

SÉRGIO BATISTA ALVES, *Editor*
ESALQ / USP

CONTROLE MICROBIANO DE INSETOS

2ª EDIÇÃO
REVISADA E ATUALIZADA

PATROCÍNIO:



*Fundação de Amparo à Pesquisa
do Estado de São Paulo*

BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS LUIZ DE QUEIROZ
Volume 4



© FUNDAÇÃO DE ESTUDOS AGRÁRIOS
LUIZ DE QUEIROZ – FEALQ
Av. Carlos Botelho 1025
13416-145 Piracicaba, SP, Brasil
Caixa Postal 329
13400-970 Piracicaba, SP, Brasil
Fones: 019-422-9197 / 429-4339
Fax: 019-422-1944

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Divisão de Biblioteca e Documentação — Câmpus "Luiz de Queiroz" / USP

Controle microbiano de insetos / editado por Sérgio Batista Alves. 2. ed. Piracicaba :
FEALQ, 1998.

1163p. : il. (Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, 4)
Bibliografia.

1. Controle biológico 2. Praga agrícola 3. Microbiologia agrícola I. Alves,
Sérgio Batista.

CDD 632.96

Nenhuma parte desta obra poderá ser reproduzida, armazenada ou transmitida
por meio eletrônico, mecânico, de fotocópia, de gravação e outros,
sem autorização da Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz — FEALQ.

- Parra, J. R. P. 1992. Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico. 15. Cuidados sanitários mínimos para criação de insetos em meios artificiais. Piracicaba, FEALQ, p. 78-86.
- Singh, P. & H. L. House. 1970. Antimicrobial agents: their detrimental effects on size of an insect, *Agria affinis*. Can. Entomol. 102: 1340-1344.
- Singh, P. & H. L. House. 1970. Effects of streptomycin and potassium sorbate levels in relation to nutrient levels on the larvae of *Agria affinis*. J. Econ. Entomol. 63: 449-454.
- Singh, P. & H. L. House. 1970. Antimicrobials: "safe" levels in a synthetic diet of an insect, *Agria affinis*. J. Insect Physiol. 16: 1769-1782.
- Sinha, K. K. & A. K. Sinha. 1991. Effect of *Sitophilus oryzae* infestation and aflatoxin contamination in stored wheat. J. Stor. Prod. Res. 27: 65-68.
- Soares Jr., G. G. 1992. Problems with entomopathogens in insect rearing, p. 289-322. In T. E. Anderson & N. C. Leppla. (ed.), Advances in insect rearing for research and pest management. Boulder, Westview Press, 519 p.
- Srinath, D., A. N. Ragnathan & S. Majumder. 1973. Influence of some *Aspergillus* species on the population of *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae). Current Science 42: 683-684.
- Tanada, K. & H. K. Kaya 1993. Insect Pathology. San Diego, Academic Press, 666 p.
- Thompson, S. N. 1975. Defined meridic and holidic diets and aseptic feeding procedures for artificially rearing the ectoparasitoid *Exeristes roboractor* (Fabricius). Ann. Entomol. Soc. Am. 68: 220-226.
- Vail, P. V., T. J. Henneberry, A. N. Kishaba & K. Y. Arakawa. 1968. Sodium hypochlorite and formalin as antiviral agents against nuclear-polyhedrosis virus in larvae of the cabbage looper. J. Invertebr. Pathol. 10: 84-93.
- Wyrostkiewicz, K. & A. Blazejewska. 1978. The effect of the fungus *Aspergillus fumigatus* Frenesius on the development of the grain weevil *Sitophilus granarius* L. (Col; Curculionidae). Polskie Pismo Entomologiczne 48: 245-251.

Produção de bactérias entomopatogênicas

I. O. Moraes, D. M. F. Capalbo
& R. O. M. Arruda

Introdução

Muitas bactérias formadoras de esporos produzem moléculas importantes (solventes, antibióticos, enzimas e inseticidas), enquanto outra fração representa problema na indústria de alimentos, por produzir toxinas e apresentar esporos altamente resistentes a processos de higienização (Foster 1994, Liu 1994). Do processo de esporulação resulta um endósporo dormente e altamente resistente, que sob condições favoráveis pode germinar e se transformar numa célula vegetativa. A seqüência de fases de diferenciação é caracterizada por mudanças morfológicas distintas que podem ser representadas através da Figura 26.1.

As bactérias formadoras de esporos pertencem em sua maioria à família Bacillaceae, incluindo cinco gêneros: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum* e *Sporosarcina*. O gênero aeróbio *Bacillus* é o maior, seguido pelo anaeróbio *Clostridium* (Liu 1994). E são também essas bactérias formadoras de esporos as de maior potencial para o controle biológico, pelas mesmas características que lhes conferem resistência às condições adversas ambientais e de processamento industrial.

Nos últimos vinte anos, o desenvolvimento da agricultura e a ampliação das fronteiras agrícolas obrigaram à intensificação do uso de pesticidas químicos, devido

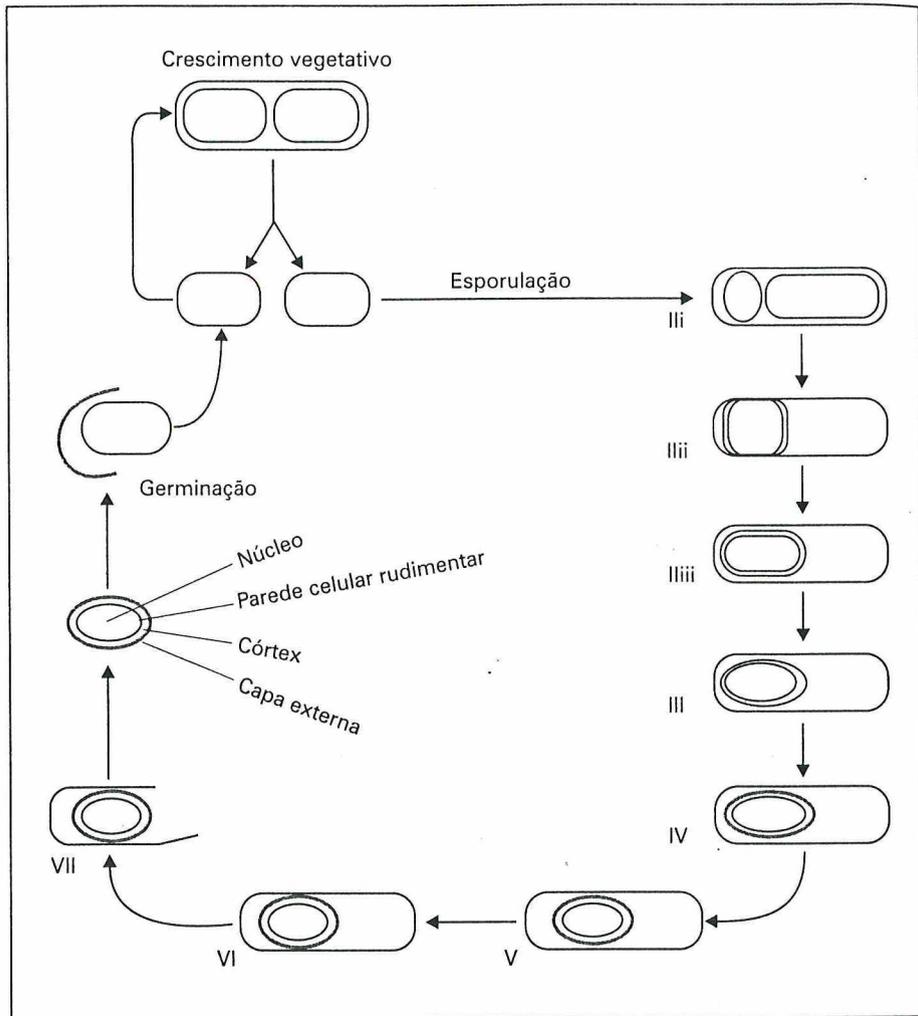


Figura 26.1. Mudanças morfológicas durante a diferenciação de *Bacillus* sp. Durante o crescimento vegetativo, as células se dividem por fissão binária. Em condições de falta de nutrientes acontece a formação de um septo assimétrico (estágio III). O pré-esporo é então envolvido pela membrana da célula-mãe (estágios IIIi e IIIii), ficando totalmente envolvido pelo citoplasma da célula-mãe (estágio IIIiii). Durante o estágio IV forma-se uma membrana externa ao pré-esporo e, em seguida, há formação de córtex (área sombreada). As camadas vão se depositando externamente ao córtex no estágio V. O esporo atinge sua maturação (estágio VI) e é liberado pela lise da célula-mãe (estágio VII). A germinação do endosporo ocorre na presença de substâncias promotoras, o córtex é hidrolisado e o esporo germinado pode se transformar numa nova célula vegetativa (Foster 1994).

ao grande aumento do ataque de insetos, responsável por cerca de 30% de perdas em colheitas e produtos armazenados. Paralelamente a essa expansão, surgiram os problemas de toxidez, devido especialmente ao emprego indiscriminado e aos resíduos que tais pesticidas deixavam nas plantações. Além disso, o problema de resistência de insetos a pesticidas químicos deve ser considerado. Surgiram, então, alternativas de controle de insetos, entre as quais o uso de feromônios e entomopatógenos que incluem especialmente vírus, bactérias e fungos.

Os inseticidas baseados em entomopatógenos são quase sempre específicos e apresentam baixa ou nenhuma toxidez aos vertebrados e insetos benéficos, ocorrendo naturalmente nos campos cultivados.

Apesar de o uso de entomopatógenos representar apenas 1% do mercado total de produtos para proteção de plantas, um número significativo de estudos promoveu o aumento da quantidade de produtos disponíveis e ampliou as perspectivas para o mercado. Em particular, o entendimento do modo de ação de *Bacillus thuringiensis* (B.t.), o ingrediente ativo mais utilizado comercialmente nos biopesticidas, cresceu pela aplicação de métodos biotecnológicos. Um recente aumento de vendas de produtos à base de B.t. (em três anos, cresceu cerca de 80%) se deve a avanços na formulação e formas de produção que geraram produtos mais econômicos, alguns dos quais competem diretamente com os químicos (Lysansky & Coombs 1992).

A aplicação de patógenos como inseticidas requer grandes quantidades do agente ativo. Conseqüentemente, sua produção deve ser relativamente fácil e boas as características de estocagem. A produção depende de o microrganismo entomopatogênico se desenvolver em meio artificial ou não. Se ele crescer em meio artificial (*in vitro*), poderá ser produzido em larga escala, utilizando-se as modernas técnicas de fermentação. Por outro lado, se o patógeno se reproduzir apenas *in vivo*, faz-se necessário o hospedeiro vivo ou um organismo alternativo para sua multiplicação. Tal produção se tornará viável com a utilização de métodos de criação de insetos livres de doenças, geralmente alimentados com dieta artificial (Parra 1986) (ver Capítulo 25).

