

10070
CNPMA
1987

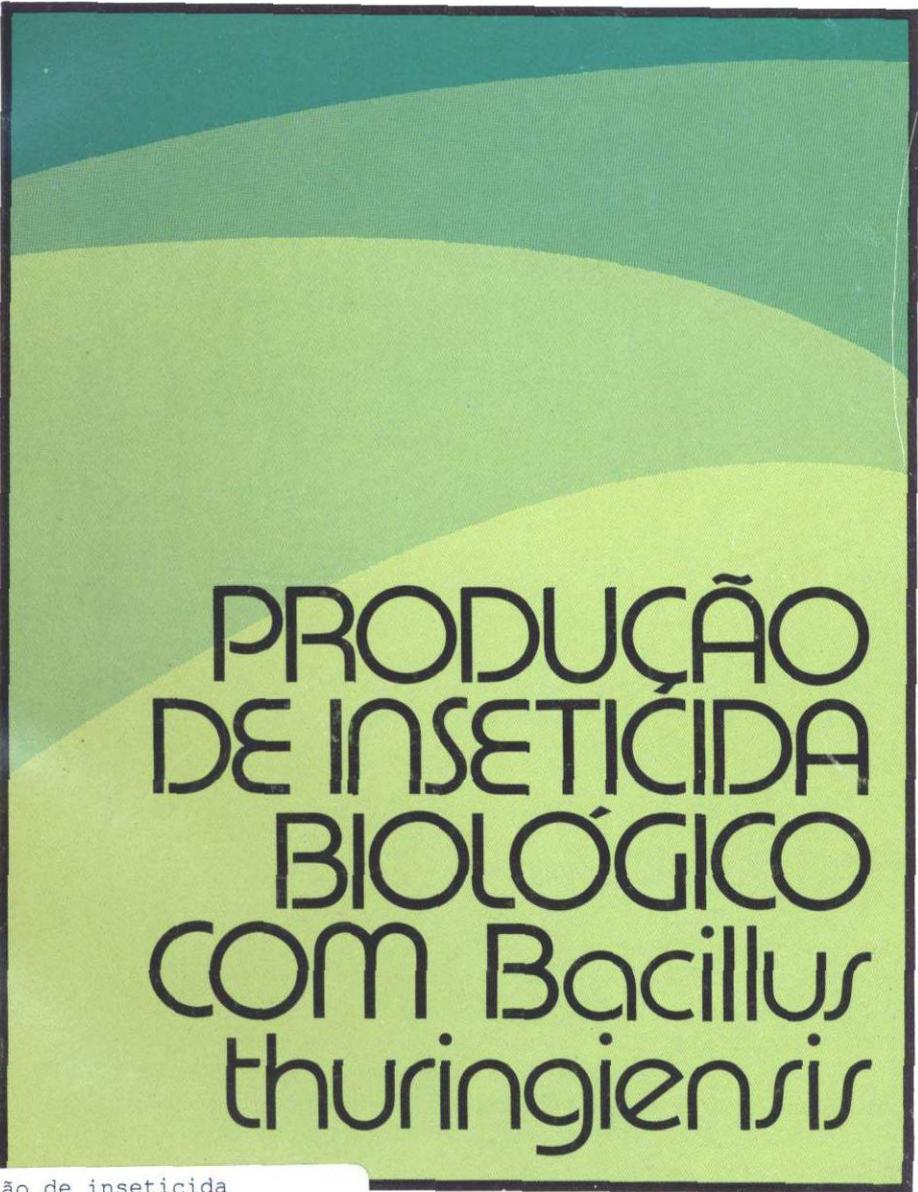
FL-10070

de Pesquisa

ISSN 0102-9363

Número 1

Fevereiro, 1987



PRODUÇÃO
DE INSETICIDA
BIOLÓGICO
COM *Bacillus*
thuringiensis

Produção de inseticida

1987

FL-10070



37514-1

Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA

↳ Agricultura

quisa de Defesa da Agricultura - CNPDA

República Federativa do Brasil

Presidente: José Sarney

Ministro da Agricultura: Iris Rezende Machado

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA

Presidente: Ormuz Freitas Rivaldo

Diretores: Ali Aldersi Saab

Derli Chaves Machado da Silva

Francisco Ferrer Bezerra

**PRODUÇÃO DE INSETICIDA BIOLÓGICO
COM *BACILLUS THURINGIENSIS***

Deise M.F. Capalbo
Iracema de Oliveira Moraes



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA
Vinculada ao Ministério da Agricultura
Centro Nacional de Pesquisa de Defesa da Agricultura - CNPDA
Jaguariúna, SP

