

FACULDADE DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

OBTENÇÃO DE INSETICIDAS BACTERIANOS  
POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Iracema de Oliveira Moraes  
Eng<sup>o</sup> Tecnólogo de Alimentos

Orientador

Prof. Dr. Ricardo Sadir

Livre docente da Faculdade de Tecnologia de Alimentos.

Tese apresentada à Faculdade de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciências em Tecnologia de Alimentos.

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

A meu esposo e filhos pelo  
apoio e compreensão.

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Ricardo Sadir pela orientação constante e eficiente.

Ao Professor Doutor André Tosello, Diretor da Faculdade de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, pelo apoio obtido.

Ao Químico Industrial Antonio José Quirino Simões, pela colaboração nas experiências de laboratório.

Ao Universitário Waldemar Dall'Gallo, Desenhista-Projetista do DAE, pela confecção do papel probabilístico normal empregado no ensaio biológico.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram no desenvolvimento deste trabalho.

- Conteúdo -

<u>Resumo</u>	<u>PÁG.</u>
<u>Summary</u>	
Capítulo I Introdução e Revisão da Literatura	1
Capítulo II - Materiais e Métodos	13
1. Microrganismo	
2. Meios de cultura	
3. Equipamentos	
4. Determinação do crescimento celular	
5. Recuperação do produto	
6. Purificação da endotoxina	
7. Determinação da concentração de pro teína	
8. Normalização do produto. Bioteste	
Cap. III - Resultados e Discussão	22
1. Frascos Agitados	
2. Fermentador	
Cap. IV - Conclusões	30
Cap. V - Índice de Quadros, Gráficos e Apêndices	32
Quadros	
Gráficos	
Apêndices	
Cap. VI - Revisão da Literatura	53
Agradecimentos	

= RESUMO =

Foi pesquisada a produção de um inseticida bacteriano, complexo esporo-cristal, letal a insetos da ordem Lepidoptera que acarretam os maiores danos e perdas à matéria-prima da Indústria de Alimentos. Treze meios de culturas e duas linhagens de Bacillus thuringiensis foram testados.

Melhores rendimentos foram obtidos com Bacillus thuringiensis NCIB 9207, em meios de cultura contendo glicose como fonte de carbono.

Concentrações crescentes de glicose favoreceram o acréscimo no teor de proteína. A velocidade de crescimento bacteriano foi acelerada com até 6g de glicose por litro de meio de cultura; concentrações superiores foram inibitórias.

No fermentador, Mini Ferm, foram obtidas as melhores condições de trabalho,  $\mu = 0,425 \text{ h}^{-1}$  e  $t_d = 1,63 \text{ h}$  (velocidade específica de crescimento e tempo de geração, respectivamente).

A fermentação foi completada em menos de 24 h, enquanto que em frascos agitados demorou no mínimo 48h, acarretando uma produtividade superior, no fermentador.

A taxa de Oxigênio Dissolvido, bem como a variação de pH, foram importantes parâmetros, para estabelecer as fases de crescimento do Bacillus thuringiensis.

O bioteste efetuado com Plodia interpunctella, (Lepidoptera Phycitidae), demonstrou a potência e eficácia do complexo esporo-cristal obtido, tendo sido determinada a concentração letal para 50% de mortalidade,  $CL_{50} = 0,725\%$  (grana de inseticida por grama de alimento)

- SUMMARY -

The best conditions for mass propagation of bacteria which are pathogenic for insects were investigated.

Thirteen culture media and two strains of Bacillus thuringiensis were tested.

Protein concentration of the spore-crystal complex was a function of glucose concentration in the culture medium.

Maximum yield was obtained with 6 g of glucose per liter of culture medium.

In the bench fermentor the specific growth rate,  $\mu = 0,425 \text{ h}^{-1}$ , and the generation time,  $t_d = 1,63 \text{ h}$  were determined.

Oxygen Dissolved rate and pH were found to be important parameters, to establish growth and production phases.

The biological assay with Lepidoptera, has demonstrated the virulence of the spore-crystal complex obtained. The lethal concentration for 50% mortality  $LC_{50}$ , was found to be 0,725% gram of insecticide - per gram of food stratum.

## CAPÍTULO I

### - INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA -

Na luta atual contra insetos nocivos, que afetam a Agricultura, encontram-se duas facções: a dos que defendem o uso dos inseticidas sintéticos e os que optam pelo uso de inseticidas biodegradáveis, face aos problemas de resíduos, poluição, desequilíbrio ecológico, bem como indução de resistência cada vez maior ao inseto.

Segundo de Barjac (10) embora o DDT (dentre os organoclorados), seja ainda um dos melhores produtos em custo de produção e eficácia para os insetos vetores do paludismo e leishmaniose, seu emprego e dos organoclorados, em geral, na Agricultura, tende a desaparecer rapidamente, como ocorreu na Hungria, Suécia e Estados Unidos da América, onde seu uso está proibido ou restrito.