Qualquer que seja o método de produção utilizado, existirão problemas de formulação e manutenção de linhagens. Os princípios e métodos de formulação de inseticidas químicos podem ser adaptados para microrganismos, porém deve-se estar atento ao fato de que o patógeno deve ser mantido vivo e de que ele é suscetível a fatores que não costumam afetar os compostos químicos, como radiação ultravioleta, temperatura e pressão durante a moagem para formulação em pó, entre outros.

A manutenção da linhagem do patógeno é geralmente de vital importância, particularmente para aqueles que perdem sua virulência com as constantes repicagens da cultura *in vitro*.

A variabilidade, a mutabilidade e, algumas vezes, a facilidade de manipulação genética são algumas vantagens dos inseticidas baseados em entomopatógenos, em comparação com os químicos. A manipulação genética dos patógenos, promovendo novas linhagens potencialmente mais ativas, e a descoberta de novas espécies induzem a perspectivas ainda mais promissoras na área. Paralelamente, o desenvolvimento de novos métodos de preservação de microrganismos favorece a manutenção de bancos desse material para futuras pesquisas e melhoramentos.

Nos últimos quarenta anos, o potencial para biopesticidas no mercado foi observado por diferentes pontos de vista. Proponentes superestimaram seus valores, virtudes e perspectivas, enquanto os céticos concentraram-se em suas deficiências. Biopesticidas foram até mesmo negligenciados pelas indústrias de agroquímicos. Eles foram então promovidos pelos "capitalistas" a componentes comerciais e tecnicamente importantes para a proteção de plantas no futuro, acreditando-se que a biotecnologia voltada para a agricultura iria transformá-los em líderes. Os biopesticidas são vistos hoje não como uma panacéia, mas como um componente efetivo e de valor nos sistemas de manejo integrado (Lysansky & Coombs 1994).

São vários os microrganismos patogênicos a insetos ou que produzem material tóxico a eles. Podem ser divididos em três grupos, com base em sua ecologia. O primeiro grupo, uma vez introduzido numa população-alvo, será reciclado naturalmente, gerando um grau de controle permanente naquela população. O segundo grupo logo desaparece do ambiente ao qual foi aplicado e deverá ser aplicado repetidamente. O terceiro grupo pode se comportar de ambas as formas, dependendo da combinação da linhagem do patógeno com a espécie de praga visada, e também do ambiente (Moraes & Capalbo 1986).

Os agentes bacterianos de controle biológico se dividem entre os três grupos. *Bacillus popilliae* e espécies semelhantes pertencem ao primeiro grupo. Muitas variedades de B.t. são do segundo grupo. O terceiro grupo envolve linhagens de *Bacillus sphaericus*. Essa lista de espécies bacterianas, embora curta, contém os mais promissores agentes de controle microbiano (Alves 1986).

Essas espécies de bactérias possuem vantagens e desvantagens para controle de insetos. As vantagens incluem a produção de esporos, que são bastante resistentes aos fatores adversos do ambiente; podem ser mantidas na forma de pó ou emulsão; são facilmente utilizadas em equipamentos projetados para aplicação de inseticidas químicos e, principalmente, são inócuas ao ser humano, a outros mamíferos e à flora e fauna benéficas.

Dentre as desvantagens, está o fato de as bactérias agirem por via oral, não tendo nenhuma ação por contato. Sua ação geralmente se restringe a um estágio de desenvol-

vimento do inseto e, por consequência, a aplicação do produto deve ser mais exata e controlada que com produtos químicos.

Cada um dos três grupos possui, entretanto, características particulares interessantes, que resultaram na sua utilização como meio de controle.

Produção comercial

O interesse comercial no desenvolvimento de produtos para controle microbiano de insetos iniciou-se em torno de 1950, quando se percebeu a possibilidade de manipular microrganismos para causar epizootias em insetos suscetíveis, a velocidades próximas àquelas dos produtos químicos, sem contudo causar danos às espécies benéficas.

Primeiramente, foram as empresas de fermentação que, na procura de novos mercados, se lançaram no estudo da produção de B.t., que se apresentava viável para crescimento *in vitro*. A seguir, as indústrias de produtos químicos, já estabelecidas na produção e venda de inseticidas, demonstraram interesse devido à potencialidade que o inseticida bacteriano representava na facilidade de produção, viabilidade e eficácia para o controle de insetos. Em oposição à maioria dos pesticidas químicos, o ingrediente ativo dos produtos à base de bactérias é obtido diretamente de organismos vivos, o que implica em etapas de obtenção e utilização diferentes das rotineiramente observadas nos produtos químicos. (Bryant 1994).

Para a produção comercial de microrganismos ou produtos microbianos, há a necessidade de seleção de uma linhagem bem adaptada ao processo fermentativo e de variações, a fim de maximizar a produção e realizar o crescimento sob condições de fermentação econômicas.

Dulmage & Aizawa (1982) sugeriram que B.t. é um habitante de solo, e Martin & Travers (1989) apresentaram resultados de isolamento de B.t. do solo usando técnica até hoje aplicada para recuperação dessa bactéria de diferentes habitats. Observaram também que aproximadamente 40% das cepas de B.t. isoladas, formadoras de cristal, não eram tóxicas aos insetos testados (*Bombyx mori*, *Trichoplusia ni*, *Culex pipiens*), tampouco a besouros. Uma revisão discutida sobre a ecologia de B.t. pode ser encontrada em Meadows (1993).

Independente da fonte de obtenção da linhagem, seja ela isolada de fontes naturais, como solo ou insetos, seja ela obtida por manipulação genética, todos os novos "materiais" deverão seguir etapas de otimização antes de poder ser utilizados em fermentações de escala comercial (Bryant 1994). Essas etapas envolvem a estabilidade da linhagem e as condições ótimas de produção.

Verifica-se a estabilidade da linhagem ao longo de várias gerações, de forma a demonstrar que através de multiplicações sucessivas um inóculo inicial não reverterá a um isolado menos ativo. Estudam-se as condições ótimas de produção da entidade

tóxica, pois, apesar de se poder contar com uma linhagem potente, existe a possibilidade de condições de fermentação alterarem drasticamente a habilidade do isolado de gerar um produto altamente tóxico. Assim, a potência e o espectro de atividade do caldo final fermentado dependem muito da qualidade e controle do processo de produção.

As etapas preliminares de otimização das condições de produção são normalmente realizadas em pequenos reatores (entre 1 e 5 litros), seguidas de etapas intermediárias (reatores entre 10 e 20 litros). Esses reatores são construídos de forma a permitir o controle, o monitoramento e o registro das condições de trabalho (temperatura, aeração, agitação, entre outras), bem como a retirada de amostras assepticamente. Desses testes obtêm-se dados sobre condições ideais de suprimento de nutrientes (carboidratos, minerais, proteínas), temperatura, pH, oxigênio dissolvido, que embasarão o escalonamento do processo. Considerações do aspecto “custo de produção e recuperação do produto final” devem ser conjugadas com os dados de produtividade obtidos nas etapas de otimização do processo fermentativo, de forma a gerar produtos competitivos (Bryant 1994).

No caso do B.t., a aplicação de bioensaios com o produto obtido determina a melhor linhagem. Isso envolve grande consumo de tempo, o que não é prático nem econômico, porém indispensável (Dulmage & Rhodes 1973; Moraes 1976a).

A manutenção de culturas em meio sólido e as repetidas transferências em meio de cultura artificial causam alterações indesejáveis no microrganismo, sendo uma delas o decréscimo na capacidade de esporular, diminuindo sua patogenicidade. Esta pode ser restaurada através da passagem do microrganismo pelo inseto hospedeiro e posterior reisolamento (Dulmage & Rhodes 1973).

Processo fermentativo

Os processos fermentativos envolvem várias etapas na obtenção de grandes quantidades de células e/ou seus metabólitos (Moraes *et al.* 1991). Para B.t., a forma mais usual é o processo submerso, no qual um meio nutritivo líquido é utilizado para suspender e propagar a biomassa bacteriana (Moraes & Capalbo 1986, Bryant 1994).

Cada linhagem é mantida como uma cultura-estoque na forma liofilizada. Uma pequena quantidade desse material pode ser transferida para um meio de propagação, por exemplo, um meio nutritivo contendo ágar. Essa primeira etapa de propagação (cultura-mãe, semente ou *starter*) é utilizada para testes de pureza que incluem, por exemplo, sorotipagem, sensibilidade a bacteriófagos, observação quanto à presença de contaminantes e confirmação da atividade inseticida (Bryant 1994).

O processo de fermentação tem início quando se transfere uma pequena alíquota da cultura-mãe para um reator ou erlenmeyer (até 1 litro), que após um pe-

ríodo de fermentação sob condições controladas será o inóculo de um reator ainda maior (50 litros), e assim sucessivamente, até se atingir o volume final desejado. O volume de inóculo varia de 1 a 10%, conforme as demais condições de cultivo. Condições de assepsia durante todo o procedimento devem ser observadas para evitar contaminações por outros microrganismos; todo o equipamento e os meios de cultivo devem ser esterilizados em autoclave ou por vapor, de forma a manter as condições de assepsia necessárias (Bryant 1994).

As condições de produção devem ser cuidadosamente monitoradas para segurança quanto ao andamento e manutenção da produtividade. Após o período de crescimento, analisa-se o caldo quanto às propriedades físicas e microbiológicas, para assegurar qualidade e integridade antes de passar a etapas posteriores de produção, que atingirão até 10 000 litros ou mais por reator (Bernhard & Utz 1993). Até esse ponto, a fermentação gerou células em estágio de crescimento vegetativo; esporos e cristais protéicos ainda não foram produzidos em quantidades significativas, como se pode observar pelos resultados experimentais apresentados na Figura 26.2.

