sobre baixas temperaturas com o objetivo de preservação têm sido conduzidos desde os pioneiros POLGE et al. (1949), os quais congelaram sêmen bovino com glicerol. Desde que a crioproteção foi introduzida em microbiologia, a técnica tem sido muito utilizada e aplicada para a preservação de linhagens de microrganismos em laboratório visando, a manutenção da viabilidade, especificidade bioquímica e serológica, virulência, e a morfologia da cultura original, mas com certa limitação considerando-se as percentagens das células sobreviventes ao congelamento, BARNHART & TERRY (1971 I.).

Estes mesmos autores, estudando as respostas de conídios de *Neurospora crassa* em glicerol com relação ao processo de congelamento observaram diferentes percentagens de sobreviventes, quando se variava as velocidades de congelamento e descongelamento, isto sem a utilização de crioprotetores, onde as condições de congelamento são danosas, favorecendo a formação de cristais de gelo, causando a ruptura em muitos casos da membrana celular. Em particular, quanto ao descongelamento, observou-se ocorrer menor injúria celular quando o processo se dá rapidamente, ou seja, à velocidade acelerada.

BARNHART & TERRY (1971 I.) concluíram ser a formação de cristais de gelo intracelular, responsável em grande parte pela injúria observada nos conídios congelados quando comparados com os não congelados.

Em criobiologia sabe-se então, que a injúria celular à temperaturas subzero é consequência da concentração de solutos, remoção do fluido intracelular para o meio, e formação de cristais de gelo, sendo que estes mecanismos básicos ocorrem geralmente simultaneamente BARNHART & TERRY (1971 II.), e segundo os mesmos autores, parece razoável que para o fungo *Metarhizium anisopliae*, a formação de cristais de gelo intracelulares seja a principal causa de injúria em seus conídios quando à temperaturas subzero, o que resulta em um mecanismo letal para as células. Para diferentes espécies, ou células, cada fator de injúria pode ser particularmente letal em maior escala ou não.

Ainda BARNHART & TERRY (1971 II.), observaram em conídios de *N. crassa*, que quando não congelados e suspensos em solução isotônica de sais ou em água, ou sua passagem de um meio para outro, estes conídios não são afetados. Entretanto, conídios congelados em água, resultaram maiores percentagens de sobrevivência em relação àqueles congelados em solução isotônica de sais.

Incontestavelmente o papel dos crioprotetores, é de uma relevância enorme na manutenção de estruturas celulares e organismos quando em condições de baixas temperaturas, muitas descobertas na evolução da sobrevivência de microrganismos foram relatadas, quando estes foram congelados à -20°C em presença de soluções de leite, glicose, sucrose e glicerol em relação àqueles congelados em água ou solução salina.

Citando novamente POLGE et al. (1949) que foram os primeiros investigadores científicos a reconhecer os resultados benéficos do uso de agentes crioprotetores como o glicerol em espermatozóides congelados e seguindo a mesma linha de trabalho. Desde então uma revolução na criobiologia se processou levando os pesquisadores a mais intensamente absorverem e otimizarem as técnicas de utilização e emprego dos agentes crioprotetores DOEBBLER (1966).

Segundo ROWE (1966) a ação dos crioprotetores se dá através das pontes de hidrogênio da água enquanto solvente, para modificar as situações causadoras de injúria, limitando a formação de gelo, retardando a velocidade de crescimento do gelo e reduzindo a concentração de sais, sugerindo ainda que os compostos crioprotetores interagem direta ou indiretamente com as membranas celulares visando a estabilização do complexo da estrutura terciária água-lípido-proteína.

Dessa forma, nota-se que o complexo lipoproteico da membrana celular é grandemente dependente da orientação das moléculas de água para a ordenação de uma estrutura terciária, sendo que a água na membrana celular é altamente dependente para sua conformação, de grupos polares das proteínas e fosfolípidos.

SHANTINATH et al (1986) verificando os rearranjos em organelas celulares causados quando da utilização do glicerol como crioprotetor, observaram a importância de uma melhor compreensão dos seus efeitos com relação à concentração utilizada e o tempo de exposição ao glicerol.

2.4. RESPIROMETRIA

DARBY & GODDARD (1950) sentindo a falta, ou o pouco conhecimento a respeito da respiração de fungos filamentosos, desenvolveram um estudo para *Myrothecium verrucaria*, citando ainda a grande diferença existente entre os resultados de vários pesquisadores, e sendo possível que muito da variação nos resultados poderia ser atribuída à diferenças na metodologia mais do que uma real diferença na fisiologia dos organismos trabalhados. Neste trabalho os dois autores obtiveram valores bastante altos de assimilação oxidativa, usando-se glicose ou sacarose como substrato. Ao nível de 80% a assimilação oxidativa foi representada pela equação $5C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 24(CH_2O) + 6CO_2 + 6H_2O$. A oxidação da glicose é incompleta e possivelmente este açúcar está sendo assimilado intracelularmente para biossíntese da parede celular.

Estes pesquisadores se preocuparam com os efeitos da técnica empregada, com a necessidade de padronização dos métodos e a integração dos dados englobando idade, condição

fisiológica, nutrição, etc. Foram feitas medidas da respiração do fungo em dois tipos de respirômetros, o de Fenn e o de Warburg, e nenhuma diferença significativa foi observada entre os resultados dos dois aparelhos, apenas que o respirômetro de Fenn tem uma sensibilidade três vezes maior em relação ao de Warburg, sendo o último mais fácil de manipular, sendo este o de maior utilização em estudos respirométricos.

Ainda neste trabalho, os autores observaram também o fenômeno da assimilação oxidativa, sendo evidente aqui pela não obtenção de açúcares redutores no meio, isto poderia ser devido à rápida remoção desses açúcares (carboidratos) por assimilação oxidativa.

Básicamente a respiração de todas as células e de alguns extratos é mensurável em termos de troca gasosa; consumo de oxigênio; ou formação de dióxido de carbono (CO_2).

Num sentido mais generalizado, a respiração inclui todas as oxidações celulares, as quais produzem, ou poderiam produzir, energia para a célula.

O instrumento básico para se avaliar taxas de respiração em diferentes organismos, em muitos laboratórios é o manômetro de volume-constante WARBURG-BARCROFT, descrito por UMBREIT et al (1966); COCHRANE (1958). O aparelho manométrico de VAN SLYKE e NEIL para análise de gás, também analisa quantidades de gás em termos de suas pressões parciais em um volume fixo à temperatura constante.

Para manometria a pressão constante, onde se mede a variação de volume de um gás à pressão e temperatura constante, o manômetro de HALDANE-BARCROFT é o que opera baseado neste princípio, assim como o aparelho "volumétrico" de VAN SLYKE para análise de gás, citado acima, MORRIS (1972).

A medida de volumes de gás à várias temperaturas e pressões e a conversão destes volumes nas quantidades molares de gás que eles representam, é uma tarefa comum em investigações biológicas. Às vezes quantidades relativamente grandes de gás são envolvidas; por exemplo, quando a produção de substâncias gasosas é medida durante o crescimento fermentativo de culturas microbianas.

Mais frequentemente, a liberação ou consumo de gases por materiais biológicos é estudado em uma micro-escala usando os métodos manométricos, os quais se situam entre os métodos mais sensíveis de se seguir o curso e extensão de uma dada reação bioquímica, e algumas reações que não envolvem gases são frequentemente acopladas a outras que o fazem apenas para que possam ser estudadas por meio de técnicas manométricas, por exemplo, uma reação produzindo ácido poderá ser transformada para liberar CO_2 a partir de CO_2 tampão bicarbonato.

O "consumo" de oxigênio em particular pode também ser determinado por polarografia onde são utilizados microeletrolitos de oxigênio, sendo um aparelho acurado e que permite seguir qualquer variação na concentração de oxigênio em intervalos curtos de tempo, é muito utilizado para o estudo de células intactas, de mitocôndria e da atividade de determinadas enzimas, bem como de extratos livres de células, BACILA (1960).

Outros processos, os amperométricos, foram aplicados com sucesso para se medir a utilização de oxigênio em estudos com *Penicillium chrysogenum*, COCHRANE (1958), obtendo-se bons resultados.

De todas as técnicas gasométricas, a de uso mais generalizado era ou ainda é, a baseada no método do manômetro de WARBURG, modificação do manômetro para gases sanguíneos, descrito por BARCROFT & HALDANE em 1902; BACILA (1960).

O aparelho de WARBURG consiste de manipulação bastante grande, sua calibração é demorada e trabalhosa e sua sensibilidade à alterações no ambiente externo é muito grande, o que torna o seu uso bastante delicado.

GILSON (1963), desenvolveu um respirômetro diferencial de desenho simplificado e aperfeiçoado, onde cada frasco ativo (de WARBURG), onde ocorrem as reações bioquímicas, possui um respectivo frasco de referência (modelo melhorado) o qual é responsável pela manutenção do equilíbrio no sistema quando em funcionamento, eliminando os efeitos da variação na pressão barométrica e variação moderada na temperatura. Outra vantagem deste aparelho é a leituras digital oferecida pelos micrômetros (volumômetros), os quais permitem leitura ininterruptas de 0 à 500 μl ; resumindo, as vantagens em relação ao WARBURG convencional são: (a) uma leitura digital é obtida

diretamente em microlitros; (b) a calibração dos frascos de reação não é necessária; (c) os manômetros são estacionários e facilmente lidos; (d) todos os manômetros são simultaneamente visíveis e (e) as válvulas possuem posições bem definidas para abrir e fechar o sistema em relação ao ambiente externo.

Portanto, o respirômetro diferencial GILSON, permite uma maior exatidão e reprodutibilidade nos resultados.

WINTERSTEIN (1913), citado por COCHRANE (1958) talvez tenha sido o primeiro estudioso a descrever um respirômetro que fosse baseado no princípio da pressão constante, vindo depois as variadas modificações e aperfeiçoamentos realizados por DIXON (1943), SCHOLANDER (1952) e SCHOLANDER & IVERSON (1958), até que GILSON (1963) citado acima, viesse a lançar seu modelo avançado, UMBREIT et al. (1966).

LAWTON & RICHARDS (1969) comparou diferentes métodos respirométricos, entre eles o Gilson, o Warburg e Winkles para medir os quocientes respiratórios de invertebrados aquáticos com propósitos de estudos ecológicos, sugerindo que para a utilização destes métodos não basta o conhecimento da físico-química inerente ao método, mas principalmente da biologia do animal sob investigação.

WIGHTMAN (1977) foi outro pesquisador a aplicar diferentes técnicas respirométricas para estudos energéticos em insetos, onde ele variou também diversos fatores ambientais, como luz, adição de solo, atmosfera de CO_2 , etc.; verificando a similaridade de medidas no quociente respiratório em condições ambientais iguais, isto em aparelhos baseados em princípios distintos.

A fonte de carbono, de grande aplicação em testes respirométricos para se medir o metabolismo de diferentes microrganismos ou meramente reações químicas, é a glicose, talvez, pelo seu desdobramento facilitado e por constituir fonte de carbono de fácil assimilação por muitos organismos, trabalhos como de LIDDEL & WRIGHT (1961), SHU & THORN (1951), mostram a eficiência energética da glicose quando comparada com outros compostos, como fonte de carbono.

ROSATO (1977), também utilizou a glicose como substrato em seu trabalho com mutantes de *Aspergillus nidulans*, nas determinações manométricas para medir o consumo de

oxigênio e calcular a assimilação oxidativa segundo BACILA (1960), onde a quantidade de glicose oxidada foi calculada assumindo-se a reação: $C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O$, ou seja, que 6 moléculas de O_2 são utilizadas por unidade de glicose. Sendo cada molécula-grama de O_2 igual a 22,4 l. de O_2 , seriam necessários 134,4 l. para oxidação de 1 mol de glicose.

A quantidade de glicose consumida sendo conhecida pode-se então, estabelecer o consumo de O_2 esperado. O excesso de O_2 entre o valor esperado e o observado foi considerado como a % assimilada, e calculada pela fórmula:

$$\% \text{ assimilação oxidativa} = \frac{O_2 \text{ esperado} - O_2 \text{ observado}}{O_2 \text{ esperado}} \times 100$$

Trabalhando com leveduras, *Saccharomyces carlsbergensis*, HORII (1972) também utilizou a glicose como fonte de carbono para analisar o quociente respiratório, onde ele comparou o metabolismo aeróbico e anaeróbico. Cerca de 95% da glicose do meio foi consumida durante as 12 primeiras horas e o máximo de crescimento celular foi atingido entre 24 e 48 horas de cultivo. Células em respiração promoveram intensa assimilação oxidativa, sendo que cerca de 62% do total da glicose consumida foi incorporada como material celular, após 15 minutos de incubação. A capacidade de assimilação oxidativa diminuiu na dependência direta da idade da cultura.

Células "jovens", com 24 horas de cultivo, e células "velhas", com 120 horas de cultivo, apresentaram padrões metabólicos distintos. As determinações obtidas por HORII (1972) e ROSATO (1977), foram realizadas no aparelho manométrico convencional de WARBURG.

Os fungos em geral, na sua respiração sofrem a ação de muitos fatores, sendo talvez o fator mais importante a própria espécie, pois cada uma responde diferentemente às vezes em situações muito semelhantes ou até iguais. Poucos dados comparativos são disponíveis, mas pode-se assumir que o fungo, o qual pode crescer em um dado substrato, também pode oxidá-lo, COCHRANE (1958).

Os fatores que atuam sobre a respiração podem ser divididos em dois grupos, sendo os bióticos, não ambientais como idade e estágio de desenvolvimento e a permeabilidade da célula e os fatores abióticos, como a acidez (pH), temperatura, pressão de oxigênio, dióxido de carbono e nutrientes acessórios.

Durante o período de rápido crescimento é que se verifica a atividade respiratória mais intensa, sendo que subsequente a este período, a respiração, especialmente a respiração endógena, ela diminui com o aumento da idade. Isto pode, é claro, refletir somente o fato de que mais e mais células mortas estariam acumuladas no micélio mais velho, sendo ainda bastante possível que a respiração das pontas de hifa crescendo é independente da idade da cultura, tanto quanto a disponibilidade de nutrientes.