Copyright © EMBRAPA - 1987

Exemplares desta publicação podem ser solicitados ao:

CNPDA

Rodovia SP 340, Campinas/Mogi-Mirim, km. 127,5

Telefones: (0192) 97-1077, 97-1031

Telex: (019) 2655

Caixa Postal 69

13820 Jaguariúna, SP

Tiragem: 1.000 exemplares

Capalbo, Deise Maria Fontana.

Produção de inseticida biológico com *Bacillus thuringiensis*, por Deise Maria Fontana Capalbo e Iracema de Oliveira Moraes. Jaguariúna, EMBRAPA - CNPDA, 1987.

15p. (EMBRAPA-CNPDA. Boletim de pesquisa, 1)

1. Inseticida biológico - Produção. 2. *Bacillus thuringiensis*. I. Moraes, Iracema de Oliveira. II. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Defesa da Agricultura. III. Título. IV. Série.

CDD 632.96

SUMÁRIO

Introdução	5
Histórico	5
Produção comercial	6
Produção	6
Fermentação descontínua	6
Fermentação contínua	7
Produção	8
Meio de cultura	9
Inoculação e incubação	9
Separação das toxinas	9
Delta endotoxina	10
Beta exotoxina	10
Ensaio e formulação	10
Comercialização e aplicação	11
Referências bibliográficas	13

PRODUÇÃO DE INSETICIDA BIOLÓGICO COM *BACILLUS THURINGIENSIS*

Deise M.F. Capalbo¹
Iracema de Oliveira Moraes²

INTRODUÇÃO

O Brasil é um país favorecido pela grande extensão de terras agricultáveis ao lado da diversidade de climas de suas regiões. Não obstante o desenvolvimento que a agricultura apresentou nos últimos vinte anos, as pragas têm sido responsáveis por 30-40% de perdas, tanto para o produto no campo quanto para o produto armazenado. Neste quadro, o Brasil é provavelmente um dos grandes mercados para defensivos agrícolas.

Dentre as alternativas propostas para o controle de insetos-praga, surgiu o uso de entomopatógenos incluindo vírus, bactérias e fungos, que são relativamente específicos e podem apresentar baixa ou nenhuma toxidez aos vertebrados e insetos benéficos. O emprego de inseticida bacteriano obtido através de cultura de *Bacillus thuringiensis* apresenta-se eficaz contra certo grupo de insetos-praga, e no mercado externo esse tipo de inseticida é produzido e comercializado por diversos laboratórios.

O Brasil apresenta-se até o momento como importador razoável (279 toneladas em 1980 e 17 toneladas em 1981) e com pesquisas ainda no nível de laboratório. Tais pesquisas entretanto, têm demonstrado grandes possibilidades de produção em larga escala em nosso país.

Histórico

Bacillus thuringiensis é uma bactéria mesófila, aeróbica ou anaeróbica facultativa, gram positiva, que apresenta um corpo paraesporal na célula esporulada. Foi isolada pela primeira vez no Japão, em 1902, de uma lagarta de bicho da seda, sendo posteriormente denominada *Bacillus thuringiensis* var. *sotto*. Em 1915, Berliner isolou *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* de *Anagasta kuehniella*, na Alemanha. Em 1954 foi demonstrado que o corpo paraesporal era um cristal protéico, o qual atua como potente toxina contra determinados insetos.

¹ Eng^a - Alimentos, M.Sc., Pesquisadora, EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Defesa da Agricultura - Caixa Postal 69, CEP 13820 Jaguariúna, SP.

² Eng^a - Alimentos, Professora Titular, UNICAMP/Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia - Cidade Universitária "Prof. Zeferino Vaz", Caixa Postal 6121, CEP 13100 Campinas, SP.