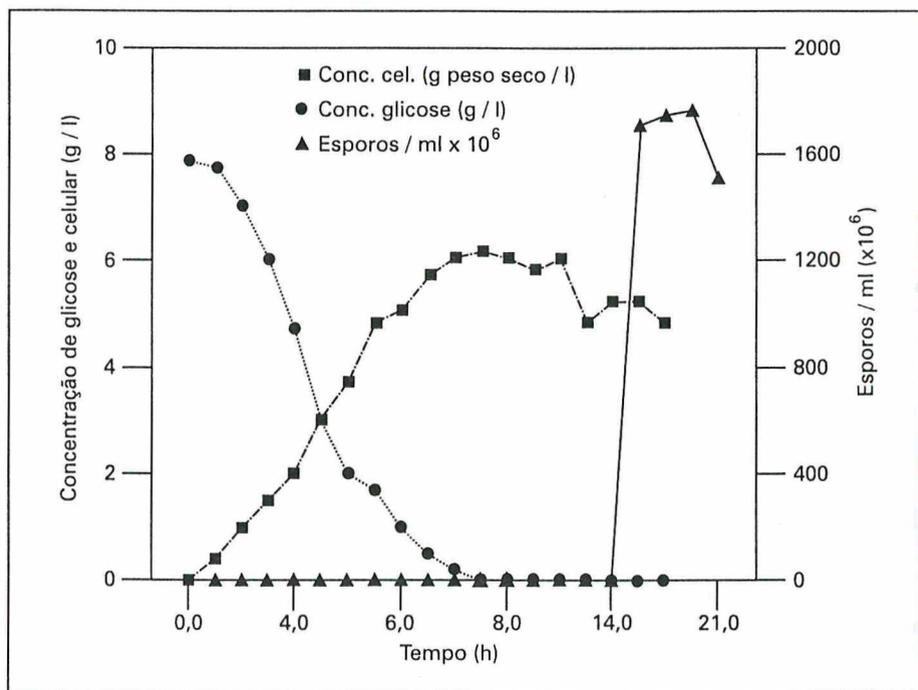


Figura 26.2. Alterações nas concentrações de algumas variáveis durante o cultivo de *Bacillus thuringiensis* em processo submerso descontínuo.

- b) altas concentrações de carboidratos são geralmente conseguidas a partir de dextrose ou amido. Entretanto, a partir desses carboidratos podem ser produzidas grandes quantidades de ácidos orgânicos que irão baixar o pH do caldo a valores inferiores a 5,4, o que poderá provocar a interrupção do crescimento bacteriano. A neutralização desses caldos geralmente permite que a cultura recupere seu crescimento;
- c) altos níveis de nitrogênio (a partir de proteínas, hidrolisados ou água de maceração de milho) também estimulam o crescimento e promovem a liberação de bases orgânicas, que irão favorecer a manutenção do pH do caldo em níveis desejáveis (Dulmage 1993).

A composição do meio de cultura para fermentação deve constar de água, carbono e nitrogênio, para biossíntese e energia, e traços de minerais. Os níveis e formas desses elementos dependem do processo de fermentação usado.

Assim, uma fonte de carbono apropriada para fermentação semi-sólida (farelo de arroz, tortas de oleaginosas) pode não ser para fermentação em submerso (melaço de beterraba, melaço de cana, amido de cereais).

Fontes de carbono e nitrogênio

O nitrogênio pode ser suprido com sais de amônio, água de maceração de milho e farinha de soja. Dulmage (1970, 1971) estudou diferentes meios de cultura e diferentes linhagens de *B.t.* em cultura submersa. A atividade tóxica foi dependente do meio e da linhagem empregada. Os carboidratos usados foram triptona, farinha de soja e torta de algodão parcialmente desengordurada. Ejiofor (1989) cita que são utilizados na Nigéria levedura residual de cervejaria e amido residual de mandioca como substratos para crescimento de *B.t.*

Uma das chaves para o sucesso da produção e comercialização do inseticida bacteriano tem sido o desenvolvimento do meio de cultura. A maioria dos meios de cultura empregados usa produtos totalmente naturais, como fontes de carbono, nitrogênio e sais. Conforme listados anteriormente, verifica-se serem subprodutos industriais de baixo custo.

O balanço entre nitrogênio e oxigênio pode ter uma grande influência sobre o pH durante a fermentação. Ele pode ser controlado entre 5,4 e 8,4 através do balanço de nutrientes (ácidos formados a partir dos carboidratos e bases formadas a partir das fontes de proteína).

Segundo Pearson & Ward (1988), há um pequeno aumento na síntese da toxina de *B.t.* se forem utilizados meios contendo amido, quando comparado com melaço. Já para a fermentação de *B. thuringiensis* var. *israelensis* (*B.t.i.*) é interessante o suplemento do meio com sulfato de amônio (Avignone-Rossa *et al.* 1992).

Segundo Priest (1992), muitos trabalhos foram desenvolvidos para atingir um meio de cultivo efetivo para uso em países em desenvolvimento. Aparentemente, um meio contendo resíduos agroindustriais de geração local reduziria os custos. Porém, para *B.t.i.*, materiais amiláceos deverão ser evitados, sendo mais recomendados sementes de leguminosas e produtos fermentados de mandioca ou milho. A versatilidade do metabolismo do *B.t.* pode ser benéfica na exploração desse potencial de grande valor para a produção de bioinseticidas em países em desenvolvimento.

Para *B. sphaericus*, que não utiliza fontes de carbono para crescimento e não metaboliza o açúcar, são necessários acetato, succinato, arginina e glutamato como fontes de carbono e energia, sendo possível também o gluconato e o glicerol. Sua fisiologia restringe o uso de resíduos agroindustriais como meio de crescimento àqueles ricos em proteínas e aminoácidos (Priest 1992).

Pela Figura 26.3 e Tabela 26.1 (referentes ao trabalho de Yudina *et al.* 1993), observa-se claramente a influência da fonte de carbono sobre a atividade biológica e a morfologia do cristal de *B.t.*

Nesse trabalho, não apenas o número de cristais de diferentes formas se altera durante o crescimento em diferentes meios, como também as características morfológicas, que dependem das variações nas estruturas e também das relações de composição das delta-endotoxinas, levando a alterações na magnitude e especificidade do seu efeito inseticida (Yudina *et al.* 1993).

Tabela 26.1. Principais propriedades do cristal produzido pela linhagem Z-52 em diferentes meios de cultura (Yudina *et al.* 1993).

Meio	HM + 0,5% de amido	HM + 1% de amido	HM + 2% de amido	AM	YPM
Comprimento do cristal (μm)	-	1,38	1,43	1,91	1,51
Largura da base do cristal (μm)	-	0,64	0,56	0,83	0,68
Dimensão do cubo	-	0,64	0,58	0,81	0,64
Volume dos cristais bipiramidais (μm^3)	-	0,19	0,15	0,44	0,23
Volume dos cristais cubóides (μm^3)	-	0,26	0,20	0,53	0,26
Concentração do cristal (mg/ml)	0,5	1,2	1,9	2,9	3,1
Atividade antibacteriana específica do cristal (U/ml)	2,3	2,2	2,0	9,0	6,7
Atividade antibacteriana geral do cristal (U/ml)	1,2	2,6	3,8	26,0	20,8
Número de esporos ($\times 10^9/\text{ml}$)	1,8	2,8	4,2	7,3	4,7
Atividade inseticida ($\times 10^6$ esporos/ml)	-	7,7	-	1,7	2,4

(-) = não determinado.

Um aumento na concentração de carbono (HM) provocou acréscimo na biomassa e também na quantidade de cristal. Entretanto, sua atividade biológica permaneceu a mesma, não tendo variado tampouco as formas e as relações entre formas de cristal obtidas. Já a mudança da fonte de carbono levou a alterações nas velocidades de formação de toxinas, o que se refletiu na mudança das principais características bioativas de B.t..

Para produção no Brasil, é interessante usar o melaço de cana e água de maceração de milho (Moraes, 1973, 1976a, 1976b, 1985). A composição do meio de cultura é determinada pela análise de custos, comparada com o rendimento das frações endo e exotóxicas.

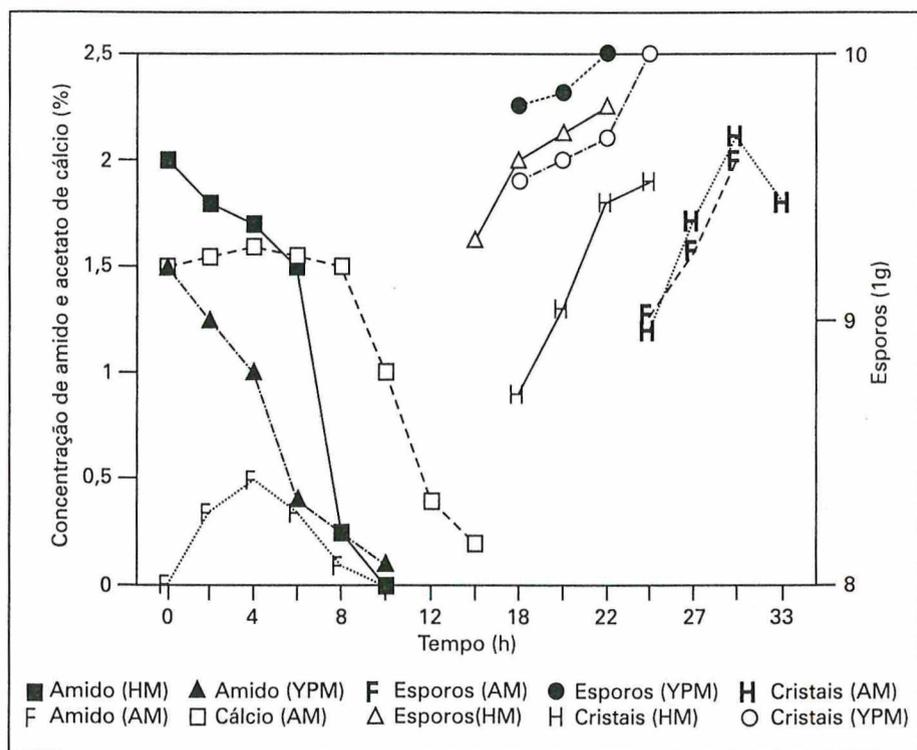


Figura 26.3. Formação de esporos e cristais durante o crescimento de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* Z-52 em diferentes meios de cultura (Yudina *et al.* 1993).

YPM = 3% nutriente extrato de levedura, 1,5% farinha de milho.

AM = acetato de cálcio, levedura, farinha de milho.

HM = extrato de levedura hidrolisada (H_2SO_4) e diferentes concentrações de amido (0,5 - 2,5%).

Sais minerais

São também necessários sais inorgânicos para o crescimento de microrganismos, tais como cálcio, zinco, manganês e magnésio. O balanço adequado de sais minerais auxilia no equilíbrio do pH do caldo de fermentação, o que é de extrema importância na produção e posterior recuperação e estabilidade da toxina ou produto final desejado (Dulmage 1993). O cálcio, segundo Dulmage & Rhodes (1973), é necessário para a termoestabilidade dos esporos de B.t., enquanto o manganês é requerido para a esporulação.

Sikdar *et al.* (1991), estudando o efeito de alguns minerais sobre o crescimento de B.t.i., verificaram que as concentrações ótimas de minerais para o crescimento e produção de endotoxinas são diferentes, não havendo relação entre crescimento celular e produção de toxina. Entre os elementos estudados (potássio, magnésio, cálcio, ferro, cobre e molibdênio), apenas o molibdênio provocou inibição.