Segundo COCHRANE (1958); a respiração do esporo não difere fundamentalmente daquela do micélio, embora deva-se levar em conta que não seria surpresa acharmos maior atividade em esporos germinando do que em culturas mais velhas.

Muitas vezes, as enzimas respiratórias, ou a utilização de outras vias oxidativas preferencialmente, variam no conteúdo e na forma de utilização por um mesmo organismo em diferentes tipos de amadurecimento daquela cultura.

Quanto à permeabilidade celular é difícil distinguir entre a inabilidade intrínseca de uma célula respirar um substrato exógeno e falha de penetração do composto para o interior da célula. Às vezes, células intactas de um fungo podem falhar para oxidar um dado substrato enquanto extratos livres de células o fazem tão rapidamente. Tal evidência sugere que células intactas são impermeáveis ao substrato. Em geral, substâncias ionizáveis, como mais prováveis de serem excluídas por uma barreira de permeabilidade.

De qualquer maneira, falhas na utilização de substratos exógenos não podem ser sempre atribuídas à impermeabilidade da membrana.

Desta forma, em leveduras, células congeladas são permeáveis ao citrato, mas só o metabolizam após um tratamento futuro com clorofórmio. Às vezes, a organização subcelular torna

inacessível para enzimas dentro da célula, é muito difícil distinguir entre esta situação e os efeitos reais da membrana, COCHRANE (1958).

Certas enzimas respiratórias, provavelmente aquelas "compreendidas" nas primeiras etapas da atividade respiratória, não são constitutivas mas, são induzidas pelo substrato.

Já o pH, é um fator com pouco efeito sobre o metabolismo endógeno dentro da faixa que vai de 5 a 8, ou seja, o quociente respiratório não é alterado de forma significativa. O pH é mais importante quando se trata de respiração exógena, pois as enzimas localizadas na superfície de células intactas, as quais parecem estar protegidas das mudanças externas de pH, parecem responder diferentemente às alterações nesse fator.

Em estudos respirométricos os tampões fosfato são geralmente os mais satisfatórios, no entanto, outros, como o acetato, geralmente são tóxicos.

Quanto à temperatura, muitos estudos respirométricos são realizados em temperaturas moderadas, 20 a 30°C, principalmente para fungos saprofíticos e actinomicetos. Temperaturas mais altas são aplicáveis para os fungos patogênicos à animais.

Durante a respiração, um suprimento de potássio, fosfato e magnésio basicamente é necessário, embora pareça que as reservas endógenas destes e outros minerais sejam suficientes. A oxidação aeróbica com substrato exógeno geralmente é muito aumentada se uma fonte de nitrogênio é fornecida, o extrato de leveduras também pode surtir o mesmo efeito.

Os compostos de carbono atendem duas funções essenciais no metabolismo dos fungos, sendo a primeira, o suprimento de carbono necessário para a síntese de compostos que compreendem a vida celular, como proteínas, ácidos nucleicos, reserva de alimentos, etc. A segunda função, a oxidação de compostos de carbono produz apreciáveis quantidades de energia. Podendo os fungos utilizarem uma grande variedade de fontes de carbono, como monossacarídeos, oligossacarídeos, polisacarídeos, ácidos orgânicos, e lipídeos. O CO₂ pode ser fixado por alguns fungos, mas não ser usado como uma fonte exclusiva de carbono para o seu metabolismo; diferentes fontes de carbono resultarão em diferentes velocidades de crescimento, ROBINSON (1978).

Quanto às diferentes linhagens, os fungos podem variar na capacidade de utilizar com maior ou menor eficiência certos compostos de carbono, ROBINSON (1978). Para misturas de compostos de carbono, pode haver uma utilização preferencial por uma forma ou outra de carbono por um fungo em particular, por exemplo, o *Penicillium chrysogenum* quando suprido com uma mistura de acetato, lactato, glicose e lactose; o acetato é a primeira fonte à ser utilizada e a lactose a última. Em alguns casos, misturas de açúcares simples dão ótimos resultados, por exemplo, em *Aspergillus niger* o qual mostra um marcante aumento no peso seco quando cultivado em meio líquido contendo galactose e glicose conjuntamente, a produção de peso seco quando na presença desses açúcares separadamente, é muito baixa, ROBINSON (1978).

Muitos fungos utilizam fontes orgânicas ou inorgânicas de nitrogênio, alguns utilizam tanto nitrato como amônia, outros podem utilizar amônia mas não o nitrato, muitos fungos podem utilizar os aminoácidos como fonte de nitrogênio, quando sais de amônio, como sulfato, nitrato ou cloreto são adicionados ao meio de cultivo, geralmente há uma acentuada queda no pH como um resultado da utilização do cátion amônio, sendo que o crescimento pode ser reduzido como um resultado deste efeito.

O magnésio, o fósforo, potássio e enxofre, são relativamente bastante necessários para os fungos se desenvolverem satisfatoriamente. O magnésio é usualmente suprido como sulfato e sua principal função parece ser a ativação de enzimas necessárias para o metabolismo e crescimento. O fósforo, geralmente fornecido como fosfato de potássio, é absorvido rapidamente durante o crescimento, sua deficiência resulta numa redução na capacidade e velocidade de utilização da glicose, portanto, o fósforo, com exceção dos outros elementos, se faz necessário o seu suprimento durante experimentos respirométricos, devido aos efeitos negativos que podem ser gerados na resposta metabólica sem a sua presença.

A velocidade de absorção do fosfato é reduzida quando o crescimento torna-se limitado pela disponibilidade de carbono ou nitrogênio, ROBINSON (1978).

A utilização de açúcares pode ser reduzida pela deficiência de potássio, em *Aspergillus niger*, foi observado que o sódio pode substituir o potássio, suprimindo assim a deficiência e melhorando a forma de assimilar o açúcar em questão, ROBINSON (1978).

O meio de suspensão utilizado para se medir a atividade respiratória deve responder no mínimo satisfatoriamente no sentido de atender as exigências básicas do microrganismo em estudo, dessa forma uma composição balanceada deve ser preocupação do pesquisador.

2.5. PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA

Em recente revisão, ROBERTS (1989) e MESSIAS (1989) resumem a importância, o estado de desenvolvimento e as formas de ação dos fungos entomopatogênicos, onde diferentes gêneros e espécies entre fungos e insetos hospedeiros são citados, dando uma visão global dessa relação patogênica entre os dois organismos. Portanto, esses dois trabalhos já dariam subsídios suficientes para a compreensão do controle microbiano de insetos através de fungos num todo, mas alguns trabalhos relevantes devem ser citados.

Patogenicidade e virulência, termos amplamente utilizados quando se trata de avaliar o efeito do fungo sobre o inseto hospedeiro, ALVES (1986). São termos geralmente considerados intercambiáveis, mas, segundo FUXA & TANADA (1987), patogenicidade estaria mais relacionado a grupos ou espécies de patógenos, sendo uma característica "qualitativa", enquanto virulência determinaria o grau desta patogenicidade dentro de um grupo de espécies ou patógenos, caracterizando um termo "quantitativo".

Segundo FARGUES et al (1975), o *Metarhizium anisopliae* apresenta patogenicidade à 204 espécies de insetos pertencentes a 43 famílias dentre as ordens Orthoptera, Dermaptera, Hemiptera, Lepidóptera, Diptera, Hymenoptera e Coleóptera.

O desenvolvimento da doença em insetos pode ser relacionado com a germinação do conídio, penetração através da cutícula dada por ação mecânico-enzimática, invasão, colonização do corpo do inseto e produção de toxinas.

O contato do conídio com o inseto hospedeiro, marca o início da doença; o conídio germina sobre a cutícula do inseto e penetra através do integumento. Uma estrutura denominada apressório é responsável pela fixação do fungo sobre o inseto e posterior penetração. MADELIN (1966); ROBERTS & YENDOL (1971). Forças físicas, pressão mecânica e produção de exoenzimas estão envolvidas no mecanismo de penetração do fungo, assim, a habilidade dos fungos entomopatogênicos em produzirem certas enzimas extracelulares ou exoenzimas como: protease, lipase e quitinase estaria relacionada a penetração no integumento do hospedeiro e no processo de colonização. BALFOUR-BROWNE (1960); FERRON (1978) e ROSATO et al. (1981).

ZACHARUCH (1970 a,b,c); (1973), descreveu os eventos de penetração de *M. anisopliae* no hospedeiro que podem ser resumidos, na formação de um apressório (extremidade dilatada da hifa com alta atividade secretora enzimática, que permite a penetração da epicutícula), penetração da pro-cutícula (também mecânico-enzimática) e formação de células com abundância de nutrientes armazenados (clamidósporo) que parece manter a viabilidade do fungo no corpo do hospedeiro por longos períodos até a esporulação superficial.

Os tubos germinativos crescem extensivamente através da procutícula após a germinação do conídio, com a formação de apressórios. Conídio, tubo germinativo e apressório são geralmente fundidos em estruturas de infecção de variados tamanhos e arranjos, SCHABEL (1978).

Através de estudos de microscopia eletrônica, PEKRUL & GRULA (1979) revelaram importantes detalhes do modo de infecção de *Heliothis zea* por *B. bassiana*, evidenciando que a invasão do corpo do hospedeiro ocorre também pelos espiráculos.

Sabe-se que além da resistência mecânica, a cutícula também pode oferecer uma resistência química através de substâncias nela presentes que exercem ação inibitória sobre o fungo, MESSIAS & PUPIN (1990).

MESSIAS & PUPIN (1990), relataram que os lipídeos presentes na epicutícula de *Diatraea saccharalis*, entre eles os ácidos caprílico e capróico inibem o crescimento de *M. anisopliae*. KUCERA (1984) isolou de insetos, substâncias que tinham atividade inibidora sobre proteases de *M. anisopliae*. Atualmente a ação de enzimas degradadoras e o seu estudo, bem como os mecanismos

envolvidos se encontram num estágio de elucidação bastante desenvolvido St LEGER et al. (1986 c); St.LEGER et al. (1992); St.LEGER (1993); LEITE (1987); BRAGA (1992); AGUIAR (1990); SILVA (1985).

Entre as enzimas estudadas em *M. anisopliae*, amilase, lipase, protease e quitinase, segundo St.LEGER et al. (1992), a protease (Pr1) parece ser a mais ativa na penetração do hospedeiro.

Apesar de vários autores haverem estabelecido uma correlação positiva entre a produção de exoenzimas e o processo de penetração dos fungos entomopatogênicos em diversos hospedeiros, alguns resultados conflitantes foram obtidos quando se considerou a virulência das linhagens. SILVA (1985); LEITE & MESSIAS (1984); LEITE (1987); AGUIAR (1990); PARIS & FERRON (1979); PEKRUL & GRULA (1979); CHEUNG & GRULA (1982).

Toxinas produzidas por fungos entomopatogênicos têm sido descritas como associadas a morte do hospedeiro. Vários compostos tóxicos foram isolados e identificados de culturas de *Beauveria*, *Cordyceps*, *Entomophthora*, *Metarhizium* e *Paecilomyces*. Dextruxinas A, B, C e D e dimetildestruxina B foram isoladas de culturas de *M. anisopliae*. Beauvericina foi encontrada em *B. bassiana* e *P. farinosus*. Cordicepina foi isolada de *Cordyceps militaris* e outras substâncias tóxicas não identificadas foram relatadas em espécies entomógenas de *Aspergillus*, FERRON (1978).

Estudos sobre a produção de toxinas por fungos entomopatogênicos têm sido relatados por ROBERTS (1966; 1966a), (1969). AL-AIDROOS & ROBERTS (1978); FARGUES et al. (1985); KAIJIANG & ROBERTS (1986); LUGLI (1987), entre outros.

SILVA & MESSIAS (1986) realizando bioensaios com o inseto *Rhodnius prolixus*, verificaram que mutantes de *M. anisopliae* que deixaram de produzir lipases e amilases, tiveram virulência menor que a das linhagens selvagens, enquanto que mutantes para a produção de proteases, não apresentaram níveis de virulência significativamente diferentes dos níveis das linhagens selvagens. Além disto, linhagens revertentes para a produção das duas primeiras enzimas tiveram seus níveis de virulência restaurados concluindo os autores que a virulência das linhagens se altera quando ocorrem modificações na produção de enzimas.

2.6. PATOGENICIDADE AO *Panstrongylus megistus*.

O inseto *Panstrongylus megistus*, vulgarmente conhecido como barbeiro, pertence à ordem Hemiptera, família Reduviidae, sub-família Triatominae e constitui-se em um dos vetores do *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas no homem.

O *Trypanosoma cruzi*, um protozoário, é transmitido através das fezes do barbeiro, que defecam logo após sugarem o sangue de suas vítimas, picam seres humanos, ratos, morcegos e outros mamíferos e podem suportar jejum prolongado, o que de certa forma assegura a sobrevivência desse vetor por longos períodos sem se alimentar, REY (1973).

Segundo CHAIA (1975) existem algumas características facilmente observáveis que permitem a identificação de um provável hematófago transmissor, distinguindo-o de um fitófago inofensivo. Além dos hábitos alimentares, o estudo do rostro (aparelho bucal picador e sugador) é essencial.

Segundo SILVA (1985) em sua revisão sobre o assunto, o controle dos vetores da doença de Chagas vinha sendo feito e ainda acontece, pelo emprego de componentes químicos, sendo que alguns métodos de controle biológico foram empregados sem sucesso. Este autor cita MOURA COSTA como o pioneiro na utilização de *Metarhizium anisopliae* contra *Rhodnius prolixus*.

O controle de Triatomíneos por meio de fungos, também foi mostrado por SHERLOCK & GUITTON (1982), que em seu trabalho utilizaram o *Metarhizium anisopliae*, onde verificou-se um aumento da mortalidade com o aumento da umidade e, ainda, a possibilidade de insetos mortos pelo patógeno disseminarem a micose para insetos sadios.

SILVA (1985) como citado anteriormente e SILVA & MESSIAS (1986) verificaram a virulência de mutantes e revertentes exoenzimáticos para amilases, lipases e proteases, contra o vetor *Rhodnius prolixus*, notando que os revertentes de maneira geral, restabeleceram a virulência em níveis semelhantes aos tipos selvagens, exceto no caso de proteases, cujas reduções não foram significativas.