Autores como Heimpel (1962), Lecadet (1970), Angus & Luthy (1973) e Cooksey (1973) revisaram detalhadamente o efeito desse cristal protéico, também chamado “delta-endotoxina”, em larvas de lepidópteros. Resumidamente pode-se dizer que esta toxina é hidrolizada por enzimas do processo digestivo pelo pH alcalino do trato digestivo da lagarta. As sub-unidades do cristal atacam o tubo digestivo causando a paralisia.

A ampla gama de lepidópteros susceptíveis, a aparente inocuidade à fauna e flora benéficas, bem como aos vertebrados, e a possibilidade de cultivo “in vitro” foram aspectos positivos para a indústria se interessar pela produção deste bioinseticida em grande escala.

Uma outra toxina, denominada “beta-exotoxina”, termoestável e hidrossolúvel é também produzida pelo *B. thuringiensis* na sua fase vegetativa e tem sido demonstrada sua atividade contra Diptera, Orthoptera e Hymenoptera.

Produção comercial

O interesse comercial no desenvolvimento de produtos para controle microbiano de insetos iniciou em torno de 1950, quando se percebeu a possibilidade de manipular microorganismos capazes de causar destruição ou epizootias em insetos, com a mesma eficiência dos produtos químicos e sem causar danos a organismos benéficos.

Primeiramente, foram as empresas de fermentação que, na procura de novos mercados, se lançaram no estudo da produção de *B. thuringiensis*, 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 comercial que este inseticida bacteriano representava: facilidade de produção, viabilidade e eficácia no controle de alguns insetos-praga.

Para a produção comercial de material de origem microbiana, há necessidade de seleção de uma linhagem bem adaptada ao processo fermentativo bem como adequações de parâmetros do processo a fim de maximizar a produção e realizar o crescimento sob condições econômicas.

PRODUÇÃO

Fermentação descontínua

Desde meados do século, todos os produtos contendo *B. thuringiensis* têm sido obtidos por fermentação submersa, variando apenas a forma de recuperação dos esporos e a formulação final.

A fermentação em meio semi-sólido tem sido testada em laboratórios e também se apresenta promissora. Na China, segundo Hussey & Tinsley (1981) a fermentação em meio semi-sólido é realizada satisfatoriamente pelas comunas, e bons resultados de aplicação no campo foram obtidos. Nos Estados

Unidos o processo chegou a ser patenteado (Dulmage & Rhodes, 1973) porém foi pouco utilizado pelas facilidades que o processo de fermentação submersa apresenta no país.

A composição do meio de cultura para fermentação submersa ou semi-sólida, deve constar de água, carbono e nitrogênio, para biosíntese 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 sê-la para fermentação em submerso, onde o mais aconselhado seria, por exemplo, melação de beterraba, melação de cana, amido de cereais e outros.

O nitrogênio pode ser suprido com sais de amônio, água de maceração de milho e farinha de soja. São necessários sais inorgânicos para o crescimento dos microorganismos, tais como cálcio, zinco, manganês e magnésio. O cálcio é necessário para a termoestabilidade de esporos bacterianos, enquanto que o manganês é requerido para a esporulação. A atividade tóxica do *B. thuringiensis* irá depender do meio empregado e da linhagem utilizada.

Uma das chaves para o sucesso da produção e comercialização do inseticida bacteriano tem sido o desenvolvimento desse meio de cultura. A maioria dos meios de cultura empregados usa produtos totalmente naturais como fonte de carbono, nitrogênio e sais. Essa utilização de subprodutos industriais diminui o custo de produção.

Para produção no Brasil, é interessante usar por exemplo o melação de cana e a água de maceração de milho. Entretanto, a composição do meio de cultura será determinada através de análise de custos comparada com o rendimento das frações endo e exotóxicas.

As condições industriais de operação comumente utilizadas e descritas por vários autores recomendam um pH inicial de 7,2 a 7,6 para o meio de fermentação, o volume de inóculo entre 2 e 5% do volume total de fermentação, sendo esse inóculo obtido de pré-fermentação que garanta que o microorganismo esteja em fase de crescimento logarítmico, a temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e a aeração variável de acordo com o tipo de fermentador. O ciclo de fermentação pode variar de poucas horas (8-10 horas) até dias (3 dias).