Temperatura

Como determinado por Dulmage (1993) e apresentado na Tabela 26.2, crescimento e rendimento não variam muito entre temperaturas de 26°C até 34°C. A 37°C, exames ao microscópio mostraram presença de longos cordões de células e baixos rendimentos. Não existe vantagem em crescer B.t. a temperaturas acima de 34°C para produção comercial, pois além do risco de menor rendimento, existe o custo da energia a ser acrescido.

Tabela 26.2. Efeito da temperatura de incubação no crescimento e produção de α -endotoxina de *Bacillus thuringiensis* variedade HD 263 em fermentador de 14 litros (Dulmage 1993).

Temperatura de incubação (°C)	Tempo para obter o máximo rendimento (h)	Esporos ($\times 10^7$)	Potência observada (kIU/ml)
37	39 - 42	80	283
34	18-24	170	1 150
30	34 - 39	220	1 500
30	39	240	1 450
26	39 - 42	200	1 630

(*) Medido contra *Heliothis virescens*.

kIU = unidades internacionais $\times 10^3$

Oxigênio

Entre os diferentes trabalhos já realizados sobre a influência do oxigênio na esporulação de B.t., o de Tianjian *et al.* (1993b) demonstra bem a influência dos diversos fatores que promovem a dissolução do oxigênio no meio de fermentação. A Figura 26.4 mostra essas relações e sua influência sobre a concentração de células no meio fermentado.

Avignone-Rossa *et al.* (1992) observaram a influência do oxigênio sobre a formação de endotoxinas de B.t. Apesar de a esporulação e a síntese de endotoxinas serem ambas grandemente afetadas pelo suprimento de O_2 , uma vez iniciada a esporulação ela será completada, mesmo que o fornecimento de oxigênio seja interrompido. Entretanto, a síntese de endotoxina é afetada por tal interrupção, e apenas uma fração do rendimento esperado será atingida. Assim, o oxigênio deve ser continuamente suprido, para se atingir um alto rendimento em endotoxinas, principalmente considerando-se que a endotoxina é responsável por grande faixa de atividade do B.t.

Operação e acompanhamento

As condições de operação comumente utilizadas industrialmente, descritas por vários autores, indicam um pH inicial de 7,2 a 7,6 para o meio de fermentação. O volume de inóculo varia de 2 a 10% do volume total de fermentação, sendo esse inóculo

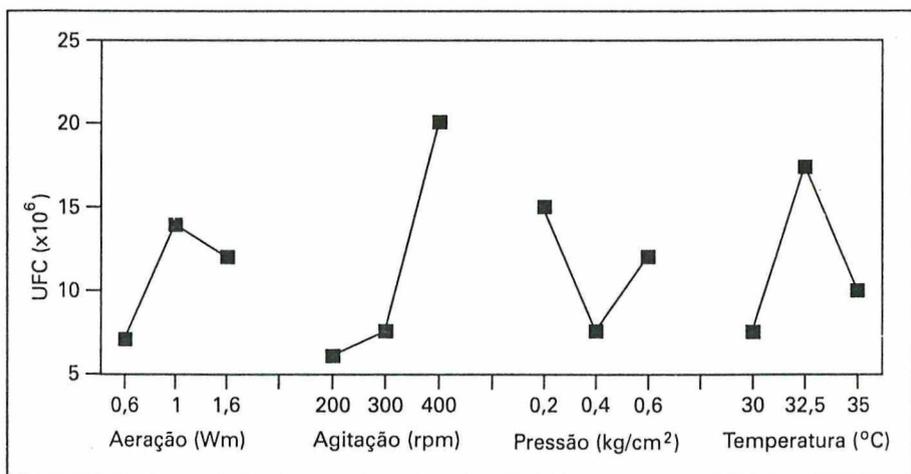


Figura 26.4. Relação entre UFC (unidades formadoras de colônia) e cada um dos quatro fatores que influenciam na quantidade de oxigênio dissolvido no meio de fermentação (Tianjian *et al.* 1993b).

obtido de pré-fermentação, de forma a garantir que o microrganismo esteja em fase de crescimento logarítmico. A temperatura utilizada é de $30 \pm 2^\circ\text{C}$ e a aeração é variável com o tipo de fermentador. O ciclo de fermentação pode variar de poucas horas (8 a 10 horas) até dias (três dias).

O comportamento característico da fermentação descontínua de *B.t.* em meio de cultura com melaço e água de maceração de milho está representando nas Figuras 26.5, 26.6 e 26.7, para consumo de glicose, variação de pH e cinética de crescimento, em dois tipos de fermentador.

Tianjian *et al.* (1993a) demonstraram a aplicabilidade de outros parâmetros para acompanhamento de fermentações de *B.t.*, como: conteúdo total de ácidos nucléicos, oxigênio dissolvido, conteúdo de aminoácidos, conteúdo de amônia, proteases extracelulares e, finalmente, viscosidade do meio.

O conteúdo de ácidos nucléicos total reflete a concentração de células, sendo um método rápido e preciso para acompanhamento do processo fermentativo.

Fermentação submersa contínua

A maioria dos processos industriais atualmente conhecidos diz respeito à técnica de produção do inseticida microbiano “em descontínuo”, também denominada “em bateladas”. Conhecidas as condições ótimas para tal técnica, pode-se empre-

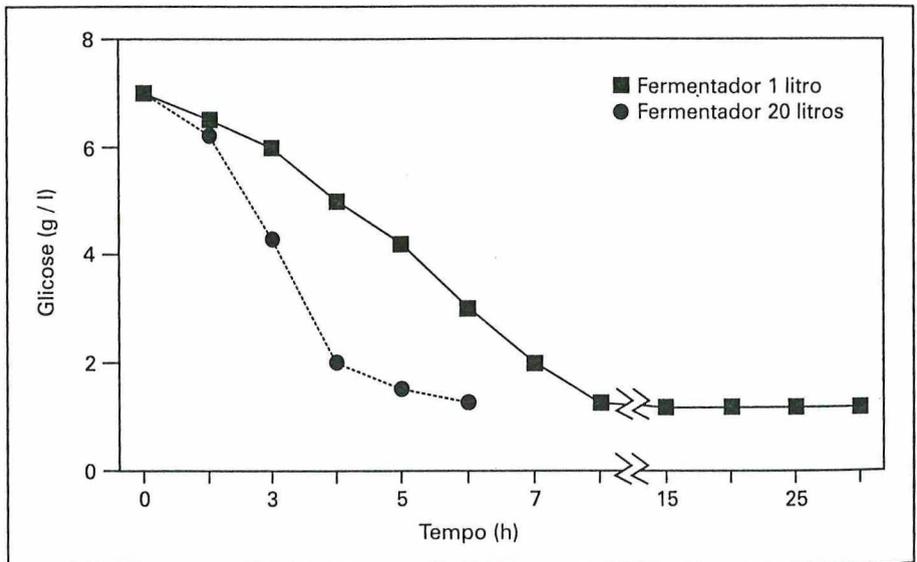


Figura 26.5. Cinética de consumo de açúcar para *Bacillus thuringiensis* em duas escalas de fermentação.

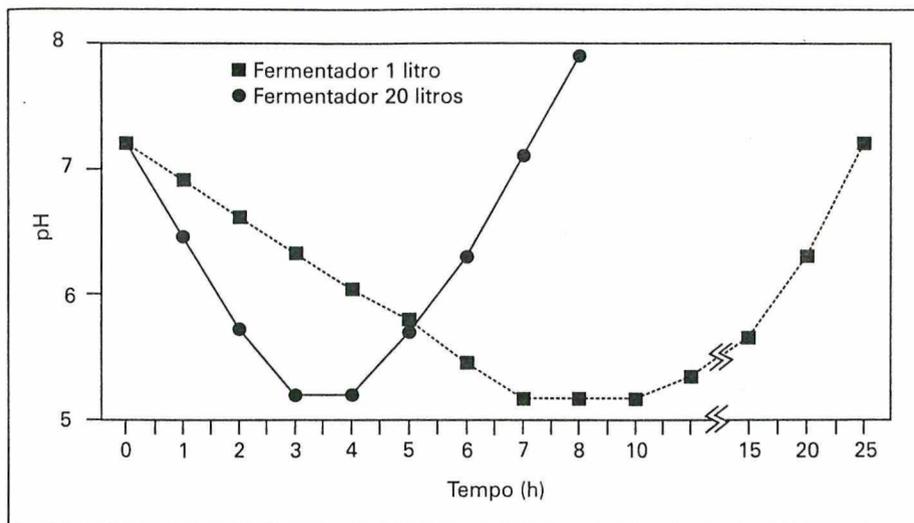


Figura 26.6. Variação de pH em fermentação de *Bacillus thuringiensis* para diferentes volumes de fermentação.

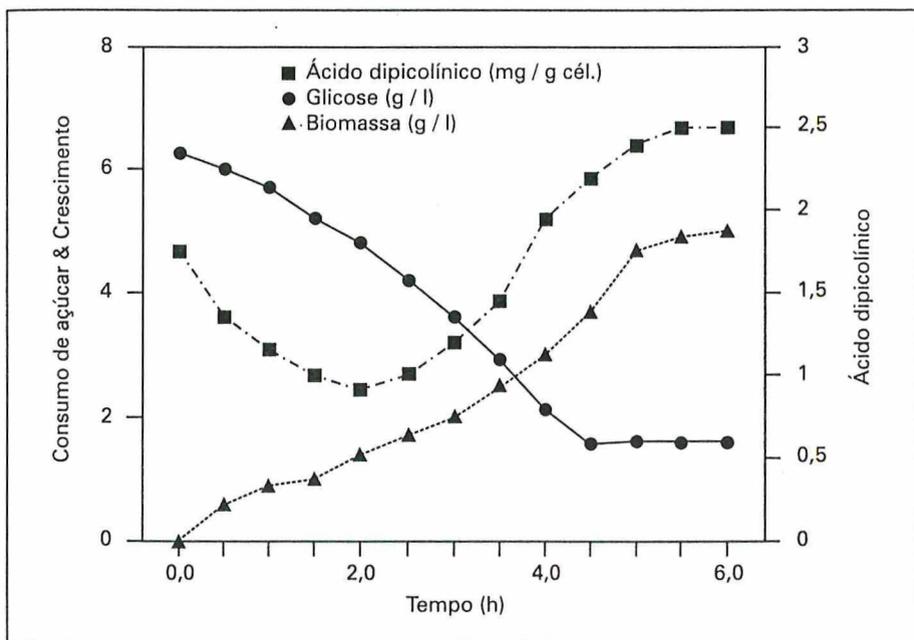


Figura 26.7. Cinética de fermentação de *Bacillus thuringiensis* em fermentador de 20 litros.

gá-la num processo contínuo. Na cultura contínua, as condições de equilíbrio do sistema podem ser manipuladas de forma a permitir um estudo profundo da cinética do crescimento do microrganismo e dos produtos de seu metabolismo.