RANGEL et al. (1986) realizaram bioensaios com uma linhagem melhorada de *M. anisopliae*, denominada 157p, e obtiveram os seguintes LT_{50} : 7,26 dias para o *Triatoma infestans*; 7,98 dias para *Triatoma sordida* e 5,46 dias para *Panstrongylus megistus*.

MESSIAS et al. (1986), estudaram a virulência de linhagens selvagens, mutantes auxotróficos e diplóides de *Metarhizium anisopliae* em *Rhodnius prolixus*, e verificaram que tanto os diplóides como os parentais atingiram 100% de mortalidade na dose de 1mg/placa entre 8 e 9 dias. Nas linhagens mutantes essa mortalidade não foi alcançada até 12 a 15 dias após a aplicação. Observaram ainda, que a virulência da linhagem selvagem e do diplóide foram semelhantes em todos os níveis das doses testadas, indicando que a virulência reduzida nos mutantes foi restabelecida na formação do diplóide. Apesar dos mutantes apresentarem baixa virulência, estes não perderam a capacidade de matar o hospedeiro.

SILVA et al. (1983); SILVA & MESSIAS (1984b), utilizaram duas linhagens de *M. anisopliae*, mutantes e revertentes para exoenzimas amilase, lipase e protease e verificaram que *R. prolixus* exposto a conídios em solução salina, foram infectadas e mortas, sendo a LD_{50} e LT_{50} estimadas pelo método de Probit.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Linhagem de *M. anisopliae* var. *anisopliae* utilizada:

Foi utilizada a linhagem E₉, que faz parte do banco de germoplasma mantido pelo laboratório de Genética de Microrganismos Entomopatogênicos do Departamento de Genética e Evolução -IB - UNICAMP.

Esta linhagem foi originalmente isolada no Estado do Espírito Santo pelo Dr. José Aires Ventura, de cigarrinhas-das-pastagens (*Deois flavopicta*, Homoptera: Cercopidae) infectadas naturalmente.

3.1.2. Meios de Cultura e Soluções utilizadas:

3.1.2.1. Meio de Arroz cozido

- arroz beneficiado 50,00g
- água destilada 40,00ml

Autoclavado à 120°C em 1 atm por 20 minutos

3.1.2.2. Meio completo modificado (PONTECORVO et al., 1953)

- NaNO ₃	6,00g
- KH ₂ PO ₄	1,52g
- KCl	0,52g
- MgSO ₄ .7H ₂ O	0,52g
- FeSO ₄	traços
- ZnSO ₄	traços
- glicose	10,00g
- peptona	2,00g
- caseína hidrolizada	1,50g
- extrato de levedura	0,50g
- solução de vitaminas	1,00ml
- Ágar	15,00g

Completo-se o volume para 1000ml com água destilada.

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 2N antes da autoclavagem à 120°C em 1 atm por 20 minutos.

3.1.2.3. Solução de Vitaminas

- ácido nicotínico	100,00mg
- ácido p-aminobenzóico	10,00mg
- biotina	0,20mg
- piridoxina	50,00mg
- riboflavina	100,00mg
- tiamina	50,00mg
- água destilada esterilizada	100,00ml

A solução foi armazenada em frasco escuro a 4°C após sofrer processo de Tindalização.

3.1.2.4. Meio de Cultura Basal:

- NaNO ₃	3,00g
- KH ₂ PO ₄	0,76g

Completoou-se o volume para 1000ml com água destilada.

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 2N, e autoclavou-se a solução à 120°C em 1 atm por 20 minutos.

3.1.2.5. Meio de Cultura Basal enriquecido com uma fonte de carbono:

- Constituído do meio de cultura basal, descrito no item 3.1.2.4, acrescido de 5g de glicose.

3.1.2.6. SOLUÇÕES

3.1.2.7. Solução Salina (0,85% p/v)

- NaCl	8,50g
- água destilada	1000,00ml

Autoclavou-se à 120°C em 1 atm por 20 minutos.

3.1.2.8. Solução de Hipoclorito de Sódio à 2,5% (v/v)

- Hipoclorito de sódio comercial (5%)	5,00ml
- água destilada esterilizada	5,00ml

3.1.2.9. Solução Saturada de Sulfato de Potássio

Adicionou-se sulfato de potássio a 500,00ml de água destilada esterilizada até a saturação, à temperatura ambiente.

3.1.2.10. Solução Padrão de Glicose

- glicose	0,30g
- água destilada	1000,00ml

A solução foi autoclavada à 120°C em 1 atm por 20 minutos e guardada à 4°C.

3.1.3. Reagentes Utilizados Para a Dosagem de Glicose. (NELSON, 1944)

3.1.3.1. Reagente de Cobre A:

- Na_2CO_3	25,00g
- Sal de Rochelle	25,00g
- NaHCO_3	20,00g
- Na_2SO_4	200,00g

3.1.3.2. Reagente de Cobre B:

- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	15,00g
- HCl concentrado	1 gota
- água destilada	100,00ml

3.1.3.3. Reagente de Arsenomolibdato:

- molibdato de amônio	25,00g
- HCl concentrado	21,00ml

- $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3,00g
- água destilada 450,00ml

Estocar este reagente em frasco escuro, em local onde a temperatura não seja inferior à 20°C.

3.2. METODOLOGIA

3.2.1. Revigoração do patógeno.

Da linhagem E_g foi feita uma suspensão de 10^8 conídios/ml, procedendo-se então à inoculação de algumas ninfas de terceiro e quarto estágios de *Panstrongylus megistus*, fazendo-se os mesmos caminharem sobre uma folha de papel de filtro embebido com a dose acima. Este procedimento permite que os conídios sejam distribuídos de forma homogênea numa determinada área, e após 10 minutos de exposição ao fungo, foram coletados e transferidos para frascos de polipropileno, sendo mantidos em câmara úmida com atmosfera em torno de 97% de umidade relativa, à 28°C até morrerem.

Após a morte, os cadáveres foram lavados com solução hipoclorito de sódio à 2,5%, em seguida lavados com água destilada, esterilizada e secados em papel de filtro, e colocados em placas de Petri contendo meio completo conforme descrito no item 3.1.2.2. e incubados à 28°C por 9 dias quando se obtém crescimento do fungo, possibilitando o reisolamento do patógeno, obtendo-se aí então a linhagem revigorada.

3.2.2. Obtenção de Conídios para Armazenamento, Avaliação de O_2 e Bioensaios.

Frascos de Erlenmeyer contendo arroz cozido como substrato, preparado conforme descrito no item 3.1.2.1. foram inoculado com 10ml da suspensão contendo 10^8 conídios/ml em solução salina, da linhagem E_g revigorada, e incubados à 28°C por 11 dias, para crescimento.

3.2.3. Formulação do Inóculo para Armazenamento.

Os conídios crescidos em arroz cozido conforme descrito acima foram lavados vigorosamente com água destilada até completa remoção dos mesmos. Foi obtida uma suspensão concentrada de conídios e esta foi passada através de peneira de 0,50mm de malha, coletados e centrifugados à 3.000rpm (Centrifuga Excelsa Baby-Fanem) por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante.

Após a centrifugação foi obtida uma "pasta", massa concentrada de conídios que foi dividida em 2 partes iguais, e avaliadas quanto: a viabilidade dos conídios e a porcentagem de massa seca, permitindo-se assim calcular o número de conídios por grama de pasta.

Numa das partes pesou-se uma massa de 200g e adicionou-se 10% (p/v) de glicerol. $C_3H_5(OH)_3$ previamente esterilizado, e a preparação formulada foi acondicionada em vários frascos com volume de 30ml e tampa de rosca, que foram mantidos à -20°C em freezer, como condição de armazenamento empregada no presente estudo.

Uma aliquota foi retirada previamente para a realização dos testes de respirometria e bioensaio, para se iniciar os experimentos, constituindo assim os valores "standard" para as avaliações posteriores.

Procedeu-se da mesma forma para a segunda parte da massa de conídios, também de 200g, exceto não sendo adicionada de glicerol, tida como controle.

3.3.RESPIROMETRIA

3.3.1. Preparação do Respirômetro Gilson.

Com a finalidade de se determinar o volume total do sistema, calibrou-se os frascos de Warburg conforme o método descrito por BACILA (1960), usando-se mercúrio.

Inicialmente as regiões esmerilhadas dos frascos de reação e dos respectivos bocais terminais dos micrômetros foram lubrificadas com silicone "DOW CORNING" para se evitar possíveis vazamentos. No interior dos frascos de reação, no poço central, pedaços retangulares de papel de filtro de 1,00 x 2,00 cm foram colocados com o objetivo de aumentar a superfície de absorção de CO_2 e em seguida adicionou-se 0,2ml de solução de KOH à 10% (p/v).

À cada frasco de reação adicionou-se 5ml da suspensão de conídios em meio basal com e sem glicose, das preparações armazenadas contendo e não contendo glicerol.

Nas câmaras de referência com volume total de 21ml foram colocados 6ml de água destilada adicionados de mais 1,3ml de solução de HgCl_2 à 0,01% (p/v) para inibir crescimento bacteriano; este volume é calculado em relação ao volume total do sistema.

O respirômetro foi preparado para operar, e ligado 30 minutos antes do início do experimento (conforme descrito no item que se segue) para que todo o sistema operacional entrasse em equilíbrio térmico.

A temperatura do banho foi mantida em $28 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

As leituras obtidas no micrômetro correspondem ao consumo de oxigênio em μl pelos conídios presentes em suspensão; as leituras no termobarômetro servem para eventuais correções, caso sejam necessárias.

3.3.2. Determinações Manométricas

As determinações manométricas foram realizadas em Respirômetro Diferencial Gilson (Gilson International). Durante os experimentos os frascos de reação foram mantidas à $28 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$, pelo sistema de imersão em banho, com agitação de 50 oscilações por minuto.

As leituras foram feitas diretamente em μl de gás evoluído, através de micrômetros instalados e interligados a cada frasco de reação e frasco de referência.

3.3.3. Preparação da Suspensão de Conídios

Amostras obtidas conforme descrito no item 3.2.2 imediatamente ainda sem sofrer armazenamento, foram retiradas de ambas as partes tratadas com glicerol e sem glicerol, para a realização dos testes de respirometria, bioensaio e viabilidade, e assim consecutivamente durante os seis meses de experimentação, com amostragens mensais.

Mais amostras tomadas da pasta sem glicerol e com glicerol foram suspensas em meio basal com e sem glicose (itens 3.1.2.4./3.1.2.5.) numa concentração final de $1,00 \times 10^6$ conídios/ml de meio, estimados com auxílio de um hematímetro.

Visando-se reduzir ao máximo a possível interferência do glicerol em relação à fonte de carbono utilizada, os conídios tratados com este crioprotetor, foram lavados por 3 vezes em água destilada esterilizada por centrifugação à 5000 rpm por 10 minutos.

3.3.4. Preparação da amostra dos diferentes tratamentos

De cada preparação de conídios armazenados à -20°C , exceto para o primeiro dia, com glicerol e sem glicerol, tomou-se uma porção para se fazer as suspensões no meio de cultura basal, de forma que a concentração final neste meio ficasse em torno de $1,00 \times 10^6$ conídios/ml, e após este preparo, procedeu-se dos passos citados no item 3.3.1.

3.3.5. Avaliação da Evolução de O₂

Para avaliar a evolução de O₂, os frascos de reação receberam os 5,00ml das suspensões de $1,00 \times 10^6$ conídios/ml das amostras com e sem glicerol.

Três repetições foram tomadas para cada tratamento, mantendo-se uma com meio basal, que funcionou como termobarômetro (TB). As avaliações da evolução de O₂ foram feitas em meio basal com e sem glicose, para conídios armazenados contendo e não contendo glicerol.

Todo o sistema foi então introduzido no banho nas condições descritas no item 3.2.2., e após um período de 30 minutos quando o sistema entra em equilíbrio, fechou-se o sistema e se aguardou por mais 30 minutos, para se ajustar o zero, quando se realiza a primeira leitura no aparelho.

As avaliações foram feitas por um período de 48 horas com leituras a cada 4 horas.

3.3.5.1. Avaliação da Evolução de O₂ para conídios vivos e mortos.

Conídios mortos e vivos em diferentes combinações foram avaliados no respirômetro, para se obter parâmetros da evolução de O₂, os conídios mortos foram obtidos por aquecimento em banho-maria a 70°C por 6 horas.

As proporções entre vivos e mortos foram as seguintes:

100% vivos

90% vivos

50% vivos

10% vivos

100% mortos.

3.3.6. Consumo de Glicose

3.3.6.1. Reta Padrão de Glicose

A reta padrão de glicose foi feita com a finalidade de servir como ponto de referência para quantificar a glicose residual em cada experimento.

O método empregado para se quantificar este açúcar foi o método proposto por SOMOGY modificado por NELSON (1944).

A construção da reta padrão consiste em tomar 1ml da solução padrão de glicose com concentração de 0,30mg/ml (p/v) ao qual é adicionado 1ml da mistura constituída de 25ml do reagente de cobre A : 1ml do reagente de cobre B conforme descrito nos itens 3.1.3.1./3.1.3.2.; estes 2ml foram levados ao banho-maria à 100°C até fervura e aí mantidos por 20 minutos e em seguida colocados em gelo por 10 minutos, adicionando-se então 1ml da solução de arsenomolibdato (item 3.1.3.3.), completando-se o volume para 25ml com H₂O destilada.

Este procedimento foi realizado para as 5 concentrações pré-determinadas de 0,3000mg; 0,1500mg; 0,0500mg; 0,0250mg e 0,0050mg de glicose por ml (p/v) para a construção da reta padrão.

3.3.6.2. Dosagem da Concentração de Glicose nas Amostras.

Com o objetivo de se avaliar a glicose residual das amostras após as experimentações, as determinações da concentração de glicose foram feitas no início e no final dos testes seguindo-se a metodologia descrita no item 3.3.6.1..

Os valores de glicose residual, foram obtidos subtraindo-se o valor da glicose residual do valor da glicose inicial.