Fermentação contínua

A maioria dos processos industriais atualmente conhecidos, diz respeito à técnica de produção do inseticida microbiano em processo descontínuo. Conhecidas as condições ótimas para tal técnica, pode-se empregá-las 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 microbiano e os produtos do seu metabolismo.

Apesar da técnica de cultura contínua ter sido alvo de muitos estudos e utilizada com sucesso para fermentações industriais, o seu uso para microor-

ganismos esporuláveis é raro. Alguns trabalhos como os de Hsu & Ordal (1969), Freiman & Chupin (1973) e Goldberg et al. (1980) mostraram que variações na velocidade de crescimento de microorganismos esporulados, e no teor de carboidratos do meio, aceleram a esporulação.

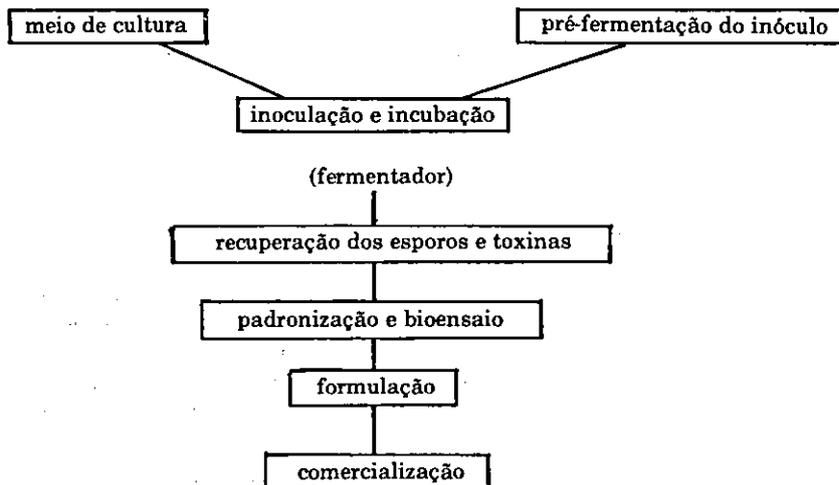
Freiman & Chupin (1973) estudando especificamente *B. thuringiensis* obtido por processo de cultura contínua em dois estádios, obtiveram resultados positivos com um bom grau de maturação celular no segundo estádio do processo. Nesse estudo os autores obtiveram também uma cultura com máxima maturação em processo de dois estádios, onde o segundo atuava como fermentador descontínuo. Goldberg et al. (1980) utilizaram a técnica de cultura contínua para otimizar um meio que possibilitasse alto rendimento do complexo esporo-cristal de *B. thuringiensis*, com sucesso.

Em trabalho recentemente realizado na Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Capalbo (1982) verificou que em condições de laboratório, a fermentação contínua com *B. thuringiensis* é bem sucedida para sistemas com mais de um estádio, sendo um fator econômico importante a diminuição da aeração do último estádio do processo.

Produção

O eficiente desempenho e as características de inocuidade do *B. thuringiensis* fizeram dele o principal candidato para produção e comercialização em larga escala.

Pode-se esquematizar a produção comercial do inseticida *B. thuringiensis*, por fermentação submersa, conforme segue:



Meio de cultura

O meio de cultura requer fontes de carbono e nitrogênio e traços de minerais cujas quantidades dependem do processo fermentativo escolhido.

Melaços, amidos diversos, outros carboidratos, água de maceração de milho, tortas e farelos de oleaginosas, farinha de peixe, etc., são fontes adequadas, muitas das quais já apresentam os traços de minerais necessários por serem resíduos de outros processamentos, em sua maioria em grande disponibilidade no mercado e de baixo custo.

Os substratos escolhidos e disponíveis são adicionados de água, em proporções pré-estabelecidas para fornecer o balanço de nutrientes indispensável ao microorganismo e característico do processo.