Apesar de a técnica de cultura contínua ter sido alvo de muitos ensaios e utilizada com sucesso para fermentações industriais, o uso de cultura contínua para microrganismos esporuláveis é raro. Alguns trabalhos indicam que variações na velocidade de crescimento e no teor de carboidratos do meio poderão acelerar a esporulação.

Blokina *et al.* (1984), estudando o processo contínuo de B.t., verificaram que o crescimento em processo contínuo favorece a formação e o desenvolvimento de colônias distintas da colônia-mãe. Freiman & Chupin (1973), estudando o processo em dois estágios, obtiveram uma cultura com máxima maturação, sendo que o segundo estágio atuou como fermentador descontínuo.

Capalbo (1982), verificou que, para condições de laboratório, a fermentação contínua com B.t. é bem-sucedida para sistemas com mais de um estágio, sendo a diminuição da aeração do último estágio do processo um fator econômico importante.

Sachidanandham *et al.* (1993) realizaram estudo sobre a otimização de parâmetros do processo fermentativo visando uma produção industrial de B.t. e utilizaram dados da fermentação contínua para estabelecer os dados de escalonamento. A produção em descontínuo foi realizada em fermentador de 3 000 l, com obtenção de um produto efetivamente ativo.

Fermentação semi-sólida

A fermentação semi-sólida (FSS), ou no “estado sólido”, como é muitas vezes designada, é um sistema de produção alternativo para obtenção de novas substâncias ou mesmo de algumas já conhecidas, a partir de microrganismos que se desenvolvem na superfície de substratos sólidos. Uma enorme gama de produtos pode ser obtida (cogumelos, alimentos orientais, enzimas etc.). O desenvolvimento de FSS foi realizado há muitos séculos, especialmente no Oriente, tendo geralmente um fungo como microrganismo, sendo conhecido como método Koji. Uma revisão bastante interessante foi realizada por Hesseltine (1965), tratando de “um milênio de fungos: alimento e fermentação”.

Várias características intrínsecas ao processo foram extensivamente revisadas (Mudgett 1985, Capalbo 1989), sendo interessante observar que, do ponto de vista da engenharia de processos, a FSS oferece características atrativas como processo alternativo à fermentação submersa: meio de cultura muitas vezes natural e simples, utilizando resíduos agroindustriais e aeração facilitada pelos espaços vazios entre partículas do substrato.

Lonsane *et al.* (1985) revisaram os equipamentos necessários, o processo de monitoramento e controle e aspectos da automação e modelagem, tendo recomendado o estudo de alguns aspectos de engenharia, pesquisa e desenvolvimento.

Na FSS, produtos de origem agrícola são geralmente utilizados como suporte para o crescimento microbiano, sendo que os microrganismos crescem internamente ao substrato, em sua superfície e nos espaços intersticiais. Como o microrganismo está intimamente ligado ao suporte, muitas vezes é difícil avaliar sua massa diretamente (Moo-Young *et al.* 1980). Por isso, muitas vezes se avalia crescimento microbiano através de consumo de O_2 ou produção de CO_2 (Capalbo 1989).

A estrutura dentro do fermentador muda com o tempo em diferentes níveis: no nível intraparticular, o microrganismo invade os poros disponíveis e modifica a composição química do suporte; no nível interparticular, o crescimento provoca o recobrimento da superfície do suporte e, no caso de fungos, o micélio liga as diferentes partículas. Essa modificação induzida pelo microrganismo leva a modificações nos coeficientes de transferência gasoso e de massa.

Num estudo sobre difusão de CO_2 e O_2 em FSS, Auria *et al.* (1992) avaliaram as alterações nos coeficientes de difusão durante a realização da fermentação. Para fins de ilustração, apresentamos na Figura 26.8 os resultados para massa seca obtidos por Auria *et al.* (1992).

Esses autores ressaltaram a importância que as variáveis macroscópicas (tamanho da coluna, forma, distribuição de tamanho de partícula do substrato, pressão de empacotamento do reator) podem ter sobre as taxas e coeficientes de difusão e, portanto, sobre os resultados de biomassa obtidos.

Outro fator importante é a transferência de calor devido ao aumento da temperatura resultante do desenvolvimento do microrganismo.

Como processo, a FSS é muito complexa, devido à heterogeneidade do sistema tanto do ponto de vista físico como químico e biológico.

Separação de toxinas

De acordo com Heimpel (1967), B.t. possui um verdadeiro arsenal de toxinas: alfa, beta, gama e delta.

Durante a esporulação, forma-se, ao lado de cada esporo, um cristal protéico (delta-endotoxina), tóxico à maior parte dos lepidópteros, causando paralisia intestinal e morte do inseto. Em alguns casos em que o inseto parece não ser suscetível ao cristal tóxico, a ingestão deste com o esporo acarreta germinação dos esporos e produção de uma fosfolipase C que mata o inseto hospedeiro (Moraes 1973).

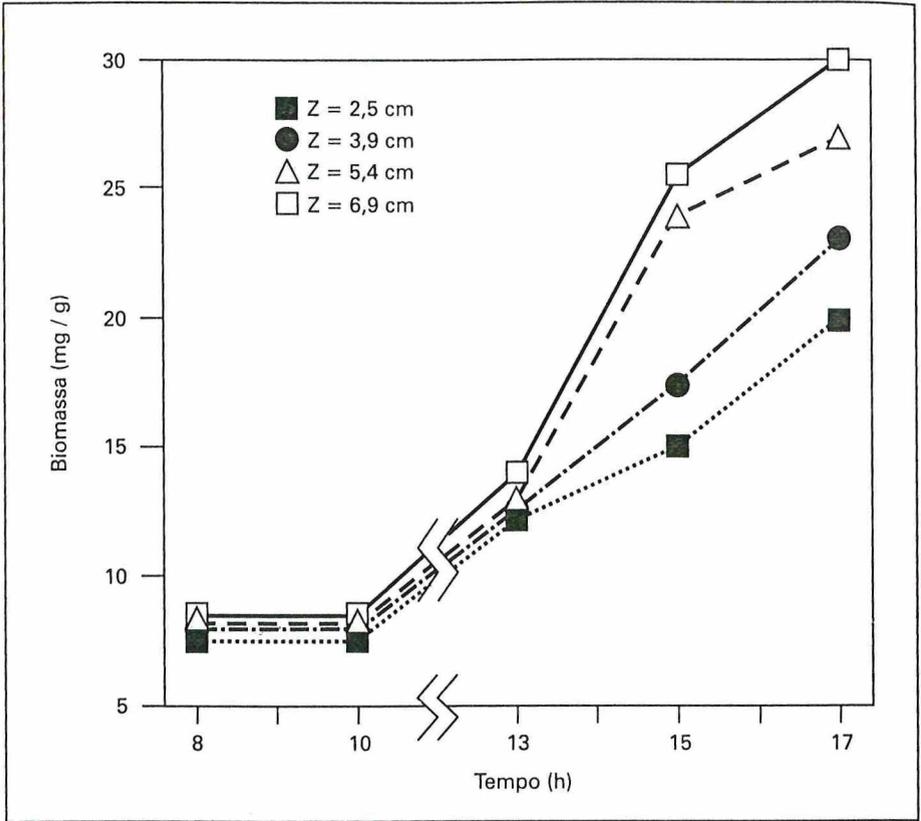


Figura 26.8. Variação da concentração de biomassa seca com o tempo a diferentes alturas da camada do meio semi-sólido, sendo Z = 0 o topo da camada (Auria *et al.* 1992).

Além dessas endotoxinas, há a exotoxina termoestável (beta-exotoxina), descoberta por McConnell & Richards (1959), que é produzida pelo B.t. na fase de crescimento vegetativo e que é tóxica a alguns lepidópteros, dípteros, himenópteros, coleópteros e ortópteros.

Delta-endotoxina

É a principal toxina, conforme De Barjac & Burgerjon (1971), componente do cristal protéico, sendo sua potência (dose letal média - DL₅₀) para *Pieris brassicae* da ordem de 0,25 g/g de inseto.

Megna (1963), em sua patente, indica a recuperação da endotoxina produzida por filtração do mosto fermentado, com filtro (Celite 512). Estabelece que qualquer

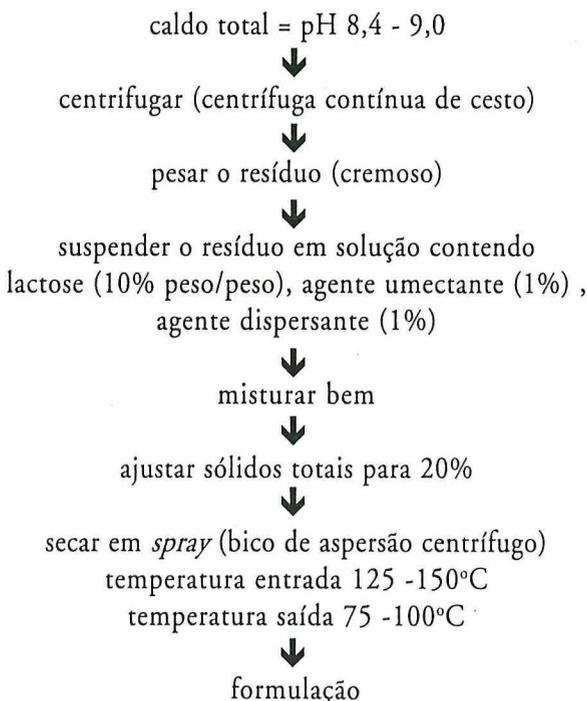
desequilíbrio do suprimento de nitrogênio e carboidrato ao meio de cultura resultará na esporulação incompleta, germinação de esporos e/ou autólise, tornando a recuperação por filtração mais difícil.

Também, já se executou a centrifugação do mosto, e o creme obtido (esporos + cristais) foi suspenso em solução 4 a 6% de lactose e precipitado com acetona. Esse precipitado, filtrado, lavado com acetona e água, foi seco. A potência do sistema foi testada em bioensaios (Dulmage *et al.* 1970; Dulmage & Rhodes 1973).

Qualquer que seja a forma de recuperação desejada ou possível, ela envolverá etapas de purificação e concentração do caldo fermentado, uma vez que este contém água, remanescentes do meio de cultura (sólidos e material dissolvido), fragmentos celulares, esporos e cristais. Essa recuperação é uma outra etapa crítica no desenvolvimento do processo produtivo, pois nela a potência do produto pode ser reduzida, caso o desenho aplicado à recuperação não seja adequado (Bryant 1994).