Para a dosagem de glicose se fez necessária a diluição das amostras em 20 vezes para que os valores não extrapolassem os parâmetros da reta padrão construída.

As dosagens de glicose foram todas realizadas em espectrofotômetro DU-70 Beckman, luz visível à 500 nm.

3.4. BIOENSAIO

O bioensaio foi realizado conforme metodologia proposta por MESSIAS et al. (1986), com algumas modificações, empregando-se conídios das preparações obtidas no item 3.2.3.

Inicialmente foi feita uma suspensão concentrada de conídios com 10^{10} conídios/ml. e desta sucessivas diluições foram feitas obtendo-se 1×10^{10} , 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^4 e 1×10^2 conídios/ml de água destilada esterilizada.

A viabilidade dos conídios foi medida, colocando-se uma alíquota da suspensão em MC e observando-se a germinação dos mesmos após 14 horas de incubação à 28°C, tomando-se em porcentagem os conídios germinados e não germinados num total de 500 conídios.

Placas de Petri de 100 x 20cm contendo um disco de papel de filtro de 9cm de diâmetro, previamente esterilizado, receberam 2ml de cada suspensão de conídios distribuídos homogêneamente, a partir de suspensões preparadas para se obter uma concentração final de conídios de: 2×10^2 , 2×10^4 , 2×10^6 , 2×10^7 , 2×10^8 , e 2×10^{10} conídios/ml. Vinte e cinco ninfas entre terceiro e quarto estágios, não alimentadas, foram utilizadas para cada dose diferente, e deixados caminhar sobre o papel de filtro por 30 minutos. Após este período, grupos de 5 insetos foram transferidos para recipientes de polipropileno com tampa telada, contendo um disco de papel de filtro em seu fundo mais uma tira sanfonada também de papel de filtro no seu centro que serviram como abrigo para as ninfas. Os cinco recipientes de polipropileno foram colocados em frascos de vidro com tampa, contendo solução saturada de sulfato de potássio para manter em torno de 97% de Umidade Relativa (UR).

O mesmo procedimento foi observado para com os 25 insetos testemunha, obedecendo-se a mesma distribuição e tratamento, onde se empregou somente o veículo utilizado nas preparações das suspensões de conídios.

A mortalidade dos insetos foi avaliada diariamente e a confirmação da mortalidade pelo entomopatógeno foi feita pelo reisolamento deste dos cadáveres, conforme será descrito no item

3.4.1..

Um bioensaio foi realizado mensalmente até o sexto mês de armazenamento, empregando-se os conídios armazenados, quando estes também eram avaliados em testes de respirometria e viabilidade.

3.4.1. Reisolamento do Fungo em Insetos Mortos Nos Bioensaios.

Para se confirmar que o inseto foi morto pela ação do patógeno, os cadáveres a cada verificação diária eram desinfectados com lavagem em solução de hipoclorito de sódio à 2,5% (v/v) durante 3 minutos sob agitação moderada, depois lavados duas vezes em água destilada esterilizada, o excesso de água é absorvido em papel filtro esterilizado, e então estes eram transferidos para placas de Petri, contendo 20ml MC enriquecido de 1mg/ml de estreptomicina e incubada à 28°C até aparecimento ou não de estruturas do fungo. Inicialmente micélio e conídios, esta última indicativa da presença do patógeno em estudo.

Os cadáveres do tratamento testemunha sofreram o mesmo procedimento.

4. RESULTADOS

4.1. BIOENSAIOS

A cada 30 dias, durante o armazenamento dos conídios por um período de 180 dias, foram realizados os bioensaios segundo MESSIAS et al. (1986) com modificações.

Nos testes foram utilizados os conídios armazenados a -20°C com e sem glicerol para avaliar sua virulência. 25 insetos (ninfas de terceiro e quarto estágios) foram utilizados, para as doses: 2×10^2 ; 2×10^4 ; 2×10^6 ; 2×10^8 e 2×10^{10} conídios/ml de água destilada (esta última somente à partir do 90º dia).

No primeiro dia, quando os conídios ainda não haviam sofrido armazenamento à -20°C , foi realizado então o primeiro bioensaio, a viabilidade dos conídios nesse dia foi de: 96,20% para conídios formulados em glicerol e, 97,20% para conídios sem glicerol.

Nos demais bioensaios, a cada 30 dias, o mesmo procedimento foi seguido, resultando os seguintes valores para a viabilidade e TL_{50} :

TABELA I - Valores obtidos para viabilidade e LT50 nas diferentes doses para conídios da linhagem E9 de *M. anisopliae* armazenados à -20°C com e sem glicerol

Tempo de Armazenamento -20°C (Dias)	CG ou SG	Viabilidade (%)	Dose Conídios/ml	LT 50 (dias)	IC (Dias)	
					Inferior	Superior
Zero	SC	97,20	2×10^6	11,13	10,26	12,13
			2×10^8	5,30	4,80	5,83
	CG	96,20	2×10^6 2×10^8	10,70 4,98	9,65 4,41	11,98 5,55
30	SG	73,40	2×10^6	11,77	10,79	13,18
			2×10^8	8,16	7,23	9,42
	CG	84,40	2×10^6 2×10^8	12,07 6,81	10,77 6,22	14,06 7,43
60	SG	50,80	2×10^6	10,80	10,30	11,35
			2×10^8	9,48	8,93	10,08
	CG	68,60	2×10^6 2×10^8	12,97 7,41	11,74 6,52	14,80 7,46
90	SG	40,60	2×10^6	22,30	19,92	26,27
			2×10^8	9,58	8,96	10,38
			2×10^{10}	2,97	2,61	3,32
	CG	52,40	2×10^6	14,67	13,04	17,15
			2×10^8	7,90	7,10	8,84
			2×10^{10}	2,20	1,91	2,48
120	SG	35,60	2×10^6	23,48	21,37	26,58
			2×10^8	10,70	9,58	12,23
			2×10^{10}	3,71	3,44	3,96
	CG	45,80	2×10^6	21,50	18,93	26,23
			2×10^8	10,21	9,26	11,43
			2×10^{10}	2,56	2,23	2,88
150	SG	27,60	2×10^6	34,40	26,01	93,21
			2×10^8	14,86	13,38	16,94
			2×10^{10}	4,46	4,12	4,81
	CG	35,60	2×10^6	28,18	20,32	83,59
			2×10^8	12,47	11,76	13,22
			2×10^{10}	2,89	2,04	3,77
180	SG	20,60	2×10^6	52,68	34,82	272,33
			2×10^8	14,09	13,36	15,08
			2×10^{10}	6,23	5,60	6,88
	CG	30,20	2×10^6	113,58	54,18	824,50
			2×10^8	13,16	12,33	14,21
			2×10^{10}	4,45	3,69	5,33

CG - Conídios armazenados à -20°C em glicerol à 10%

SG - Conídios armazenados à -20°C sem glicerol

LT50 - Tempo Letal 50 (dias).

IC - Intervalo de Confiança (dias)

Os tempos letais 50 foram calculados segundo RUSSEL et al. (1977), programa POLO.

Os bioensaios à partir do 90º dia de armazenamento dos conídios, sofreram a adição de mais uma dosagem, a 2×10^{10} conídios/ml, isto ocorreu para a verificação de aumento da mortalidade, ou seja, a diminuição do tempo letal 50, o qual já estava se estendendo desde a realização do primeiro bioensaio, para as dosagens até então empregadas.

Os tempos letais 50 das dosagens 2×10^2 e 2×10^4 conídios/ml, não foram calculados devido à baixa mortalidade ocorrida nestes tratamentos.

Os valores contidos nas Tabelas I, II e III, representam os resultados dos cálculos estatísticos à partir de dados obtidos experimentalmente nos bioensaios; os quais se encontram no apêndice, demonstrados nas Tabelas de 1 a 7.

Na Tabela II, está contido o consumo de O_2 , indicando a dimensão da sequência de avaliação dos testes de respirometria e bioensaio durante o período de armazenamento.

TABELA II - Valores mensais de viabilidade, consumo de O₂, LT50 e LD50, para diferentes dosagens dos conídios da linhagem E9 de *M. anisopliae*, durante o armazenamento à -20°C com e sem glicerol.

	Viabilidade (%)		Consumo O ₂ (ul) 48h		Tempo Letal 50 (Dias)						Dose Letal 50 (Conídios/ml)			
					Com Glicerol			Sem Glicerol			DL 50 (CG)		DL 50 (SG)	
	CG	SG	CG	SG	10 ⁶	10 ⁸	10 ¹⁰	10 ⁶	10 ⁸	10 ¹⁰	10o. dia	12o. dia	10o. dia	12o. dia
0	96,2	97,2	2133	2350	10,7	5		11,1	5,3		2,9X10 ⁶	1,1X10 ⁶	1,7X10 ⁶	1,5X10 ⁶
30	84,4	73,4	1415	830	12,1	6,8		11,8	8,2		5,8X10 ⁶	2,9X10 ⁶	3,9X10 ⁶	5,4X10 ⁶
60	68,6	50,8	875	99	13	7,4		10,8	9,5		5,8X10 ⁶	2,9X10 ⁶	3,9X10 ⁷	3,9X10 ⁶
90	52,4	40,6	330	76	14,7	7,9	2,2	22,3	9,6	3	2,0X10 ⁷	6,9X10 ⁶	9,8X10 ⁷	4,1X10 ⁷
120	45,8	35,6	78	24	21,5	10,2	2,6	23,5	10,7	3,7	1,4X10 ⁷	3,1X10 ⁷	1,7X10 ⁸	4,4X10 ⁷
150	35,6	27,6	27	17	28,2	12,5	2,9	34,4	14,9	4,5	4,4X10 ⁸	2,9X10 ⁸	4,3X10 ⁸	2,0X10 ⁸
180	30	20,6	19	8	113,6	13,2	4,5	52,7	14,1	6,2	6,8X10 ⁸	2,1X10 ⁸	1,4X10 ⁹	3,0X10 ⁸

* Média de 3 repetições.

TABELA III - Valores de potência relativa entre o LT50 dos conídios armazenados com glicerol e o LT50 dos conídios armazenados sem glicerol.

Dias Armazenamento	POTÊNCIA RELATIVA		
	R_{10^6}	R_{10^8}	$R_{10^{10}}$
0	$R_{10^6} = 1,05$	$R_{10^8} = 1,03$	
30	$R_{10^6} = 1,06$	$R_{10^8} = 1,17$	
60	$R_{10^6} = 0,92$	$R_{10^8} = 1,47$	
90	$R_{10^6} = 1,66$	$R_{10^8} = 1,38$	$R_{10^{10}} = 1,35$
120	$R_{10^6} = 1,04$	$R_{10^8} = 1,09$	$R_{10^{10}} = 1,35$
150	$R_{10^6} = 1,50$	$R_{10^8} = 1,50$	$R_{10^{10}} = 1,52$
180	$R_{10^6} = 1,01$	$R_{10^8} = 1,15$	$R_{10^{10}} = 1,41$

4.2. RESPIROMETRIA

Os resultados de consumo O_2 da linhagem E_g foram obtidos através do respirômetro GILSON, num total de 48 horas de operação, com leituras em intervalos entre 4 e 6 horas.

4.2.1. Cálculo do Consumo de O_2 .

O respirômetro GILSON fornece diretamente os valores de consumo de O_2 em μl através de micrômetros. Para os cálculos do consumo esperado de O_2 e do consumo obtido de O_2 em $\mu moles$ conforme a Tabela IV, e comparação com os valores de glicose consumida também em $\mu moles$ (Tabela IV), foi considerada a equação de oxidação da glicose: $C_6 H_{12} O_6 + 6O_2 \rightarrow 6 CO_2 + 6 H_2O$, ou seja, que 6 moléculas de O_2 são utilizadas por unidade de glicose. Como cada molécula grama de O_2 é igual a 22,4l de O_2 , serão necessárias 134,4l para oxidação de 1 mol de glicose. Os valores obtidos representam a média de três repetições.

4.2.2. Valores de QO_2 .

Os valores de QO_2 (Tabela IV) representam o consumo de O_2 em $\mu l O_2/h/10^6$ conídios tomando-se a média de 48 horas no respirômetro Gilson. Os valores obtidos de QO_2 , também se encontram na Figura XII, onde a variação é ilustrada.

4.2.3. Glicose residual.

Foi utilizado o método de NORTON (1944), para a dosagem de glicose (descrito no item 3.1.3.).

A reta padrão foi feita com diferentes concentrações de glicose: 0,0050, 0,0250, 0,0500, 0,1500 e 0,3000 mg/ml. As leituras para a dosagem foram feitas em espectrofotômetro BECKMAN DU-

70, visível à 500,00 nm. A calibração foi feita com os reagentes de cobre A e cobre B juntamente com a solução se Arsenomolibdato e água destilada.

4.2.4. Consumo de Glicose.

A quantidade de glicose nos frascos de reação do respirômetro Gilson era conhecida, sendo necessário então, estimar a quantidade de açúcar consumida após 48 horas de experimentação; isto foi possível dosando-se a glicose residual (itens 4.2.1. e 4.2.3.).

Os resultados de consumo de glicose se encontram na Tabela IV e Figura XI, e representam a média de três repetições.

4.2.5. Assimilação oxidativa.

A porcentagem de assimilação oxidativa foi calculada através da relação:

$$\text{Assimilação oxidativa} = \frac{\text{Consumo } O_2 \text{ esperado} - \text{consumo } O_2 \text{ observado}}{\text{consumo } O_2 \text{ esperado}} \times 100$$

O consumo de O_2 esperado foi calculado assumindo-se que todo o açúcar consumido foi completamente oxidado a CO_2 e H_2O , ou seja: $C_6 H_{12} O_6 + 6 O_2 \rightarrow 6 CO_2 + 6 H_2O$.

Através desta reação, 6 moléculas de O_2 são necessárias para oxidar uma unidade de glicose; como se conhece a quantidade de glicose consumida, pode-se calcular o volume de O_2 para oxidação total do substrato.

Na Tabela IV encontram-se os resultados de assimilação oxidativa para cada ensaio no respirômetro Gilson, bem como a glicose consumida e o consumo de O_2 esperado e o obtido.