A esterilização do meio de cultura é indispensável para que a produção seja máxima e não acarrete contaminantes indesejáveis.

O pH do meio é corrigido para um valor neutro onde o *B. thuringiensis* se desenvolve melhor.

Inoculação e incubação

Uma vez esterilizado o meio de cultura no fermentador, a temperatura é ajustada para $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e promove-se a inoculação com *B. thuringiensis* proveniente de uma pré-fermentação em meio idêntico ao que será inoculado. O volume de inóculo corresponde a cerca de 2-5% do volume total a fermentar. A pré-fermentação assegura que o microorganismo que está sendo inoculado se encontra em estado de desenvolvimento vegetativo exponencial, e costuma durar de 8 a 12 horas. Na fermentação semi-sólida o inóculo é proveniente de uma pré-fermentação líquida.

Após a inoculação caracterizada pelos cuidados com assepsia e esterilidade de manipulação, o fermentador é fechado e se promove a agitação e aeração adequadas ao processo. A agitação e aeração variam em função do volume do fermentador, linhagem do microorganismo e características intrínsecas ao desenho do fermentador.

Na fermentação semi-sólida, o fermentador é agitado continuamente ou não, conforme o modelo de fermentador escolhido, e a umidade do ar é controlada para favorecer o desenvolvimento e esporulação do bacilo.

O tempo de fermentação para ambos os processos pode variar de algumas horas, até dias (2-3 dias) dependendo do tamanho do equipamento e das condições de fermentação.

Separação das toxinas

Em patologia de insetos definem-se as endotoxinas produzidas pelos microorganismos entomopatogênicos como sendo aquelas toxinas ligadas à célula microbiana, enquanto que as exotoxinas são aquelas excretadas no meio de cultura. De acordo com Heimpel (1962), o *B. thuringiensis* possui um

verdadeiro arsenal de toxinas: alfa, beta, gama e delta.

Durante a esporulação, forma-se ao lado de cada esporo tóxico, um cristal protéico, 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 do mesmo e produção de uma fosfolipase C que mata o inseto hospedeiro.

Além dessas endotoxinas, há a exotoxina termoestável que é produzida pelo *B. thuringiensis* na fase de crescimento vegetativo, que é tóxica a alguns lepidópteros, dípteros, hymenópteros, coleópteros e ortópteros.

Delta endotoxina

A principal toxina conforme Barjac & Burgerjon (1971) é o cristal protéico, sendo sua DL_{50} para *Pieris brassicae* da ordem de 0,25 g/g de inseto.

Megna (1963) em sua patente industrial, indica a recuperação do produto por filtração do mosto fermentado com filtro ajuda tipo Celite 512. Verificou-se que qualquer desequilíbrio no suprimento de nitrogênio e carboidrato ao meio de cultura resulta na esporulação incompleta, germinação dos esporos e/ou autólise, tornando a recuperação por filtração mais difícil.

Dulmage (1971) e Dulmage et al. (1970), centrifugaram o mosto, e o creme obtido (esporos + cristal) foi suspenso em solução 4-6% de lactose e precipitado com acetona. Este precipitado, filtrado, lavado com acetona e água foi seco e após foi testado em bioensaios.

Beta exotoxina

Distingue-se a exotoxina do complexo esporo-cristal pelo menos em quatro aspectos: termo-estabilidade a 121°C por 15 minutos, espectro de insetos suscetíveis, sintomas diferentes e existência de alguns sorotipos de *B. thuringiensis* não produtores do complexo endotóxico que são produtores da exotoxina termoestável. Baseados nessas diferenças pode-se separar a endo da exotoxina presentes no mosto fermentado.

Segundo Faust (1973) normalmente o *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* produz concentração aproximada de 50 mg da exotoxina por litro do sobrenadante separado do mosto fermentado. Essa separação se faz por centrifugação com posterior esterelização do fluido resultante a 121°C por 15 minutos.

A purificação é feita por absorção da exotoxina em carvão com posterior eluição com solução de etanol a 50%.