Para secagem em *spray drier* quando volumes maiores que 10 litros devem ser manipulados, Dulmage (1993) sugere o seguinte esquema:

Recuperação do complexo esporo-cristal de B.t. para produção em escala piloto



Moraes (1993) estudou os parâmetros termobacteriológicos para o B.t. em ensaios de laboratório, visando a definição dos processos de secagem do biopesticida em escala-piloto. Com a pasta centrifugada, obtida da fermentação submersa, acrescentou argila como inerte, e este pré-formulado foi submetido a secagem usando diferentes secadores. A secagem realizada em secador convencional a 90°C apresentou valor de D (índice de redução decimal) de 5,84 horas. A secagem realizada em atomizador a 120, 150 e 180°C apresentou, respectivamente, 9,49 s, 5,88 s, 3,43 s de valor D e valor z (coeficiente térmico) de 135,16°C. A viabilidade relativa foi mantida a 50 e 70°C e sofreu redução a 90°C em secador convencional. No atomizador, a viabilidade relativa decresceu com a elevação da temperatura de 120°C a 180°C.

Beta-exotoxina

Distingue-se a exotoxina do complexo esporo-cristal ao menos em quatro aspectos: termoestabilidade a 121°C por 15 minutos, espectro das espécies de insetos suscetíveis, sintomas diferentes e existência de alguns sorotipos de B.t. não produtores do complexo endotóxico que são produtores da exotoxina termoestável.

Em entomologia, definem-se as endotoxinas produzidas pelos microrganismos entomopatogênicos como sendo aquelas toxinas ligadas à célula microbiana, enquanto as exotoxinas são aquelas excretadas no meio de cultura. Nesse sentido, a toxina termoestável de B.t. é definida como exotoxina.

McConnel & Richards (1959) verificaram que o sobrenadante autoclavado, separado do mosto fermentado de B.t., era tóxico quando injetado em larvas de *Galleria mellonella*, tendo obtido valores de DL_{50} como 0,3 ml/larva ou 2 ml/g de larva. Insetos de outras espécies, *Ostrinia nubilalis*, *Sarcophaga bullata* e baratas das espécies *Periplaneta americana* e *Blata orientalis*, também apresentaram suscetibilidade em testes de injeção de toxina. A adição de exotoxina em dieta alimentar desses insetos apresentou resultado negativo.

Burgerjon & De Barjac (1960) relataram a toxicidade do sobrenadante autoclavado quando ministrado oralmente a alguns insetos das ordens Lepidoptera (*Bombyx mori*, *Pieris brassicae*, *Malacosoma neustria* entre outros), Coleoptera (*Leptinotarsa decemlineata*) e Hymenoptera: (*Pristiphora pallipes*).

Da mesma maneira, Briggs (1960) verificou que o sobrenadante esterilizado de mosto bacteriano filtrado inibia o desenvolvimento da larva da mosca doméstica. O termo *fly toxin* ou *fly factor*, fator responsável pelo vôo do inseto, foi então adotado para descrever a entidade tóxica responsável, visto que o inseto, quando não morria, tinha suas asas deformadas, além de outros defeitos teratológicos.

Simultaneamente, foi demonstrado por diferentes autores que produtos comerciais obtidos de B.t. podiam ser ministrados a galinhas e vacas, sendo que a exoto-

xina remanescente nesses produtos mantinha sua atividade tóxica, atuando contra moscas cujas larvas ou pupas infestavam as fezes desses animais, exercendo assim um controle sobre os insetos que viriam a se desenvolver (Gingrich 1965). Não sabiam se a exotoxina passava intacta através do trato intestinal do animal, ou se os esporos do B.t. contidos no complexo esporo-cristal tóxico, passando intactos, germinavam nas fezes, produzindo novas quantidades de exotoxina (Morales 1981).

Estudo sobre o efeito da exotoxina em *Anagasta kuehniella* foi desenvolvido por Yamvrias (1962). Sua pesquisa com o sobrenadante do mosto fermentado demonstrou atividade tóxica tanto injetado como na alimentação da larva. Comparou a velocidade de ação do componente tóxico obtido de duas variedades diferentes de B.t., limitando-se, no entanto, a um número pequeno de insetos; houve uma alta mortalidade no lote-testemunha, que prejudicou, mas não invalidou seus resultados.

Sebesta *et al.* (1981) afirmaram que a produção da exotoxina se dá durante a fase exponencial do crescimento, completando-se na esporulação. A Figura 26.9 ilus-

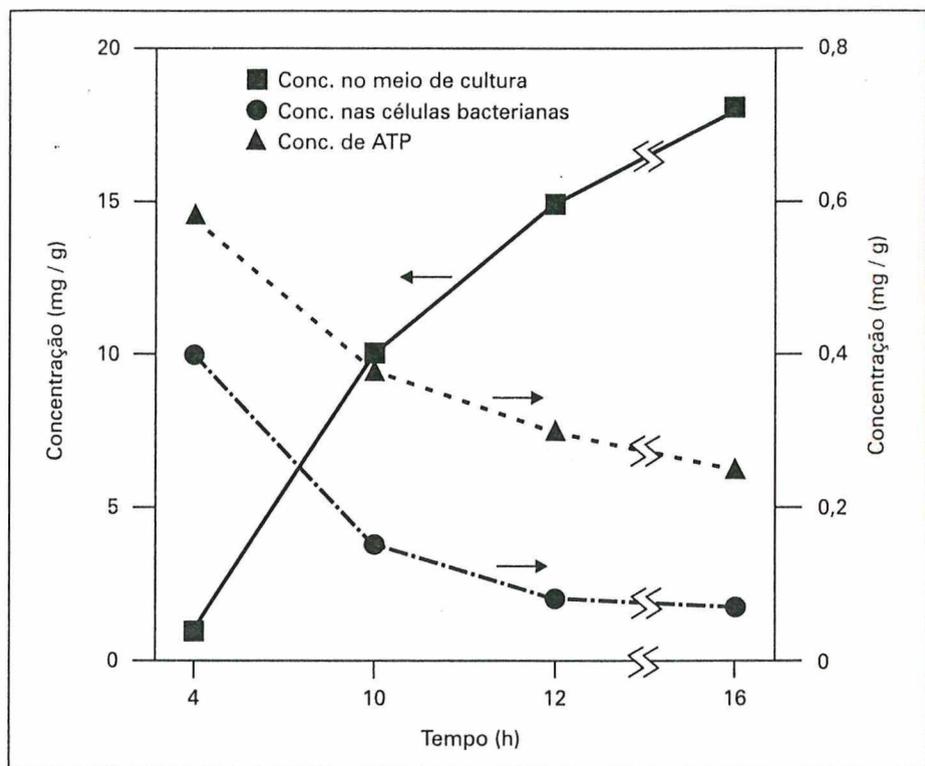


Figura 26.9. Concentração de thuringiensina e ATP durante fermentação de *Bacillus thuringiensis* (Morales 1981).

tra essa produção, sendo a exotoxina denominada thuringiensina. É interessante observar que a concentração de thuringiensina diminui na célula bacteriana entre nove e dezesseis horas, enquanto aumenta a concentração no sobrenadante da cultura.

Kim & Huang (1970) descreveram o processo usado para isolar exotoxinas puras de *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* (Figura 26.10).

Segundo Faust (1973), normalmente a variedade *thuringiensis* produz concentração aproximada de 50 mg de exotoxina por litro do sobrenadante separado do mosto fermentado. Essa separação se faz por centrifugação, com posterior esterilização a

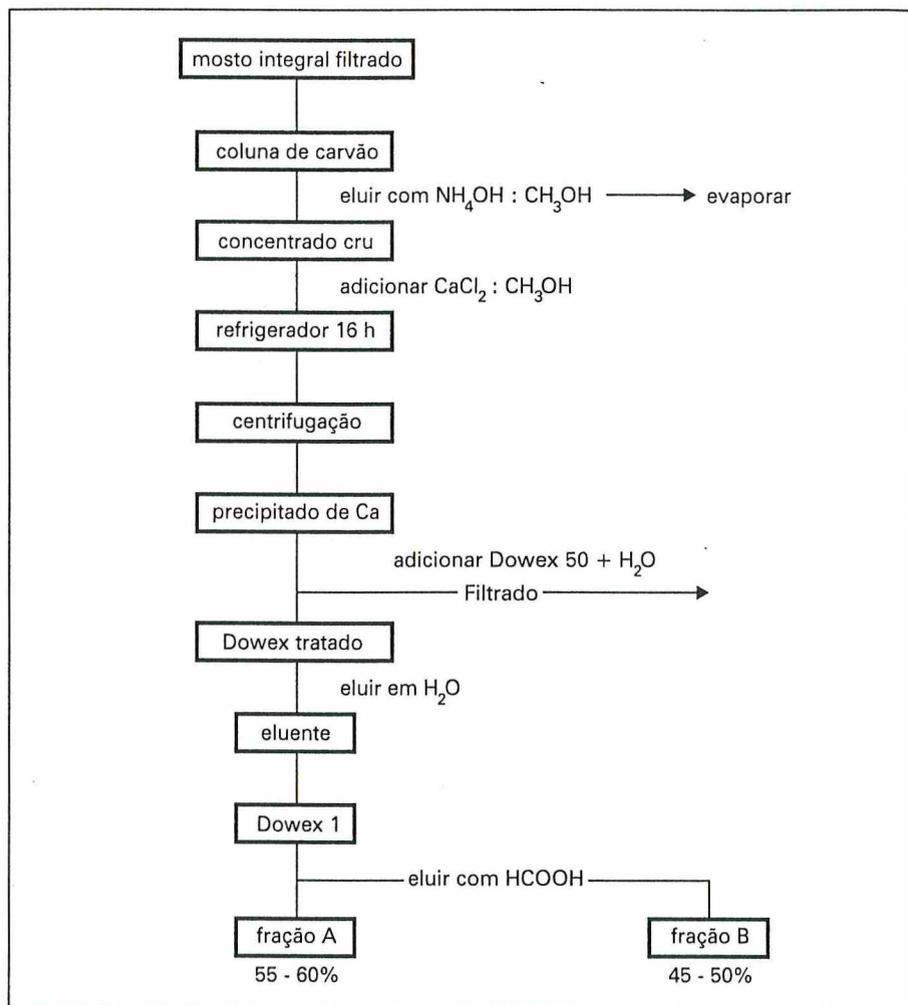


Figura 26.10. Fluxograma para isolamento de exotoxinas de *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* (Kim & Huang 1970).

121°C, por 15 minutos, do fluido resultante. A purificação se faz por adsorção da exotoxina em carvão, com posterior eluição com solução de etanol a 50%. O eluído é concentrado e cromatografado em papel ou fracionado usando Dowex 1 em coluna. Após eluição com formiato de amônia 0-1,5 M, efetua-se a dessalinização em Sephadex e o produto resultante é empregado em bioensaio para determinação da toxicidade.