A Figura XI mostra a curva de consumo de glicose durante o armazenamento, nos ensaios de respirometria realizados.

4.2.6. Avaliação do Consumo de O_2 para Conídios Vivos e Mortos.

A Figura VII e a Tabela V mostram a relação de consumo de O_2 pelo respirômetro Gilson, quando conídios mortos e vivos conforme descrito no item 3.3.5.1. são dosados em diferentes proporções em mesmo substrato, num período de 48 horas. O meio de cultivo utilizado foi o mesmo que se usou para as demais experimentações.

Observa-se que na proporção de 50% entre mortos e vivos, a curva após 36 horas de experimento tende a interceptar a curva dos conídios 100% vivos.

TABELA IV - Valores mensais de consumo de glicose, consumo de O₂, quociente de O₂ e assimilação oxidativa obtidos a partir dos resultados obtidos nos testes de respirometria, para conídios da linhagem E9 de *M. anisopliae* armazenados com e sem glicerol, em meio basal adicionado de glicose.

	Glicose consumida (μ moles)		Consumo de O ₂ esperado (μ moles)		Consumo obtido de O ₂ (μ moles)		Peso seco (g)		Viabilidade (14h) %		Assimil. Oxid. (%)		QO ₂ μ l O ₂ /48/10 ⁶	
	CG	SG	CG	SG	CG	SG	CG	SG	CG	SG	CG	SG	CG	SG
Dia um	99.50	106.60	597.00	639.60	95.22	104.90	0.022	0.0201	96.20	97.20	84.05	83.60	44.44	48.96
30 dias	100.40	87.80	602.40	526.80	63.17	37.08	0.0206	0.0218	84.40	73.40	89.51	92.96	29.23	17.44
60 dias	98.50	85.50	591.00	513.00	39.08	2.83	0.0187	0.0201	68.60	50.80	93.39	99.45	18.23	2.06
90 dias	88.10	83.20	528.60	499.20	14.70	3.41	0.018	0.0175	52.40	40.60	97.22	99.32	6.88	1.58
120 dias	72.70	84.10	436.20	504.60	3.50	1.07	0.0144	0.0151	45.80	35.60	99.20	99.79	1.63	0.50
150 dias	65.10	69.30	390.60	415.80	1.19	0.74	0.0145	0.0154	35.60	27.60	99.70	99.82	0.56	0.35
180 dias	51.50	44.50	309.00	267.00	0.83	0.37	0.014	0.0103	30.00	20.60	99.73	99.86	0.40	0.17

Tempo de experimento: 48 horas

Temperatura: 28°C

Concentração de conídios por ml de meio basal -> 1×10^6 conídios

Meio basal com glicose.

* Média de 3 repetições.

TABELA V - Experimento de respirometria para conídios mortos e vivos da linhagem E9 de *M. anisopliae* avaliando-se as diferenças no consumo de O₂, variando-se a proporção entre estes.

	Consumo de O ₂ (μl)				QO ₂
	12h	24h	36h	48h	
100% vivos	72	614	1613	2286	47,63
90% vivos/10% mortos	56	576	1600	2216	40,15
50% vivos/50% mortos	23	244	1002	1927	46,17
10% vivos/90% mortos	4	11	64	221	4,60
100% mortos	0	0	0	0	0

Viabilidade de Conídios: 97,80%

Temperatura: 28 °C

Concentração dos conídios por ml: 1×10^6

* Média de 3 repetições.

FIGURA I - Consumo de O₂ da Linhagem E9 de *M. ansioptiae* sem sofrer armazenamento (dia um)

A - Conídios "CG" em meio basal + Glicose

Aa - Conídios "CG" em meio basal - Glicose

B - Conídios "SG" em meio basal + Glicose

Bb - Conídios "SG" em meio basal - Glicose

VIABILIDADE DOS CONÍDIOS:

CG = 97,20% [Conídios contendo (armazenados) Glicerol 10%]

SG = 97,20% [Conídios sem conter (armazenados) Glicerol]

Temperatura: 28°C

Concentração de Conídios por ml: 1×10^6

* Cada ponto representa a média de 3 repetições.

FIGURA II - Consumo de O₂ da Linhagem E9 de *M. anisopliae*, após armazenamento à -20°C por um período de 30 dias

A - Conídios "CG" em meio basal + Glicose

Aa - Conídios "CG" em meio basal - Glicose

B - Conídios "SG" em meio basal + Glicose

Bb - Conídios "SG" em meio basal - Glicose

VIABILIDADE DOS CONÍDIOS:

CG = 84,40% (Conídios armazenados à -20°C em Glicerol 10%)

SG = 73,40% (Conídios armazenados à -20°C sem Glicerol)

Temperatura: 28°C

Concentração de Conídios por ml: 1×10^6

* Cada ponto representa a média de 3 repetições

FIGURA III - Consumo de O₂ da Linhagem E9 de *M. anisopliae* após armazenamento à -20°C por um período de 60 dias.

A - Conídios "CG" em meio basal + Glicose

Aa - Conídios "CG" em meio basal - Glicose

B - Conídios "SG" em meio basal + Glicose

Bb - Conídios "SG" em meio basal - Glicose

VIABILIDADE DOS CONÍDIOS:

CG = 68,60% (Conídios armazenados à -20°C em Glicerol 10%)

SG = 50,80% (Conídios armazenados à -20°C sem Glicerol)

Temperatura: 28°C

Concentração de Conídios por ml: 1×10^6

* Cada ponto representa a média de 3 repetições.

FIGURA IV - Consumo de O₂ da Linhagem E9 de *M. anisopliae*, após armazenamento à -20°C por um período de 90 dias.

A - Conídios "CG" em meio basal + Glicose

Aa - Conídios "CG" em meio basal - Glicose

B - Conídios "SG" em meio basal + Glicose

Bb - Conídios "SG" em meio basal - Glicose

VIABILIDADE DOS CONÍDIOS:

CG = 52,40% (Conídios armazenados à -20°C em Glicerol 10%)

SG = 40,60% (Conídios armazenados à -20°C sem Glicerol)

Temperatura: 28°C

Concentração de Conídios por ml: 1×10^6

* Cada ponto representa a média de 3 repetições.

FIGURA V - Consumo de O₂ da linhagem E9 de *M. anisopliae*. após armazenamento à -20°C por um período de 120 dias.

A - Conídios "CG" em meio basal + Glicose

Aa - Conídios "CG" em meio basal - Glicose

B - Conídios "SG" em meio basal + Glicose

Bb - Conídios "SG" em meio basal - Glicose

VIABILIDADE DOS CONÍDIOS:

CG = 45,80% (Conídios armazenados à -20°C em Glicerol 10%)

SG = 35,60% (Conídios armazenados à -20°C sem Glicerol)

Temperatura: 28°C

Concentração de Conídios por ml: 1×10^6

* Cada ponto representa a média de 3 repetições.

FIGURA VI - Consumo de O₂ da Linhagem E9 de *M. anisopliae*, após armazenamento à -20°C por um período de 150 dias.

A - Conídios "CG" em meio basal + Glicose

Aa - Conídios "CG" em meio basal - Glicose

B - Conídios "SG" em meio basal + Glicose

Bb - Conídios "SG" em meio basal - Glicose

VIABILIDADE DOS CONÍDIOS:

CG = 35,60% (Conídios armazenados à -20°C em Glicerol 10%)

SG = 27,60% (Conídios armazenados à -20°C sem Glicerol)

Temperatura: 28°C

Concentração de Conídios por ml: 1×10^6

* Cada ponto representa a média de 3 repetições.

FIGURA - VII - Consumo de O₂ da Linhagem E9 de *M. anisopliae*. após armazenamento à -20°C por um período de 180 dias.

A - Conídios "CG" em meio basal + Glicose

Aa - Conídios "CG" em meio basal - Glicose

B - Conídios "SG" em meio basal + Glicose

Bb - Conídios "SG" em meio basal - Glicose

VIABILIDADE DOS CONÍDIOS:

CG = 30,00% (Conídios armazenados à -20°C em Glicerol 10%)

SG = 20,60% (Conídios armazenados à -20°C sem Glicerol)

Temperatura: 28°C

Concentração de Conídios por ml: 1×10^6

* Cada ponto representa a média de 3 repetições.

FIGURA VIII - Consumo comparativo de O₂ da Linhagem E9 de *M. anisopliae* variando-se a proporção entre Conídios vivos e mortos.

V - 100% Conídios vivos**

Vv - 90% Conídios vivos e 10% Conídios mortos**

M - 100% Conídios mortos**

Mm - 90% Conídios mortos e 10% Conídios vivos**

VM - 50% Conídios vivos e 50% Conídios mortos**

VIABILIDADE DOS CONÍDIOS: 97,80%

Temperatura: 28°C

Concentração dos Conídios vivos e mortos por ml: 1×10^6

* Cada ponto representa a média de 3 repetições.

** Meio basal com Glicose

FIGURA IX - Consumo comparativo de O₂ de conídios da Linhagem E9 de *M. anisopliae* armazenados à -20°C em glicerol à 10%, avaliado a cada 30 dias para medição do metabolismo exógeno, em meio basal adicionado de glicose.

- A - Dia um - Viabilidade: 96,20%
- B - 30 dias - Viabilidade: 84,40%
- C - 60 dias - Viabilidade: 68,60%
- D - 90 dias - Viabilidade: 52,40%
- E - 120 dias - Viabilidade: 45,80%
- F - 150 dias - Viabilidade: 35,60%
- G - 180 dias - Viabilidade: 30,20%

Temperatura: 28°C

Concentração de Conídios por ml: 1×10^6

* Cada ponto representa a média de 3 repetições.

FIGURA X - Consumo comparativo de O₂, de conídios da Linhagem E9 de *M. anisopliae* armazenados à -20°C sem glicerol, avaliado a cada 30 dias para medição do metabolismo exógeno, em meio basal adicionado de glicose.

- A - Dia um - Viabilidade: 97,20%
- B - 30 dias - Viabilidade: 73,40%
- C - 60 dias - Viabilidade: 50,80%
- D - 90 dias - Viabilidade: 40,60%
- E - 120 dias - Viabilidade: 35,60%
- F - 150 dias - Viabilidade: 27,60%
- G - 180 dias - Viabilidade - 20,60%

Temperatura: 28°C

Concentração de Conídios por ml: 1×10^6

* Cada ponto representa a média de 3 repetições.

FIGURA XI - Glicose consumida durante os experimentos de respirometria, para conídios da Linhagem E9 de *M. anisopliae* armazenados à -20°C com glicerol 10% e sem glicerol.

CG - conídios armazenados à -20°C em glicerol 10%

SG - conídios armazenados à -20°C sem glicerol

Concentração de conídios/ml = 1×10^6

* Cada ponto representa a média de 3 repetições.

FIGURA XII - Variação no quociente de oxigênio (QO₂), no período de 48 horas de corrida no respirômetro, durante os 180 dias de armazenamento, para conídios da linhagem E9 de *M. anisopliae* armazenados à -20°C com glicerol 10% e sem glicerol.

CG - conídios armazenados à -20°C em glicerol 10%
 SG - conídios armazenados à -20°C sem glicerol

* Cada ponto representa a média de 3 repetições.

FIGURA XIII - Variação da porcentagem de viabilidade dos conídios da Linhagem E9 de *M. anisopliae* armazenados à -20°C em glicerol à 10% e sem glicerol, durante o período de 180 dias.

CG - conídios armazenados à -20°C em glicerol 10%

SG - conídios armazenados à -20°C sem glicerol

* Cada ponto representa a média de 3 repetições.

5. DISCUSSÃO

5.1. ARMAZENAMENTO

Os resultados obtidos, mostram que os dois métodos empregados na preservação dos conídios, ou seja, conídios formulados em glicerol e não formulados, ambos associados à temperatura de -20°C , não são suficientes para a manutenção da capacidade germinativa integral dos conídios. O que pela Tabela II e IV pode ser visto, que aos 30 dias de armazenamento a viabilidade é reduzida em 12,17% para os conídios em glicerol e no mesmo período, uma redução de 24,87% para os conídios armazenados sem glicerol.

A queda da viabilidade se dá de forma mais acentuada até os 60 dias de armazenamento, e após este período a queda da viabilidade persiste, mas em níveis inferiores. Este comportamento face ao processo empregado, é indicativo da característica genética dos conídios provavelmente ligada as mitocôndrias, o que pode permitir esta variação, apesar destes pertencerem à uma mesma linhagem.

A viabilidade quando analisada em conjunto com os dados de respirometria, indica que no ponto em que a curva de viabilidade dos conídios cai com maior intensidade, é onde o consumo de O_2 se torna mais crítico, atingindo um menor nível. Também verifica-se que no ponto em que este começa a cair de forma intensa é quando ocorre o oposto para a viabilidade, passando a decrescer em menor porcentagem. Esta ocorrência quando do comportamento dos conídios nestas condições, é verificada também para os conídios armazenados sem glicerol, mostrando assim tratar-se de uma

característica própria do fungo; tendo o seu início já após os 30 dias de armazenamento. Com o glicerol, esta queda se torna mais intensa à partir do 90º dia.

A presença do glicerol realmente apresenta certo efeito na preservação dos conídios, no entanto, quando se depara com a literatura, vê-se que a porcentagem perdida em viabilidade pode acarretar certa dificuldade no aproveitamento destes conídios como finalidade de controle microbiano, pois a porcentagem de germinação deve se situar ao redor dos 85%, para se ter uma boa preparação, portanto, dessa forma ambos os métodos empregados seriam desencorajadores no momento.

O consumo de O_2 não é proporcional à viabilidade dos conídios, o que se verifica pelas Tabelas II e IV. A Tabela V, mostra o consumo de O_2 por uma combinação de conídios viáveis e não viáveis em proporções selecionadas, mostrando não existir proporcionalidade entre o número de conídios viáveis e o consumo de O_2 entre as mesmas porcentagens de viabilidades para o consumo de O_2 . Nas combinações verifica-se que este consumo às 48 horas é maior para aquelas combinações que apresentam menor número de conídios viáveis. Esta observação pode demonstrar que deve existir um número de conídios onde esta evolução poderá ser melhor avaliada em trabalhos futuros.