Ensaio e formulação

Com inseticidas químicos, a produção pode ser bem controlada, pois a padronização desses produtos pode ser expressa em percentagem de ingrediente ativo, já que os mesmos são quimicamente definidos e seus efeitos bem determinados. Já os produtos de *B. thuringiensis*, contendo três princípios ativos

(esporo, cristal e exotoxina) necessitam de biotestes: 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, pode não ter relação com a atividade da toxina, uma vez que o processo de obtenção pode modificar a atividade dos componentes tóxicos.

Na rotina industrial a constância de característica do produto deve ser verificada através de amostra referência, sendo que cada produto terá seu próprio padrão de qualidade.

Para a exotoxina, Burgerjon (1965) propõe a utilização de uma solução padrão de referência para que o produtor padronize seu produto pela referência, usando o inseto-teste preferido, uma vez que a relação entre a contagem de esporos e a toxina termoestável é pequena.

Comercialização e aplicação

Entre as metas que se pretende alcançar através do uso de um inseticida microbiano, a primeira é certamente o controle de pragas sem acarretar danos maiores ao ambiente. Para que se atinja esse objetivo, o inseticida precisa ser inócuo, sobretudo ao homem e aos animais benéficos, e ser compatível de utilização com os métodos tradicionais.

Todos os inseticidas bacterianos americanos receberam a isenção dos níveis de tolerância de resíduos da Food and Drug Administration para várias culturas, significando que as agências federais americanas acreditam na inocuidade do produto. Os produtores ingleses de inseticidas à base de *B. thuringiensis* garantem também sua inocuidade.

Quanto à aplicação do *B. thuringiensis* no campo, sabe-se que ele é compatível com alguns inseticidas químicos. Angus & Luthy (1973) apresentam uma revisão sobre inseticidas compatíveis com *B. thuringiensis*; a compatibilidade é expressa como:

Campo: bons resultados obtidos em testes de campo, implicando que sob as condições estabelecidas, o aditivo não reduz a eficiência do inseticida microbiano.

Recomendado: presumivelmente o aditivo é inócuo ao *B. thuringiensis*.

Incerto: com base nos dados reportados, ou devido a não disponibilidade de referência original, o efeito do aditivo no entomopatógeno é incerto.

Seguem-se os inseticidas testados em adição ao *B. thuringiensis*:

Inseticidas adicionados	Compatibilidade
Azinphosmetil	Recomendado
Bidrin	Recomendado

Carbaryl	Campo
DDD	Recomendado
DDT	Campo
Diazinon	Recomendado
Dieldrin	Recomendado
Dinitrocresol	Campo
Endosulfan	Campo
Endrin	Recomendado
Metilparation	Campo
Metiltrition	Recomendado
Mevinfós	Recomendado
Naled	Campo
Piretrinas	Recomendado
Rotenona	Recomendado
Riania	Campo
Toxafeno	Campo

Angus & Luthy (1973)

Até hoje só se tem conhecimento de um caso de processo infeccioso provocado por *B. thuringiensis* em ser humano. O incidente, descrito por Samples et al. (1983), ocorreu pelo contato de um preparado comercial de *B. thuringiensis* (esporos + cristal) com o globo ocular de um rapaz, aplicador aparentemente sadio, e provocou uma úlcera na córnea, sanada pela aplicação tópica de gentamicina em concentração de 1 µg/ml. Em face disso recomenda-se cuidados especiais durante a aplicação: lavar com bastante água e sabão a pele que esteve em contato com o inseticida; lavar os olhos com bastante água em caso de contato; em caso de ter sido inalado, levar a pessoa para ambiente arejado e fresco; se for ingerido, os cuidados irão variar com o tipo de formulação que foi ingerido.

A toxina termoestável do *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* foi testada por Barjac & Riou (1969) os quais observaram que por injeção a tolerância dos ratos à esta toxina é muito grande, e por ingestão ela não acarreta morte ou qualquer problema. Outros autores como Briggs (1960), Cantwell et al. (1964), Heimpel (1962) e Raskova & Maser (1970) afirmam a inocuidade da exotoxina para vertebrados, quando a contaminação é por ingestão.