No Brasil, o estudo do desenvolvimento da exotoxina de B.t. foi realizado por Moraes (1981) e o produto foi testado contra algumas espécies de moscas com bons resultados. Foi depositada patente do processo, que recebeu o Prêmio Governador do Estado em 1985, tendo sido citada em dois livros internacionais que tratam de mulheres inventoras (Moussa 1986, 1995).

Ensaio e formulação

Com inseticidas químicos, a produção pode ser bem controlada, pois a normalização desses produtos pode ser expressa em porcentagem de ingredientes ativos, já que os mesmos são quimicamente definidos e seus efeitos bem determinados (Burgess 1967; De Barjac & Burgerjon 1971). Já os produtos de B.t. poderão conter até três princípios ativos (esporo, cristal e exotoxina), necessitando de bioteste: contagem de esporos (método presuntivo) e bioensaios com insetos (conclusivo), para determinar a potência do produto. A contagem de esporos ou de cristais, como único método, não tem relação com a atividade da toxina, uma vez que o processo de obtenção pode modificar a atividade dos componentes tóxicos (Heimpel & Angus 1963).

O caldo fermentado deve ser estabilizado antes de ser utilizado, de forma a não perder a potência. Assim, a remoção de fragmentos celulares e compostos intermediários da fermentação que podem "desativar" o composto tóxico é feita através de lavagens e centrifugações sucessivas da biomassa com soluções de pH controlado (entre 7 e 8), permitindo a limpeza e estabilização das unidades tóxicas. Ao mesmo tempo, a redução do líquido em que esteve suspensa a biomassa aumenta a potência do caldo total. O controle de qualidade é vital durante esse procedimento, pois minimiza variações inevitáveis que podem ocorrer com o processo biológico (Bryant 1994).

De acordo com normas nacionais e internacionais (Tompkins *et al.* 1990; Nardo *et al.* 1995), um pesticida, para ser registrado, necessita apresentar resultado oficial de dosagem de ingrediente ativo. Nos Estados Unidos estabeleceu-se em 1971 o uso de unidades internacionais (UI) para expressar a potência dos produtos à base de B.t., sendo para isso necessária uma preparação padrão. A primeira preparação, fornecida pelo Instituto Pasteur, França, foi designada E-61, continha B.t. var. *thuringiensis* e à sua potência verificada em bioensaio contra *Trichoplusia ni* (Hubner) foi atribuído

o valor arbitrário 1 000 UI/mg. Esse padrão existe até hoje no Instituto Pasteur, tendo sido utilizado para padronizar os padrões 1-S-1971 e 1-S-1980, ambos obtidos a partir de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, e com potências de 18 000 e 16 000 UI/mg, respectivamente. Para B.t.i. produziram-se dois padrões IPS-78 e IPS-80, que não se mostraram estáveis, tendo sido substituídos pelo IPS-82, com potência de 15 000 UI/mg.

Os bioensaios de padronização nesse caso, podem ser realizados segundo protocolos da Organização Mundial de Saúde (OMS) ou do órgão federal americano (USDA). Com o surgimento de variedades ativas contra outros insetos, as normas de registro estão sendo revisadas, sendo que se observam nos rótulos atualmente as unidades internacionais acompanhadas da porcentagem em peso do ingrediente ativo (esporo + cristal) (Tompkins *et al.* 1990; Dulmage *et al.* 1990).

Alguns autores apontam ainda a impossibilidade de se ter inseto-padrão internacional por dificuldades da legislação de alguns países que exigem quarentena. Por outro lado, é questionável se é melhor usar um inseto-teste ou vários, a fim de obter uma útil complementação de informações. Além disso, para se obter resultados reprodutivos, é preciso ter uniformidade dos insetos (idade e peso), constância de fatores climáticos e quantidade de alimento administrado.

De Barjac & Burgerjon (1971) afirmam que, na rotina industrial, a constância de características do produto deve ser verificada através de amostra referência, sendo que cada produtor terá seu próprio padrão de qualidade.

Para a exotoxina, Burgerjon (1965) comenta a menor relação existente entre a contagem de esporos e a toxina termoestável do que para a endotoxina. Ele propõe a utilização de uma amostra-padrão para que o produtor padronize seu produto por referência, usando o inseto-teste preferido.

De Barjac & Lecadet (1976) apresentam uma metodologia para a dosagem bioquímica da toxina, utilizando os substratos usados para a dosagem de RNA-polimerase, afirmando haver uma boa correlação entre este e o método de aplicação de bioensaio.

Principais avanços *versus* processo fermentativo

O B.t. permanece sendo o foco principal dos estudos e pesquisas sobre pesticidas microbianos. Desde sua descoberta até aproximadamente 1978, pensava-se que sua atividade tóxica se limitava à ordem Lepidoptera, e as variedades conhecidas até a época eram a base dos produtos conhecidos das grandes companhias, como Abbott, Sandoz e Novo.

As descobertas mais recentes de linhagens que atuam contra nematóides, ectoparasitos de animais (como ácaros) e endoparasitos (protozoários), bem como as

descobertas mais antigas da atividade contra Coleoptera e Diptera, criaram uma gama maior de oportunidades. Novos produtos estão sendo lançados no mercado contendo linhagens patenteadas nos EUA ou apresentando formulações aquosas especiais que permitem o uso em aplicadores terrestres e aéreos convencionais.

O uso da engenharia genética e técnicas não-recombinantes tem gerado variedades com maior ou mais ampla atividade, bem como possibilitado novas formulações. Produtos já foram lançados contendo a toxina do B.t. internamente a *Pseudomonas*, sendo que essas últimas são unidades não-viáveis, não apresentando preocupações do ponto de vista ambiental. A tecnologia da recombinação genética permitiu a inserção do gene responsável pela produção da toxina de B.t. em diferentes hospedeiros, tais como *Escherichia coli*, *B. subtilis* e algas (Waalwijk 1993). Também já se inseriu o gene da toxina de B.t. em *Clavibacter xyli* var. *cynodontis* (bactéria endofítica em milho), que coloniza rapidamente as raízes, folhas e colmo do milho, onde permanece durante toda a vida da planta. É possível também, por meio de outro vetor (*Agrobacterium tumefaciens*), inserir-se genes de B.t. para que expresse a síntese de δ -endotoxina nos tecidos de plantas de algodão, tomate, batata, fumo e outras culturas de interesse econômico, tendo sido conseguida também a inserção direta dos genes nas plantas. Além da sua nova ação inseticida, apresenta como vantagem ao ambiente o fato de não sobreviver fora da planta.

Outra bactéria chegando ao mercado internacional é *Streptomyces griseoviridis*, um biofungicida que apresenta atividade contra patógenos de semente e de solo. Essa bactéria atua produzindo substâncias antibióticas que inibem o crescimento dos patógenos. Nessa linha, já se estuda também *B. pumilus*, *B. mycooides*, *Enterobacter cloacae*, *Erwinia herbicola*, *Lactobacillus plantarum*. A engenharia genética pode gerar melhorias em outras espécies, que tornarão os produtos ainda mais efetivos.

Em qualquer dos exemplos apontados acima, é indiscutível a importância do processo fermentativo na produção massal dos novos microrganismos, tanto os que contêm ou expressam a toxina de B.t. como aqueles com potencial para o biocontrole, sejam eles obtidos através de manipulação genética ou não. Para todos eles, as variáveis de produção e recuperação apontadas neste capítulo são válidas e devem ser cuidadosamente avaliadas para obtenção de um produto de qualidade. As possibilidades de aumento do potencial de biocontrole apresentadas por um microrganismo podem muitas vezes ser ampliadas desde que o processo de produção seja criteriosamente otimizado.

Bibliografia

- Alves, S. B. (ed.) 1986. Controle microbiano de insetos. São Paulo, Manole, 407 p.
- Auria, R., J. Palacios & S. Revah. 1992. Determination of the interparticular effective diffusion coefficient for CO₂ and O₂ in solid state fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 39: 898-902.
- Avignone-Rossa, C. A., O. C. Yantorno, J. A. Arcas & R. J. Ertola. 1992. Organic and inorganic nitrogen source ratio effects on *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* delta-endotoxin production. *World J. Microb. Biotechn.* 6: 27-31.
- Barjac, H. de & A. Burgerjon. 1971. Microbial control of insects. Seminar 1971. Helsinki - intern. Org. for Biotech. and Biong. Dept. Microb. Helsinki Sect: VI: 32 p.
- Barjac, H. de & M. M. Lecadet. 1976. Dosage biochemique de l'exotoxine thermostable de *Bacillus thuringiensis* d'après l'inhibition d'ARN-polymérase bactérienne. *C.R. Acad. Sc. Paris* 282: 2119-2122.
- Bernhard, K. & R. Utz. 1993. Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides for experimental and commercial uses., p. 255-267. In P. F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Bailey & S. Higgs (ed.), *Bacillus thuringiensis*: an environmental biopesticide - theory and practice. Chichester, John Wiley, 311 p.
- Blokina, T. P., Z. V. Sakharova, Y. N. Ignatenko, I. L. Rabotnova & Y. A. Rantenshtein. 1984. Variability in *Bacillus thuringiensis* under various growth conditions. *Microbiology* 53: 340-344.
- Briggs, J. D., 1960. Reduction of adult house-fly emergence by the effects of *Bacillus* sp on the development of immature forms. *J. Insect Pathol.* 2: 418-432.
- Bryant, J. E. 1994. Commercial production and formulation of *Bacillus thuringiensis*. *Agric. Ecosyst. and Environm.* 49: 31-35.
- Burgerjon, A. 1965. Au sujet de la caracterization des produits a base de *Bacillus thuringiensis* Berliner par rappor an tigrage biologique de la toxine soluble thermostable. *Entomophoga* 10: 55-65.
- Burgerjon, A. & H. De Barjac. 1960. Nouvelles donnes sur le rôle de la toxine soluble thermostable produites por *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Comptes rendues des séances de l'Academie des Sciences* 251: 911-912.
- Burges, H. D. 1967. Standardization of *Bacillus thuringiensis* products: homology of the standard. *Nature* 215: 664-665.
- Capalbo, D. M. F. 1982. Contribuição ao estudo de fermentação de *Bacillus huringiensis*. Dissertação de mestrado, FEAA/Unicamp, Campinas, 81 p.
- Capalbo, D. M. F. 1989. Desenvolvimento de processo de fermentação semi-sólida para obtenção de *Bacillus thuringiensis* Berliner. Tese de doutorado, 2. impressão., FEA/Unicamp, Campinas, 159 p.
- Barjac, H. de e A. Burgerjon, 1971. Microbial control of insects Seminar 1971.Helsinki - intern. Org. for Biotech. and Biong. Dept. Microb. Helsinki Sect: VI: 32 p.
- Barjac, H. de e M.M. Lecadet, 1976. Dosage biochemique de l'exotoxine thermostable de *Bacillus thuringiensis* d'après l'inhibition d'ARN-polymérase bactérienne. *C. R. Acad. Sc. Paris* 282:2119-2122.
- Dulmage, H. T. 1970. Production of endotoxin by variants of *Bacillus thuringiensis* in two fermentation media. *J. Invertebr. Pathol.* 16: 385-389.
- Dulmage, H. T. 1971. Production of delta endotoxin by eighteen isolates of *Bacillus thuringiensis* serotype 3, in 3 fermentation media. *J. Invertebr. Pathol.* 18: 353-358.