Numa comparação destes valores de viabilidade e consumo de O_2 verifica-se que os conídios armazenados com viabilidades semelhantes aos da Tabela II não consomem a mesma quantidade de O_2 no tempo de 48 horas, indicando que os conídios devem ter além de se tornado inviáveis, os viáveis devem conter injúrias que podem levá-los a germinar e que pode ser observado pelo aumento da fase de Lag, conforme Figura IX e X.

Estas variações vão de encontro à algumas das afirmações de OLSON & NOTTINGHAM (1980) dentre outras, citando que uma vez que o comportamento dos microrganismos é bastante diverso em relação ao congelamento, frequentemente serão constatadas alterações marcantes na morfologia e fisiologia dos mesmos, antes e após o armazenamento em baixas temperaturas. OLSON & NOTTINGHAM (1980) e NICKERSON & SINSKEY (1972), citam que o comportamento microbiano frente aos fatores extrínsecos, particularmente a temperatura ambiental, é muito variável, dessa forma a maior ou menor conservação de baixos níveis metabólicos nos microrganismos sob refrigeração e

congelamento, é alcançada principalmente pela extensão do período de fase de ajuste ou "Lag Fase" e do tempo de geração dilatado.

Baseando-se nestas afirmações, pode-se assumir a possibilidade de que a viabilidade dos conídios simplesmente não serve como parâmetro de avaliação, pois, estas estruturas podem estar metabolicamente preservadas mas a sua capacidade germinativa necessita de uma fase extra de adaptação para se expressar frente aos substrato imposto na ocasião, refletindo-se numa "Lag Fase" dilatada; entretanto, este fato não reflete necessariamente a perda do seu vigor entomopatogênico.

HURST (1977), também cita vários fatores capazes de provocar a injúria microbiana, dentre eles o congelamento, onde uma das alterações características do fenômeno da injúria, é o aumento da fase Lag dentre outras. Muitas vezes os microrganismos injuriados, por qualquer que seja a adversidade sofrida, podem ser recuperados satisfatoriamente, isto dependendo do propósito objetivado ou do estudo a que se quer desenvolver. No caso de fungos entomopatogênicos, como *M. anisopliae* esta injúria quando refletida na expressão da virulência, como ficou demonstrada no presente estudo torna este processo de armazenamento inviável. Uma vez como se depara com Tabela II a dose para refletir a mesma LT_{50} teve que ser aumentada 100 vezes.

5.2. VIABILIDADE E TEMPO LETAL.

Quanto a virulência verifica-se uma proporcionalidade entre a viabilidade, o tempo e dose letais, notando-se aí, uma tendência de melhor preservação das características entomopatogênicas, nos conídios armazenados em glicerol em relação aos não assim armazenados, conforme a Tabela II. Os valores de potência relativa, com relação aos tempos letais 50, mostram essa tendência de maior virulência com relação aos conídios sem glicerol.

O aumento na fase Lag juntamente com os dados de viabilidade podem ser indicativos da capacidade efetiva dos conídios em causar a mortalidade esperada nos hospedeiros. Estudos futuros poderão ser realizados para se verificar a importância desta característica nos LT_{50} ou LD_{50} finais. Onde a junção dos valores de variação da fase Lag e da viabilidade tomada em diferentes

tempos, poderão ser indicativo do acréscimo de dose para manter a resposta de virulência quando comparada pelo tempo letal.

Assim, fica evidente a necessidade de se estabelecer uma relação entre o QO_2 , indicativo do vigor do conídio armazenado, uma vez que reflete sua capacidade em consumo de O_2 e utilização de glicose, fatores diretamente relacionados à germinação e a possibilidade de penetrar a cutícula do hospedeiro; pois esta energia é necessária para a biossíntese de proteínas, algumas responsáveis pela penetração.

6. CONCLUSÃO

- I. O glicerol como crioprotetor não satisfaz plenamente quanto a manutenção da viabilidade dos conídios.
- II. Os métodos empregados, não preservam a capacidade de assimilação de O_2 de maneira eficiente.
- III. Verifica-se pelo consumo em QO_2 , que existe uma indicação de variação no nível fisiológico dos conídios conservados sob os dois métodos.
- IV. A viabilidade dos conídios isoladamente não expressa a sua capacidade entomopatogênica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, N.T.O. Variabilidade em linhagens de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsch.) SOROKIN quanto a germinação de conídios, conteúdo proteico, atividade enzimática. Campinas, 1991. 163p. (Doutorado - Universidade Estadual de Campinas).
- AL-AIDROOS, K. Demonstration of a parasexual cycle in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal of Genetic Cytology*, **22**: 309-314. 1980.
- AL-AIDROOS, K & ROBERTS, D.W. Mutantes of *Metarhizium anisopliae* with increased virulence toward mosquito larvae. *Canadian Journal of Genetic Cytology*, **22**: 211 - 212. 1978.
- ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. IN: , coord. CONTROLE MICROBIANO DE INSETOS. São Paulo, Manole, p. 73-126. 1986.
- ALVES, S. B.; SILVEIRA NETO, S.; PEREIRA, R. M.; MACEDO, N. Estudo de formulação do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) SOROKIN em diferentes condições de armazenamento. *Ecosistema*, Espírito Santo do Pinhal, **12**: 78-87. 1987.
- AQUINO, M. L. N.; CAVALCANTI, A. L. B.; SENA, R. C.; QUEIROZ, G. F. Nova Tecnologia de Multiplicação do Fungo *Metarhizium anisopliae*. *Boletim Técnico da CODECAP*, Recife, **4**: 1 - 31. 1975.
- AQUINO, M.L.N.; VITAL, A.F.; CAVALCANTE, V.L.B. & NASCIMENTO, M. G. Cultura de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) SOROKIN em sacos de polipropileno. *Boletim Técnico da CODECAP*, Recife, **5**: 7-11. 1977.
- BACILA, M. Curso de Fisiologia de Microrganismos, Tomo II. Curitiba, Universidade Federal do Paraná, 1960, p. 209.
- BAGALHI, E. Parameiose em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) SOROKIN. Piracicaba, 1987. 123 p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz" - USP).

- BALFOUR-BROWNE, F.L. The green muscardine diseases of insects with special reference to an epidemic in a swarm of Locusts in ERITREA. **Proceeding of Royal Entomological Society of London**, **12**: 1298 - 1301. 1960.
- BARNES, G. L.; BOETHEL, D. J.; EIKENBARY, R. D.; CRISWELL, J. T.; GENTRY, C. R. Growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on media containing various peptone sources. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York **25**: 301-305. 1975.
- BARNHART, E. R. & TERRY, C. E. Cryobiology of *Neurospora crassa*. I. Freeze response of *Neurospora crassa* conidia. **Cryobiology**, **8**: 323 - 327. 1971.
- BARNHART, E. R. & TERRY, C. E. Cryobiology of *Neurospora crassa*. II. Alteration in freeze response of *Neurospora crassa* conidia by additives. **Cryobiology**, **8**: 328 - 332. 1971.
- BASTOS, C. N. & MATTA, E. A. F. Influência da temperatura e luz na esporulação do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) SOROKIN. Instituto Biológico Bahia - Salvador **15**: 5 - 8. 1976.
- BELL, J. V. & HAMALLE, R. J. Viability and pathogenicity of entomopatogenous fungi after prolonged storage on silica gel at -20° C. **Canadian Journal of Micobiology**, **20**: 639 -642. 1974.
- BRAGA, G.U.L. Variabilidade e Estimativas de Parâmetros Genéticos da Produção de Proteases em *M. anisopliae* (Metsch.) SOROKIN. Piracicaba, 1992., 84p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz"/USP).
- CAMPBELL, R.K.; PERRING, T.M.; BARNES, G.L.; EIKENBARY, R. D. & GENTRY, C. R. Growth and sporulation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on media containing various amino. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **31**(3): 289 - 295. 1978.
- CHAIA, G. Atlas de Parasitologia. São Paulo, Ed. Johnson & Johnson S.A.. 1975. 93p.

- CHEUNG, P.Y.K. & GRULA, E.A. In vivo events associated with entomopathology of *Beauveria bassiana* for the corn earworm (*Heliothis zea*). **Journal of Invertebrate Pathology**, New York **39**: 303 - 313, 1982.
- CLERCK, G. C. & MADELIN, M. F. The longevity of conidia of three insect-parasitizing hyphomycetes. **Transactions of British Mycological Society**, **48** (2): 193 - 209, 1965.
- COCHRANE, V.W. Physiology of fungi. New York, John Wiley & Sons, ed., 1958. 524p.
- COUCH, T.L. & IGNOFFO, C.M. Formulation of insect pathogen. In: BURGESS, H.D., ed. Microbial Control of Pests and Plant Diseases. 1970 - 1980. New York, Academic Press. 1981, p. 621 - 634.
- DAOUST, R. A.; WARD, M. G.; ROBERTS, D. W. Effect of formulation on the virulence of *Metarhizium anisopliae* conidia against mosquito larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **40**: 228 - 236. 1982.
- DAOUST, R. A.; WARD, M. G.; ROBERTS, D. W. Effect of formulation on the viability of *Metarhizium anisopliae* conidia. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **41**: 151 - 160. 1982.
- DAOUST, R. A. & ROBERTS, D. W. Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia. Effect of temperature and relative humidity on conidial survival and virulence against mosquitoes. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **41**: 143 - 150. 1983a.
- DAOUST, R. A. & ROBERTS, D. W. Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia. Effect of growth substrate on conidial survival and virulence against mosquitoes. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **41**: 161 - 170. 1983b.
- DARBY, R. T. & GODDARD, D. R. Studies of the respiration of the mycelium of the fungus *Myrothecium verrucaria*. **American Journal of Botany**, **87**: 379 - 387. 1950.

- DOEBBLER, G. F. Cryoprotective compounds. Review and Discussion of Structure and Function. **Cryobiology**, 3: 1, 2 - 11. 1966.
- FARGUES, J.; DURIEZ, T.; ANDRIEV, S.; POPEYE, R. & ROBERT, P. Étude immunologique comparée de souches de *Metarhizium anisopliae* (DELACR.) sien champignon hyphomycète entomopathogène. **Comptes Rendus Hebdomadaires de Séances Del' Academie des Sciences**, Paris (Sér. D), 281: 1781- 1784, 1975.
- FARGUES, J.; ROBERT, P. H. & VEY, A. Effect des dextruxines A, B et E dans la pathogénese de *Metarhizium anisopliae* chez les larves de coleopteres scarabeidae. **Entomophaga**, 30 (4): 353 - 364. 1985
- FERNANDES, P. M. Controle Microbiano de *Cornitermes cumulans* (KOLLAR, 1932) (ISOPTERA - TERMITIDAE) utilizando *Beauveria bassiana* (BALS.) Vuil. e *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROKIN. Piracicaba, 1991. 114p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz"/USP).
- FERRON, P. Biological control of insect pest by entomogenous fungi. **Annual Review Entomological Society**, Stanford, 23: 409 - 442. 1978.
- FUXA, J.R. & TANADA, Y. IN: Epizootiology of insects diseases. Cap. 5. The Pathogen Population, TANADA, Y. & FUXA, J.R. Eds. John Willey & Sons, USA. 1987.
- GILSON, W. E. Differential respirometer of symplified and improved design. **Science**, 141: 531 - 532, 1963.
- HORII, J. Contribuição ao estudo do metabolismo da glicose em *Saccharomyces carlsbergensis* Hansen. Piracicaba, 1972. 86p (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz"/USP.).
- HURST, A. Bacterial injury: A review. **Canadian Journal of Microbiology**, 23: 935-944, 1977.
- HURST, A. Injury and its effect on survival and recovery, IN: Microbial Ecology of Foods, Vol. I - Factors affecting life and death of microorganisms (ICMSF, ed.) Academic Press, New York, pp. 205-214. 1980.

- KAIJIANG, L. & ROBERTS, D. W. The production of destruxins by the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* var. major. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **47**: 120 - 122, 1986.
- KUCERA, M. Partial purification and properties of *Galleria melonella* larvae proteolytic inhibitors acting on *Metarhizium anisopliae* toxic protease. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **43**: 190-196, 1984.
- LATCH, G. C. M. *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) SOROKIN strains in New Zealand and their possible use for controlling pasture inhabiting insects. **Journal of Agricultural Research**, New Zealand, **8**: 384 - 396, 1965.
- LAWTON, J. H. & RICHARDS, J. Comparability of cartesian Dives, Gilson, Warburg and Winkles. Methods of measuring the respiratory rates of aquatic invertebrates ecological studies. **Oecologia (Berl.)** **4**: 319 - 329, 1969.
- LEITE, B. & MESSIAS, C. L. Atividade enzimática para linhagens de *Metarhizium anisopliae*. **Ciência e Cultura**, **36**: 814, 1984.
- LEITE, B. Variabilidade de linhagens de *Metarhizium anisopliae*, quanto a atividade enzimática, resistência à luz ultra-violeta e virulência ao vetor da doença de Chagas *Panstrongylus megistus*. Campinas, 1987. 139p. (Mestrado - Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP).
- LI, DONG PING & HOLDON, D. G. Effects of carbon and nitrogen sources and vitamins on germination, growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) SOROKIN (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **V TH International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control**. Adelaide, Austrália, August 20 - 24, 1990, 154p.
- LIDDEL, G. U. & WRIGHT, B. E. The effect of glucose on respiration of the differentiating. Slime mold. **Developmental Biology**, **3**: 265 - 276, 1961.
- LUGLI, J. Parassexualidade e produção de destruxinas em linhagens de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsch.) SOROKIN. Campinas, 1987. 115p. (Mestrado - Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP).