Deve-se lembrar que a inocuidade absoluta não pode ser garantida em todos os sistemas vivos em todo o tempo. Toxidez ou patogenicidade podem ser geralmente demonstrados caso não se imponham restrições à dosagem, ao tipo de sistema vertebrado ou aos cuidados de aplicação. Uma decisão sobre o campo de uso de um entomopatógeno deve ser baseada em uma prudente consideração dos benefícios a serem obtidos em contraposição ao potencial de riscos de uso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGUS, T.A. & LUTHY, P. Formulation of microbial insecticides. In: BURGESS, H.D.; ed. **Microbial control of insects and mites**. London, Academic, 1973. p.623-38.
- BARJAC, H. de & BURGERJON, A. Microbial control of insects. In: SEMINAR, 1971. Helsinki International Organization for Biotechnology and Bioengineering. Department of Microbiology. Helsinki Section, 1971. 32p.
- BARJAC, H. de & RIOU, J.Y. Action de la toxine thermostable de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* administrée à des souris. **Rev. Pathol. Comp. Med. Exp.**, 6(6):367-74, 1969.
- BOND, R.P.M.; BOYCE, C.B.C.; FRENCH, J.J. A purification and some properties of an insecticidal exotoxin from *Bacillus thuringiensis* Berliner. **Biochem. J.**, 114(3):477-88, 1969.
- BRIGGS, J.D. Commercial production of insect pathogens. In: INSECT pathology; and advanced treatise. New York, Academic, 1963. v.2, p.519-48.
- BRIGGS, J.D. Reduction of adult house-fly emergence by the effects of *Bacillus* spp. on the development of immature forms. **J. Insect Pathol.**, 2(4):18-32, 1960.
- BURGERJON, A. An sujet de la caracterization des produits a base de *Bacillus thuringiensis* Berliner par rapport an tritage biologique de la toxine soluble thermostable. **Entomophaga**, 10(1):55-65, 1965.
- BURGERJON, A. & BARJAC, H. de. Nouvelles donnees sur le rôle de la toxine soluble thermostable produite par *Bacillus thuringiensis* Berliner. **C.R. Séances Acad. Sci.**, 251:911-2, 1960.
- BURGERJON, A. & GRISON, P. Effects de *Bacillus thuringiensis* Berliner sur le potentiel biologique de *Zeiraphera-Diniana*. **Gen. Ann. Sci. For.**, 28:391, 1971.
- BURGESS, H.D. Insect control by microorganisms. **Acad. Naz. Lincei. Boll.**, Roma, 128:189, 1969.
- BURGESS, H.D., ed. **Microbial control of insects and mites**. London, Academic, 1973.
- CANTWELL, G.E.; KNOX, D.A.; MICHAEL, A.S. Mortality of honey bees, *Apis mellifera* Linnaeus, fed exotoxin of *Bacillus thuringiensis*, var. *thuringiensis* Berliner. **J. Insect Pathol.**, 6(4):532-36, 1964.
- CAPALBO, D.M.F. Contribuição ao estudo de fermentação contínua de *Bacillus thuringiensis*. Campinas, FEA/UNICAMP, 1982. Tese Mestrado.
- COOKSEY, K.E. The protein crystal toxin of *Bacillus thuringiensis*. in: BURGESS, H.D.; ed. **Microbial control of insects and mites**. London, Academic, 1973. cap. 11, p.247-74.
- COUCH, T.L. & ROSS, D.A. Production and utilization of *Bacillus thuringiensis*. **Biotechnol. Bioeng.**, 22(7):1295-334, 1980.
- DULMAGE, H.T. Production of delta endotoxin by eighteen isolates of *Bacillus thuringiensis* serotype 3, in 3 fermentation media. **J. Invertebr. Pathol.**, 18:353-8, 1971.
- DULMAGE, H.T.; CORREA, J.A.; MARTINEZ, A.J. Coprecipitation with lactose as a mean of recovering the spore-crystal complex of *Bacillus thuringiensis*. **J. Invertebr. Pathol.**, 15: 15, 1970.