- Dulmage, H. T. 1993. Development of isolates of *Bacillus thuringiensis* and similar aerobic microbes for use in developing countries, p. 15-42. In H. S. Salama, O. N. Morris & E. Rached (ed.), *The biopesticide Bacillus thuringiensis and its applications in developing countries*. Cairo, National Research Centre and IDRC, 339 p.
- Dulmage, H. T. & K. Aizawa. 1982. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in nature, p. 209-2237. In E. Kurstak (ed.), *Microbial and viral pesticides*. New York, Marcel Dekker Inc., 720 p.
- Dulmage, H. T. & R. A. Rhodes. 1973. Production of pathogens in artificial media, p. 507-540. In H. D. Burges & N. W. Hussey (ed.), *Microbial control of insects and mites*. London, Academic Press, 861 p.
- Dulmage, H. T., J. A. Correa & A. J. Martinez. 1970. Coprecipitation with lactose as a mean of recovering the spore-crystal complex of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.*, 15: 15-20.
- Dulmage, H. T., A. A. Yousten, S. Singer & L. A. Lacey. 1990. Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis H-14* and *Bacillus sphaericus*. Geneva, UNDP/WHO-TDR, 58 p.
- Ejiofor, A. O. 1989. Status and prospects of biological control of mosquitoes in Nigeria. *Israel J. Entomol.* 23: 83-90.
- Faust, R. M., 1973. The *Bacillus thuringiensis* exotoxin: current status. *Bulletin of the Entom. Soc. Am.* 19: 153-156.
- Foster, S. J. 1994. The role and regulation of cell wall structural dynamics during differentiation of endospore-forming bacterial, p. 255-395. In G. W. Gould, A. D. Russel & D. E. S. Stewart-Tull (ed.), *Fundamental and applied aspects of bacterial spores*. London, Blackwell Sci. Publ., 138 p.
- Freiman, Y. B. & e A. A. Chupin. 1973. Aspects of continuous cultivation of spore-forming microbes from the group *Bacillus thuringiensis*. *Biotechn. Bioeng. Symposium* 4: 259. (Adv. Microb. Eng. Part I.)
- Gingrich, R. E. 1965. *Bacillus thuringiensis* as a feed additive to control dipterous pests of cattle. *J. Econ. Entomol.* 58(2): 363-364.
- Heimpel, A. M. 1967. A critical review of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner and other crystaliferous bacteria. *Ann. Rev. Entomol.* 12:287-322.
- Heimpel, A. M. & T. A. Angus. 1963. Diseases caused by certain spore forming bacteria, p. 21-73. In E. A. Steinhaus (ed.), *Insect Pathology: an advanced treatise*. 2. vol., New York, Academic Press, 689 p.
- Hesseltine, C. W. 1965. A millenium of fungi, food and fermentation. *Mycology* 57: 149-197.
- Kim, Y. T. e H.T. & H. Y. Huang. 1970. The beta exotoxins of *Bacillus thuringiensis* I. Isolation and characterization. *J. Invertebr. Pathol.* 15:100-108.
- Liu, W. M., R. Bajpai & V. Bihari. 1994. High density cultivation of sporeformers. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 72: 310-325.
- Lonsane, B. K., N. P. Ghildyal, S. Budiattman & S. V. Ramakrishna 1985. Engineering aspects of solid state fermentation. *Enzyme Microbiol. Technol.* 7: 258 - 265.
- Lysansky, S. G. & J. Coombs. 1992. Technical improvements to biopesticides, p. 345-350. In Brighton Crop Protaction Conference. Pests and diseases. Farnham, BCPC. 1418 p.
- Lysansky, S. G. & J. Coombs. 1994. Developments in the market for biopesticides, p. 1049 - 1054. In Brighton Crop Protction Conference. Pests and diseases. Farnham, BCPC. 1418 p.
- Martin, P. A. W. & R. S. Travers. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2437-2442.
- McConnel, E. & A. G. Richards, 1959. The production by *Bacillus thuringiensis* Berliner of a heat stable substance toxic for insects. *Can. J. Microb.* 5: 161-168.

- Meadows, M. P. 1993. *Bacillus thuringiensis* in the environment - ecology and risk assessment, p.193-220. In P. F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Bailey & S. Higgs (ed.), *Bacillus thuringiensis: an environmental biopesticide - theory and practice*. Chichester, John Wiley, 311 p.
- Megna, J. C. 1963. US Patent 3076922.
- Moraes, I. O., 1973. Obtenção de inseticidas bacterianos por fermentação submersa. Dissertação de mestrado, FEA/Unicamp, Campinas, 60 p.
- Moraes, I. O., 1976a. Ensaios de fermentação submersa para produção de inseticida bacteriano em minifermentador. Tese de doutorado, FEA/Unicamp, Campinas, 76 p.
- Moraes, I. O. 1976b. Brasil Patente BRPI 7608688. Processo de fermentação submersa para produção de um inseticida bacteriano.
- Moraes, I. O. 1981. Produção, separação e bioensaio da exotoxina termoestável de *Bacillus thuringiensis*, obtida por fermentação submersa. Tese de Livre-Docência, FEA/Unicamp, Campinas, 100 p.
- Moraes, I. O. 1985. Brasil Patente BRPI 8500663. Processo de produção de toxina termoestável de *Bacillus thuringiensis*.
- Moraes, I. O & D. M. F. Capalbo. 1986. Produção de bactérias entomopatogênicas. p. 296-310. In S. B. Alves (coord.), Controle Microbiano de Insetos. São Paulo, Manole, 407p.
- Moraes, I. O., D. M. F. Capalbo & R. O. Moraes. 1991. Multiplicação de agentes de controle biológico, p. 253-272. In W. Bettiol (coord.), Controle biológico de doenças de plantas. Embrapa, Brasília, 388 p.
- Moraes, R. O. 1993. Determinação da viabilidade de *Bacillus thuringiensis* após processo de secagem. Dissertação de mestrado, Feagri/Unicamp, Campinas, 92 p.
- Moo-Young, M., D. MacDonald & A. Ling. 1980. Sensitivity analysis of the Waterloo SCP process in agricultural waste treatment. Can. Agric. Eng. 22: 119 - 124.
- Moussa, F. 1986. Les femmes inventeurs existent - je les ai rencontrées. Geneva, IFIA. 224p.
- Moussa, F. 1995. Inventive women from the Philippines and selected developing countries. Geneva, IFIA. 128 p.
- Mudget, E. 1985. Solid state fermentation of natural birch lignin by *Phanerochaete chrysosporium*. Enzyme Microb. Techn. 7: 150 - 154.
- Nardo, E. A. de, D. M. F. Capalbo, G. J. Moraes de & M. C. B. Oliveira (coords.). 1995. Requisitos para a análise de risco de produto contendo agentes microbianos de controle de organismos nocivos: uma proposta para os órgãos federais registrantes. Jaguariúna, Embrapa/CNPMA, 42 p. (Embrapa/CNPMA - Documentos 2)
- Parra, J. R. P. 1986. Criação de insetos para estudo com patógenos, p. 348-373. In S. B. Alves (coord.), Controle microbiano de insetos. São Paulo, Manole, 407 p.
- Pearson, D. & O. P. Ward. 1988. Bioinsecticidal activity, bacterial cell lysis and proteolytic activity in cultures of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. J. Appl. Bact. 65: 195-202.
- Priest, F. G. 1992. Biological control of mosquitoes and other biting flies by *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis*. J. Appl. Bacteriol. 72: 357-369.
- Sachidanandham, R., N. Rajendran, E. Sivamani, K. Jayaraman, K. Jenny, R. Laforce & A. Fiechter. 1993. Optimization of process parameters for an economic production of biocide, *Bacillus thuringiensis* active against lepidopteran agricultural pests by the use of continuous culture studies, p. 233-252. In H. S. Salama, O. N. Morris & E. Rached. (ed), The biopesticide *Bacillus thuringiensis* and its applications in developing countries. Cairo, National Research Centre and IDRC, 339 p.
- Sebesta, K., J. Farkas & K. Horská. 1981. Thuringiensin, the beta-exotoxin of *Bacillus thuringiensis*, p. 249-281. In H. D. Burges (ed.) Microbial control of pest and plant diseases. London, Academic Press, 925 p.

- Sikdar, D. P., M. K. Majumdar & S. K. Majumdar. 1991. Effects of minerals on the production of the delta-endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Biotechnol. Lett.* 13: 511-514.
- Tianjian, X., M. Tianliang, X. Xinzhu & Y. Zhiwen. 1993a. Metabolic characteristics of *Bacillus thuringiensis* during submerged fermentation, p. 213-220. In H. S. Salama, O. N. Morris & E. Rached. (ed.), *The biopesticide Bacillus thuringiensis and its applications in developing countries*. Cairo, National Research Centre and IDRC, 339 p.
- Tianjian, X., M. Tianliang, X. Xinzhu & D. Qiumei. 1993b. Study on optimization of dissolved oxygen to raise spore count of *Bacillus thuringiensis*, p. 221-226. In H. S. Salama, O. N. Morris & E. Rached. (ed.), *The biopesticide Bacillus thuringiensis and its applications in developing countries*. Cairo, National Research Centre and IDRC, 339 p.
- Tompkins, G., R. Engler, M. Mendelsohn & P. Hutton. 1990. Historical aspects of the quantification of the active ingredient percentage for *Bacillus thuringiensis* products, p. 9-13. In L. L. Hickle, W. L. Fitch. (ed.), *Analytical chemistry of Bacillus thuringiensis*. ACS Symposium Series 432. Washington, 148 p.
- Waalwijk, C. 1993. Engineering *Bacillus thuringiensis* toxins into other bacteria, p. 37-44. In D. J. Beadle, D. H. L. Bishop, L. G. Copping, G. K. Descon & D. W. Hollomon (ed.), *Opportunities for molecular biology in crop production*. Farnham, BCPC, 334 p.
- Yamvrias, C. 1962. Contribution à l'étude du mode d'action de *Bacillus thuringiensis* Berliner vis à vis de la teigne de la farine *Anagasta (Ephestia) kuhniella* Zeller. *Entomophaga* 7: 101-159.
- Yudina, T. T., O. V. Salamakha, E. V. Olekhovich, N. P. Rogatykh & N. S. Egorov. 1993. Effect of carbon source on the biological activity and morphology of paraspore crystals from *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology* 61: 402-407.