- LUNA, E.A. **Características citológicas e genéticas de linhagens selvagens, mutantes e diplóides de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) SOROKIN.** Rio de Janeiro, 1985. 260p. (Doutorado - Universidade Federal do Rio de Janeiro).
- LUNA, E.A. & AZEVEDO, J. L. Obtenção de possíveis diplóides entre linhagens de *Metarhizium anisopliae*. IN: Reunião Anual da SBPC, 37, Belo Horizonte. **Resumos Ciência e Cultura**, São Paulo, 37(7): 721, 1985.
- MADELIN, M. F. Fungal parasites of insects. **Annual Review of Entomology**, 11: 423 - 448, 1966.
- MARQUES, E. J.; VILLAS BOAS, A. M.; PEREIRA, C. E. F. Orientações técnicas para a produção do fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) SOROKIN em laboratórios setoriais. **Boletim Técnico do PLANALÇÚCAR**, Piracicaba, 3: 1 - 23, 1981.
- MESSIAS, C. L. **Parassexualidade em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) SOROKIN.** Piracicaba, 1979. 73p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz" - USP).
- MESSIAS, C. L. & AZEVEDO, J. L. Parassexuality in the deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. **Transactions of British Mycological Society**, 75: 473 - 477, 1980.
- MESSIAS, C.L.; DAOUST, R.A.; ROBERTS, D.W. Virulence of a natural isolate, auxotrophic mutants and a diploid of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* to *Rhodnius prolixus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, 47: 231-233. 1986.
- MESSIAS, C. L. Fungos, sua utilização para controle de insetos praga de importância médica e agrícola. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 84: 57 - 59, 1989.

- MESSIAS, C. L. & PUPIN, A. M. The cuticular componentes from *Diatraea saccharalis* and their effect on "in vitro" growth of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **VTH International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control**, Adelaide, Austrália, August 20 - 24, 1990, p. 315.
- MORI, Y., SUZUKI, H.; TOKIO, N. Freezing injury in the yeast respiratory system. **Cryobiology**, **23**: 64-71. 1986.
- MORRIS, J.G. Físico-química para biólogos. São Paulo, Universidade de São Paulo, ed., 1972. 450p.
- NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, **153**: 375 - 380, 1944.
- NICKERSON, J.T. & SINSKEY, A.J. **Microbiology of foods and food processing**, New York, American Elsevier Publishing Company, 1972.
- OLSON JR., J.C. & NOTTINGHAM, P.M. Temperature. IN: **Microbial Ecology of foods**, Vol. I - Factors affecting life and death of microorganisms (ICMSF, ed.), Academic Press, New York, pp. 1-37. 1980.
- PARIS, S. & FERRON, P. Study of the virulence some mutants of *Beauveria brongniartii* (= *Beauveria tenella*). **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **34**: 71 - 77, 1979.
- PEKRUL, S. & GRULA, E. A. Mode of infection of the corn earworm (*Heliothis zea*) by *Beauveria bassiana* as reaveled by scanning electron microscopy. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York. **34**: 238 - 247. 1979.
- POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A.S. Revival of spermatozoa after nitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, London, **164**: 666, 1949.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMMONS, L. M.; MACDONALD, K. D.; BUFTON, A. W. J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, **5**: 141 - 238, 1953.

RANGEL, D. E. N.; MESSIAS, C. L. & PIEDRABUENA, A. E. Virulência de *Metarhizium anisopliae* a insetos vetores da Doença de Chagas. **Boletim do Grupo de Pesquisadores de Controle Biológico**, 6: 18, 1986.

REY, L. Parasitologia. Rio de Janeiro, ed. Guanabara Koogan S.A., 1973, 695p.

ROBERTS, D.W. Toxins from the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. I. Production in submerged and surface cultures, and an inorganic and organic nitrogen media. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, 8: 212 - 221, 1966.

ROBERTS, D.W. Toxins from the entomopatogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. II. Symptoms and detection in moribund hosts. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, 8: 222-227, 1966a.

ROBERTS, D.W. Toxins from the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*: Isolation of destruxins from submerged cultures. **Journal Invertebrate Pathology**, New York, 14: 82 - 88, 1969.

ROBERTS, D. W. & YENDOL, W. G. Use of fungi for microbial control of insects. IN: BURGER, H. D. & HUSSEY, N. W. eds. **Microbial Control of Insects and Mites**. London, Academic Press, Cap. 5: 125 - 149, 1971.

ROBERTS, D. W. World picture of biological control of insects by fungi. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 84, Supl. III, 89 - 100, 1989.

ROBINSON, P.M. Practical fungal physiology, Belfast, John Wiley & Sons Ltd. Ed., 1978. 123 p.

ROSATO, Y. B. **Análise Genética e Respirometria em mutantes compactos de *Aspergillus nidulans***. Piracicaba, 1977, 152 p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz"/ USP).

ROSATO, Y.B.; MESSIAS, C. L.; AZEVEDO, J. L. Production of extracellular enzymes by isolates of *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, 38: 1 - 3, 1981.

- ROWE, A. W. Biochemical aspects of cryoprotective agents in freezing and thawing. *Cryobiology*, **3**: 12 - 18, 1966.
- RUSSEL, R.M.; ROBERTSON, J.L. & SAVIN, N.E. POLO: A new computer program for probit analysis. *Entomological Society American Bulletin*, **23**(3): 209 - 213, 1977.
- SAMUELS, K. K. Z.; HEALE, J. B.; LEWELLYN, M. Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparva lugens*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, **53**: 25 - 31, 1989.
- SANTOS, A.L.L. Influência de alguns fatores no crescimento, germinação e produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) SOROKIN. Piracicaba, 1978, 148p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz"/ USP).
- SCHABEL, H.G. Percutaneous infection of *Hylobius pale* by *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, **31**: 180 - 187, 1978.
- SHANTINATH, I.; WAKLEY, G.; STEBBINGS, H. Effects of glycerol and freezing on the appearance and arrangement of microtubules in three different systems: a freeze - substitution study. *Tissue & Cell*, **18**(3): 331 - 339, 1986.
- SHERLOCK, I. A. & GUITTON, N. Observações sobre a ação do fungo *Metarhizium anisopliae* Metschnikoff sobre algumas espécies de triatominae (Hemiptera: reduviidae). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **24**: 234 - 239, 1982.
- SHU, P. & THORN, J. A. Carbon and oxidation-reduction balance and the estimation of fermentation efficiencies of aerobic fermentations. *Canadian Journal of Botany*, **30**: 252 - 265, 1951.
- SILVA, J.C.; MESSIAS, C.L. & PIEDRABUENA, A.E. Virulência de alguns mutantes de *Metarhizium anisopliae* em *Rhodnius prolixus*. *Ciência e Cultura*, **35**: 703, 1983.
- SILVA, J.C. Virulência de mutantes exoenzimáticos de *Metarhizium anisopliae* e seus revertentes a *Rhodnius prolixus*. Campinas, 1985. 161p. (Doutorado - Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP).

- SILVA, J. C.; MESSIAS, C. L. Virulência de mutantes e revertentes de exoenzimas de *Metarhizium anisopliae* em *Rhodnius prolixus*. **Ciência e Cultura**, São Paulo, **38**: 814, 1984b.
- SILVA, J. C. & MESSIAS, C. L. Virulence of mutants and revertents of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* toward *Rhodnius prolixus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **48**: 368 - 374, 1986.
- SILVEIRA, W.D. Obtenção e fusão de protoplastos em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) SOROKIN. Piracicaba, 1983. 153p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz"/USP)
- St.LEGER, R. J.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R. M. Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticles. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **47**: 295 - 302, 1986c.
- St.LEGER, R. J.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R.M. Kinetics of the digestion of insect cuticles by a protease (Pr1) from *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **57**: 146 - 147, 1992.
- St.LEGER, R.J.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. Entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Aspergillus flavus* produce multiple extracellular chitinase isozymes. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **61**: 81 - 84, 1993.
- TINLINE, R.D. & NOVIELLO, C. Heterokaryosis in the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. **Mycologia**, **63**: 701-712, 1971.
- TULLOCH, M. The genus *Metarhizium*. **Transactions of the British Mycological Society**, **66**: 407-411, 1976.
- UMBREIT, W.W.; BURRIS, R.H.; STAUFFER, J.F.W. Manometric and Biochemical Techniques, 5th ed. Minneapolis: BURGESS Publ. Co., 387p., 1972.
- VEEN, K. H. Recherches sur la maladie, due à *Metarhizium anisopliae* chez le criquet pèlerin. **Mendelingen Landbouwhogeschool**, Wageningen, **68**: 1 - 77, 1968.

- VILLACORTA, A. Efeito da temperatura e da nutrição sobre o desenvolvimento de vários isolamentos de *Metarhizium anisopliae* Sorokin. **Resumos do III Congresso Latino-americano de Entomologia e V Congresso Brasileiro de Entomologia**, Bahia, 1978. p.70.
- WALSTAD, J.D.; ANDERSON, R.F.; TAMBAUCH, W.J.S. Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*) **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **16**: 221 - 226, 1970.
- WIGHTMAN, J. A. Respirometry techniques for terrestrial invertebrates and their application to energetics studies. **New Zealand Journal of Zoology**, **4**: 453 - 469, 1977.
- ZACHARUCK, R.Y. Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larvae elateridae (Coleoptera). I. Dormant and germinating conidia. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **15**: 63 - 80, 1970a.
- ZACHARUCK, R.Y. Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larvae elateridae (Coleoptera). II. Conidial germ tubes and apressoria. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **15**: 81 - 91, 1970b.
- ZACHARUCK, R.Y. Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larvae elateridae (Coleoptera). III. Penetration of the host integument. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **15**: 372 - 396, 1970c.
- ZACHARUCK, R.Y. Penetration of the cuticular layers of elateridae larvae (Coleoptera) by the fungus *Metarhizium anisopliae* and notes on a bacterial invasion. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **21**: 101 - 106, 1973.

APÊNDICE

Tabelas 1 a 7, representam os dados obtidos nos bioensaios, os quais foram utilizados para cálculos de LT_{50} e LD_{50} .

TABELA 1 - BIOENSAIO : *Metarhizium anisopliae* (Linhagem E9) x *Panstrongylus megistus* (hospedeiro).
Conídios sem sofrer armazenamento

Dias de Leitura	Insetos tratados com Conídios sem Glicerol											
	Dose											
	2X10 ⁴		2X10 ⁶		2X10 ⁸		2X10 ⁶		2X10 ⁸		2X10 ⁸	
	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V
1	*1	24	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25
2	0	24	0	25	0	25	1	24	1	24	1	24
3	0	24	1	24	1	24	4	20	4	20	4	20
4	0	24	2	22	2	22	4	16	4	16	4	16
5	1	23	1	21	1	21	4	12	4	12	4	12
6	1	22	*1	20	*1	20	1	11	1	11	1	11
7	0	22	1	19	1	19	1	10	1	10	1	10
8	1	21	4	15	4	15	3	7	3	7	3	7
9	0	21	1	14	1	14	2	5	2	5	2	5
10	1	20	3	11	3	11	2	3	2	3	2	3
11	0	20	*1	10	*1	10	0	3	0	3	0	3
12	0	20	1	9	1	9	0	3	0	3	0	3
13	0	20	2	7	2	7	*1	2	*1	2	*1	2
14	0	20	*1	6	*1	6	0	2	0	2	0	2
15	0	20	0	6	0	6	0	2	0	2	0	2
16	0	20	0	6	0	6	0	2	0	2	0	2
17	1	19	0	6	0	6	0	2	0	2	0	2
18	*1	18	2	4	2	4	0	2	0	2	0	2
19	*1	17	1	3	1	3	0	2	0	2	0	2
20	0	17	0	3	0	3	0	2	0	2	0	2
21	0	17	0	3	0	3	0	2	0	2	0	2
22	0	17	0	3	0	3	0	2	0	2	0	2
23	0	17	*1	2	*1	2	0	2	0	2	0	2
24	1	16	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2
25	0	16	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2

Insetos tratados com Canídios contendo Glicerol									
Dose									
2X10 ⁴			2X10 ⁶			2X10 ⁸			
M	V		M	V		M	V		
0	25		1	24		1	24		
0	25		0	24		1	23		
0	25		0	24		5	18		
0	25		0	24		3	15		
0	25		4	20		3	12		
1	24		1	19		2	10		
0	24		1	18		1	9		
*1	23		1	17		3	6		
0	23		1	16		1	5		
1	22		4	12		0	5		
1	21		*1	11		0	5		
2	19		0	11		1	4		
*1	18		2	9		0	4		
0	18		0	9		2	2		
*1	17		3	6		*1	1		
0	17		0	6		0	1		
0	17		*1	5		0	1		
0	17		1	4		0	1		
0	17		0	4		0	1		
0	17		0	4		0	1		
1	16		0	4		0	1		
*1	15		0	4		0	1		
0	15		0	4		0	1		
*1	14		0	4		0	1		
0	14		0	4		0	1		

[illegible]

Viabilidade : SG = 97,20% (SG = Conídios contendo glicerol à 10%)

CG = 96,20%
(CG = Confídeos puros, sem glicerol)

Números de insetos por tratamento : 25

Dose: Número de conídios/ml de água destilada.

Período de leitura: diário

Tempo de exposição à dose: 30 minutos

* Morte por causa desconhecida

*** Cada ponto representa a média de 3 repetições.

TABELA 2 - BIOENSAIO : *Metarhizium anisopliae* (Linhagem E9) x *Panstrongylus megistus* (hospedeiro).