- DULMAGE, H.T. & RHODES, R.A. Production of pathogens in artificial media. In: BURGESS, H.D., ed. **Microbial control of insects and mites**. London, Academic, 1973. cap. 24, p.507-40.
- DUNN, P.H. Control of house flies in bovine feces by a feed additive containing *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner. **J. Insect Pathol.**, 2:13-16, 1960.
- FAUST, R.M. The *Bacillus thuringiensis* exotoxin: current status. **Bull. Entomol. Soc. Am.**, 19(3):153-6, 1973.
- FREIMAN, Y.B. & CHUPIN, A.A. Aspects of continuous cultivation of spore-forming microbes from the group *Bacillus thuringiensis*. **Adv. Microbiol. Eng.**, 4:259, 1973.
- GOLDBERG, I.; SNEH, B.; BATTAT, E.; KLEIN, D. Optimization of a medium for a high yield production of spore-crystal preparation of *Bacillus thuringiensis* Effective against the Egyptian cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* Bois. **Biotechnol. Lett.**, 2(10):419-26, 1980.
- HEIMPEL, A.M. & ANGUS, T.A. Diseases caused by certain spore forming bacteria. In: INSECT pathology; an advanced treatise. New York, Academic, 1963. v.2, cap. 2, p.21-73.
- HERTLEIN, B.C.; HORNBY, J.; LEVY, R.; MILLER JR.; T.W. Prospects of sporeforming bacteria for vector control with special emphasis on their local production potential. **Dev. Ind. Microbiol.**, 22:53-60, 1981.
- HSU, E.J. & ORDAL, Z.J. Sporulation of *Clostridium thermosaccharolyticum* under conditions of restrictive growth. **J. Bacteriol.**, 97(3):1511-2, 1969.
- HUSSEY, N.W. & TINSLEY, T.W. Impressions of insect pathology in the People's Republic of China. In: BURGESS, H.D., ed. **Microbial control of pests and plant diseases**. New York, Academic. 1981. p.785-95.
- LECADET, M.M. *Bacillus thuringiensis* toxins; the proteinaceous crystal. In: MONTIE, T.C., ed. **Microbial toxins**. New York, Academic, 1970. v.3, p.437-71.
- MCCONNELL, E. & RICHARDS, A.G. The production by *Bacillus thuringiensis* Berliner of a heat stable substance toxic for insects. **Can. J. Microbiol.**, 5:161-8, 1959.
- MECHALAS, B.J. & BEYER, O. Production and assay of extracellular toxins by *Bacillus thuringiensis*. **Dev. Ind. Microbiol.**, 4:142-7, 1963.
- MORAES, I.O. **Ensaio por fermentação submersa para produção de inseticida bacteriano em mini fermentador**. Campinas, FEAA/UNICAMP, 1976. Tese Doutorado.
- MORAES, I.O. **Obtenção de inseticidas microbianos por fermentação submersa**. Campinas, FEAA/UNICAMP, 1973. Tese Mestrado.
- NORRIS, J.R. Biological methods of insect control. **PANS**, 14:505-22, 1968.
- NORRIS, J.R. Crystalline inclusions in *Bacillus thuringiensis*. **J. Bacteriol.** 98:824-6, 1969.
- PENDLETON, I.R. & MORRISON, R.B. Insecticides of crystal forming bacteria. **Process Biochem.**, 4(12):29-32, 1969.
- PENDLETON, I.R. & MORRISON, R.B. Separation of spores and crystals of *Bacillus thuringiensis*. **Nature**, London, 212(5063):728-9, 1966.
- RASKOVA, H. & MASEK, K. Pharmacology of bacterial protein toxins. In: MONTIE, T.C., ed. **Microbial toxins**. New York, Academic, 1970. v.1, p.332.

- ROGOFF, M.H. & YOSTEN, A.A. *Bacillus thuringiensis*; microbiological considerations. **Ann. Rev. Microbiol.**, **23**:257-386, 1969.
- SAMPLES, J.R. & BUETTNER, H. Corneal ulcer caused by a biological insecticide (*Bacillus thuringiensis*). **Am. J. Ophthalmol.**, **95**(2):258-60, 1983.
- YORINORI, J.T. Pesticides in Brazilian agriculture; International Symposium on Pesticides Use in Developing Countries: present and future. **Trop. Agric. Res. Ser.**, **16**:1-13, 1982.