Dias de Leitura	Insetos tratados com Conídios Armazenados sem Glicerol à -20°C/30 dias												Insetos tratados com Conídios Armazenados com Glicerol à -20°C/30 dias												Insetos sem Tratamento com Conídios	
	Dose 2X10 ⁴						Dose 2X10 ⁶						Dose 2X10 ⁸													
	2X10 ⁴		2X10 ⁶		2X10 ⁸		2X10 ⁴		2X10 ⁶		2X10 ⁸		2X10 ⁴		2X10 ⁶		2X10 ⁸									
	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V								
1	0	25	0	25	1	24	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25								
2	0	25	0	25	1	23	0	25	1	24	2	23	0	25	2	23	0	25								
3	0	25	1	24	1	22	0	25	0	24	2	21	0	25	2	21	0	25								
4	0	25	0	25	1	21	0	25	1	23	1	20	0	25	1	20	0	25								
5	0	25	0	24	2	19	0	25	1	22	1	19	0	25	1	19	0	25								
6	0	25	1	23	2	17	0	25	0	22	2	17	0	25	2	17	0	25								
7	0	25	1	22	2	15	0	25	1	21	3	14	0	25	3	14	0	25								
8	0	25	4	18	2	13	1	24	2	19	3	11	0	25	3	11	0	25								
9	0	25	2	16	1	12	1	23	3	16	2	9	0	25	2	9	0	25								
10	0	25	*2	14	2	10	0	23	2	14	3	6	0	25	3	6	0	25								
11	0	25	3	11	2	8	0	23	1	13	2	4	0	25	2	4	0	25								
12	1	24	1	10	2	6	0	23	1	12	*1	3	0	24	*1	3	0	24								
13	0	24	1	9	*1	5	0	23	3*2	9	1	2	1	0	1	2	1	23								
14	0	24	2	7	*1	4	0	23	1	8	0	2	1	1	1	2	1	22								
15	0	24	0	7	0	4	1	22	0	8	0	2	0	0	0	2	0	22								
16	0	24	0	7	0	4	0	22	0	8	0	2	0	0	0	2	0	22								
17	0	24	0	7	0	4	0	22	0	8	0	2	0	0	0	2	0	22								
18	0	24	0	7	0	4	0	22	0	8	0	2	0	0	0	2	0	22								
19	0	24	0	7	0	4	0	22	0	8	0	2	0	0	0	2	0	22								
20	0	24	0	7	0	4	0	22	0	8	0	2	0	0	0	2	0	22								
21	0	24	0	7	0	4	0	22	0	8	0	2	0	0	0	2	0	22								
22	*1	23	0	7	0	4	*1	22	0	8	0	2	0	0	0	2	0	22								
23	*1	22	0	7	0	4	*1	22	0	8	0	2	0	0	0	2	0	22								
24	0	22	0	7	0	4	0	22	0	8	0	2	0	0	0	2	0	22								
25	0	22	0	7	0	4	0	21	*1	7	0	2	*1	1	0	2	0	22								

Viabilidade : SG = 73,40% (SG = Conídios contendo glicerol à 10%)

CG = 84,40% (CG = Conídios puros, sem glicerol)

Números de insetos por tratamento : 25

Dose: Número de conídios/ml de água destilada.

Período de leitura: diário

Tempo de exposição à dose: 30 minutos

*Morte por causa desconhecida.

** Cada ponto representa a média de 3 repetições.

TABELA 3 - BIOENSAIO : *Metarhizium anisopliae* (Linhagem E9) x *Panstrongylus megistus* (hospedeiro).

Dias de Leitura	Insetos tratados com Conídios Armazenados sem Glicerol à -20°C/60 dias										Insetos tratados com Conídios Armazenados com Glicerol à -20°C/60 dias										Insetos sem Tratamento com Conídios	
	2X10 ⁴					Dose 2X10 ⁶					2X10 ⁴					Dose 2X10 ⁶					Testemunha	
	M					V					M					V					M	V
	0	25	25	25	25	0	25	25	25	25	0	25	25	25	25	0	25	25	25	25	0	25
1	0	25	25	25	25	0	25	25	25	25	0	25	25	25	25	0	25	25	25	25	0	25
2	0	25	25	25	25	0	25	25	25	25	0	25	25	25	25	0	25	25	25	25	0	25
3	0	25	25	25	25	0	25	25	25	25	0	25	25	25	25	0	25	25	25	25	0	25
4	0	25	25	25	25	0	25	25	25	25	0	25	25	25	25	0	25	25	25	25	0	25
5	0	25	25	25	25	0	25	25	25	25	0	25	25	25	25	0	25	25	25	25	0	25
6	0	25	25	25	25	0	25	25	25	25	0	25	25	25	25	0	25	25	25	25	0	25
7	0	25	25	25	25	0	25	25	25	25	0	25	25	25	25	0	25	25	25	25	0	25
8	1	24	24	24	24	4	20	17	11	1	1	24	24	24	24	2	22	20	17	14	*1	24
9	0	24	24	24	24	3	17	11	8	2	2	25	25	25	25	2	20	19	14	7	0	24
10	0	24	24	24	24	6*3	11	8	2	2	2	25	25	25	25	2	20	19	14	7	0	24
11	0	24	24	24	24	3*2	8	2	2	2	2	25	25	25	25	2	20	19	14	7	0	24
12	1	23	23	23	23	6	2	2	2	2	2	25	25	25	25	2	20	19	14	7	0	24
13	0	23	23	23	23	0	2	2	2	2	2	25	25	25	25	2	20	19	14	7	0	24
14	0	23	23	23	23	1	1	0	0	0	0	25	25	25	25	2	20	19	14	7	0	24
15	0	23	23	23	23	1	0	0	0	0	0	25	25	25	25	2	20	19	14	7	0	24
16	*1	22	22	22	22	0	0	0	0	0	0	25	25	25	25	2	20	19	14	7	0	24
17	0	22	22	22	22	0	0	0	0	0	0	25	25	25	25	2	20	19	14	7	0	24
18	0	22	22	22	22	0	0	0	0	0	0	25	25	25	25	2	20	19	14	7	0	24
19	0	22	22	22	22	0	0	0	0	0	0	25	25	25	25	2	20	19	14	7	0	24
20	0	22	22	22	22	0	0	0	0	0	0	25	25	25	25	2	20	19	14	7	0	24
21	0	22	22	22	22	0	0	0	0	0	0	25	25	25	25	2	20	19	14	7	0	24
22	0	22	22	22	22	0	0	0	0	0	0	25	25	25	25	2	20	19	14	7	0	24
23	0	22	22	22	22	0	0	0	0	0	0	25	25	25	25	2	20	19	14	7	0	24
24	0	22	22	22	22	0	0	0	0	0	0	25	25	25	25	2	20	19	14	7	0	24
25	0	22	22	22	22	0	0	0	0	0	0	25	25	25	25	2	20	19	14	7	0	24

Viabilidade : SG = 50,80% (SG = Conídios contendo glicerol à 10%)

CG = 68,60% (CG = Conídios puros, sem glicerol)

Números de insetos por tratamento : 25

Dose: Número de conídios/ml de água destilada.

Período de leitura: diário

Tempo de exposição à dose: 30 minutos

* Morte por causa desconhecida.

** Cada ponto representa a média de 3 repetições.

TABELA 5 - BIOENSAIO : *Metarhizium anisopliae* (Linhagem E9) x *Panstrongylus megistus* (hospedeiro).

Dias de Leitura	Insetos tratados com Conídios Armazenados sem Glicerol à -20°C/120 dias											
	Dose 2X10 ⁴						Dose 2X10 ⁶					
	2X10 ⁴		2X10 ⁶		2X10 ⁸		2X10 ⁶		2X10 ⁸		2X10 ¹⁰	
	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V
1	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25
2	0	25	0	25	1	24	0	25	1	24	0	25
3	1	24	0	25	1	23	1	25	1	23	6	19
4	1	23	0	25	0	23	0	25	0	23	9	10
5	*1	22	1	24	0	23	0	25	0	23	7	3
6	0	22	0	24	0	23	0	25	0	23	3*1	0
7	0	22	0	24	2	21	0	25	2	21	0	0
8	0	22	0	24	1	20	1	24	1	20	0	0
9	0	22	1	23	2	18	0	24	2	18	0	0
10	0	22	0	23	6*2	12	0	23	6*2	12	0	0
11	0	22	2	21	4	8	0	21	4	8	0	0
12	0	22	0	21	1	7	0	21	1	7	0	0
13	1	21	0	21	1	6	0	21	1	6	0	0
14	0	21	3	18	1	5	0	21	1	5	0	0
15	0	21	0	18	1	4	0	21	1	4	0	0
16	*1	20	2	16	*1	3	0	20	*1	3	0	0
17	*1	19	1	15	0	3	0	19	0	3	0	0
18	0	19	0	15	0	3	0	19	0	3	0	0
19	0	19	0	15	0	2	0	19	0	2	0	0
20	0	19	0	15	0	0	0	19	0	0	0	0
21	0	19	1	14	0	0	0	19	0	0	0	0
22	0	19	0	14	0	0	0	19	0	0	0	0
23	0	19	0	14	0	0	0	19	0	0	0	0
24	0	19	1	13	0	0	0	19	0	0	0	0
25	0	19	1	12	0	0	0	19	0	0	0	0

Viabilidade:

SG = 35,60%

CG = 45,80%

Número de insetos por tratamento: 25

Dose: Número de conídios/ml de água destilada.

Período de leitura: diário

Tempo de exposição à dose: 30 minutos

* Morte por causa desconhecida.

	Insetos tratados com Conídios Armazenados com Glicerol à -20°C/120 dias											
	Dose 2X10 ⁴						Dose 2X10 ⁶					
	2X10 ⁴		2X10 ⁶		2X10 ⁸		2X10 ⁶		2X10 ⁸		2X10 ¹⁰	
	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V
	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	1	24
	0	25	0	25	1	24	1	24	1	24	7	17
	0	25	0	25	1	23	1	23	1	23	10*2	7
	0	25	0	25	1	22	1	22	1	22	5	2
	1	24	0	25	1	21	0	25	1	21	0	2
	0	24	0	25	1	20	1	20	1	20	2	0
	0	24	1	24	3	17	0	24	3	17	0	0
	0	24	1	23	1	16	0	24	1	16	0	0
	2	22	0	23	1	15	0	23	1	15	0	0
	0	22	2	21	3	12	0	22	3	12	0	0
	1	21	1	20	0	12	0	21	0	12	0	0
	0	21	1	19	1	11	0	21	1	11	0	0
	1	20	0	19	1	10	0	20	1	10	0	0
	0	20	0	19	2	8	0	20	2	8	0	0
	0	20	1	18	2	6	0	20	2	6	0	0
	0	20	*1	17	*2	4	0	20	*1	4	0	0
	0	20	2	15	0	4	0	20	2	4	0	0
	0	20	0	15	0	3	0	20	0	3	0	0
	1	19	1	14	0	3	0	19	1	3	0	0
	0	19	0	14	0	3	0	19	0	3	0	0
	0	19	*1	13	0	3	0	19	*1	3	0	0
	0	19	0	13	0	3	0	19	0	3	0	0
	0	19	0	13	0	3	0	19	0	3	0	0
	0	19	0	13	0	3	0	19	0	3	0	0
	0	19	0	13	0	3	0	19	0	3	0	0
	0	19	0	13	0	3	0	19	0	3	0	0

Insetos sem Tratamento com Conídios	Testemunha	
	M	V
	0	25
	0	25
	0	25
	0	25
	1	24
	0	24
	0	24
	0	24
	0	24
	1	23
	0	23
	0	23
	0	23
	1	22
	0	22
	0	22
	0	22
	0	22
	0	22
	0	22
	0	22
	0	22
	0	22

TABELA 6 - BIOENSAIO: *Metarhizium anisopliae* (Linhagem E9) x *Panstrongylus megistus* (hospedeiro).

Dias de Letura	Insetos tratados com Conídios Armazenados sem Glicerol a -20° C/150 dias											
	Dose											
	2X10 ⁴			2X10 ⁶			2X10 ⁸			2X10 ¹⁰		
	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V
1	0	25	0	25	*1	24	0	25	0	25	0	25
2	0	25	0	25	1	23	0	25	0	23	0	25
3	0	25	0	25	0	23	0	25	5	20	5	20
4	0	25	0	25	0	23	0	25	3	17	3	17
5	0	25	0	25	1	22	9 ^{*2}	25	9 ^{*2}	8	9 ^{*2}	8
6	0	25	0	25	0	22	7 ^{*1}	25	7 ^{*1}	1	7 ^{*1}	1
7	0	25	0	25	4	18	1	25	1	0	1	0
8	1	24	0	25	0	18	0	25	0	0	0	0
9	0	24	0	25	1	17	0	25	0	0	0	0
10	0	24	0	25	2	15	0	25	0	0	0	0
11	1	23	0	25	1	14	0	25	0	0	0	0
12	1	22	0	25	1	13	0	25	0	0	0	0
13	*2	20	1	24	1	12	0	24	0	0	0	0
14	0	20	0	24	0	12	0	24	0	0	0	0
15	*1	19	0	24	0	12	0	24	0	0	0	0
16	*3	16	0	24	1	11	0	24	0	0	0	0
17	0	16	0	24	1	10	0	24	0	0	0	0
18	0	16	1	23	0	10	0	23	0	0	0	0
19	0	16	0	23	1	9	0	23	0	0	0	0
20	*2	14	1	22	*1	8	0	22	0	0	0	0
21	*1	13	*1	21	0	8	0	21	0	0	0	0
22	0	13	*1	20	0	8	0	20	0	0	0	0
23	0	13	*2	18	*1	7	0	18	*1	0	0	0
24	0	13	0	18	0	7	0	18	0	0	0	0
25	0	13	0	18	0	7	0	18	0	0	0	0

Viabilidade:

 $SG = 27,60\%$

CG = 35,60%

Número de insetos por tratamento: 25

Dose: Número de conidios/ml de água destilada.

Período de leitura: diário

Tempo de exposição à dose: 30 minutos

* Morte por causa desconhecida.

Insetos tratados com Conídios											
Armazenados com Glicerol a -20°C/150 dias											
Dose											
2X10 ⁴		2X10 ⁶		2X10 ⁸		2X10 ¹⁰					
M	V	M	V	M	V	M	V				
0	25	0	25	0	25	1	24				
0	25	0	25	0	25	1	23				
0	25	0	25	0	25	11	12				
0	25	0	25	0	25	10*2	2				
0	25	0	25	1	24	2	0				
0	25	0	25	0	24	0	0				
0	25	0	25	1	23	0	0				
0	25	1	24	4	19	0	0				
0	25	0	24	2	17	0	0				
0	25	0	24	2	15	0	0				
0	25	0	24	2	13	0	0				
0	25	0	24	0	13	0	0				
0	25	1	23	1	12	0	0				
0	25	1	22	2	10	0	0				
0	25	1	21	1	9	0	0				
0	25	0	21	2	7	0	0				
0	25	0	21	*3	4	0	0				
0	25	*1	20	1	3	0	0				
0	25	0	20	0	3	0	0				
0	25	0	20	0	3	0	0				
0	25	0	20	1	2	0	0				
0	25	0	20	0	2	0	0				
0	25	0	20	0	2	0	0				
0	25	0	20	0	2	0	0				
0	25	0	20	0	2	0	0				

[illegible]