Com o advento dos organofosforados obteve-se vantagem concernente ao problema de resíduos, porém a solução advirá quando um perfeito entrosamento dos meios químico-biológicos, um controle integrado, for aplicado (9, 10, 59, 79, 115).

Dentre os microrganismos entomopatógenos, em potencial para produção de inseticidas microbianos, encontram-se bactérias, fungos, vírus e protozoários (61, 71, 72, 101, 103).

O interesse despertado por produção de inseticidas bio-



degradáveis, inócuos a vertebrados e à flora, apresentam possibilidades de produção econômica em larga escala, conduziu à pesquisa de uma bactéria com características notáveis: Bacillus thuringiensis.

O principal objetivo deste trabalho será a obtenção de um inseticida microbiano, por fermentação submersa, empregando o Bacillus thuringiensis.

Este microrganismo satisfaz aos critérios estabelecidos para um bom inseticida biológico, que são:

a) ~~Especificidade~~, ~~potência~~ e eficácia para os insetos visados.

b) Inocuidade ao homem, vertebrados e insetos benéficos.

c) Produção econômica em larga escala.

Sua especificidade colabora para manter o equilíbrio ecológico, sua inocuidade elimina o problema de resíduos, não tendo sido constatada qualquer forma de resistência em insetos tratados com esse tipo de inseticida, além disso existe a vantagem da compatibilidade deste, com inseticidas químicos, sendo ideal para estabelecer controle integrado (1,7,9,10,28,35,63,72,76,96,102, 118).

Bacillus thuringiensis é uma bactéria mesófila (28°C a 35°C), aeróbia, isolada em 1902 por Ishiwata no Japão e posteriormente, na Alemanha, por Berliner, em 1915 (28, 36, 96, 99, 118). Na morfologia geral e características de cultivo, assemelha-se ao Bacillus cereus, porém, pesquisadores alemães notaram uma importante diferença en

tre êles: as células de Bacillus thuringiensis, crescen-  
do em meio de cultura nutriente, além do endosporo, que  
também ocorre no Bacillus cereus, sintetizam um corpo pa-  
ra esporal. ( 4, 8, 110, 111, 112, 127).

Tal para esporo foi redescoberto por Hannay em 1953, e  
Angus em 1954 demonstrou que era um cristal proteico,  
atuando como potente toxina a determinados insetos (36,  
53, 99, 101, 112).

A possibilidade de utilização do Bacillus thuringiensis  
deve-se à sua patogenicidade e toxicidade a mais de uma  
centena de espécies de Lepidoptera, as quais, na forma  
jovem, apresentam-se sob a forma de lagartas, fitófagas  
em sua absoluta maioria, sendo causa de imensos prejuí-  
zos à Horticultura, Silvicultura, bem como, aos Produtos  
Armaenados( 1, 6, 48, 52, 61, 76, 94, 95, 102, 104, 108  
109).

A principal toxina do Bacillus thuringiensis é o cris-  
tal proteico, também chamado δ endotoxina(9, 34, 35, 38,  
41, 42, 44, 45, 104) Segundo de Barjac (9), estrutura e  
composição química do cristal tóxico, não estão ainda -  
determinados, acarretando a morte do inseto por parali-  
sia geral ou intestinal, logo após a ingestão do cristal.  
Ao lado do cristal temos o esporo tóxico a certos inse-  
tos, mas na grande maioria o complexo cristal-esporo é  
o responsável pela morte do inseto.

Quando uma larva ingere o cristal proteico, a camada e-  
pitelial do intestino médio fica danificada e o inseto-

cessa de se alimentar, advindo a toxemia. O intestino de Lepidoptera varia desde condições de neutralidade à acentuada alcalinidade de (62). Se o epitélio intestinal for danificado, haverá queda de pH, possibilitando a germinação dos esporos que geralmente acompanham os cristais, sendo que as células vegetativas podem passar através da parede celular danificada, ocasionando uma letal septicemia (8, 101, 104).

Certas espécies de Lepidoptera não são suscetíveis ao cristal sozinho, mas ao complexo esporo-cristal, por exemplo: Anagasta, Kühniella(9,55,104) e Tineola Biselliella em Yamvrias C. (125).

Além destas duas toxinas intracelulares, existe uma toxina extracelular, denominada  $\beta$  exotoxina, termorstável e cuja ação se dá sobre outras ordens de insetos, além de Lepidoptera. Foi descoberta por Mc Connel em 1959 - (90). Sua atividade foi demonstrada sobre insetos das ordens: Díptera, Hymenoptera, Coleoptera e Orthoptera(14, 21, 22, 28, 32, 52, 61, 81, 96, 104, 105)

Quanto ao emprego do inseticida microbiano obtido com Bacillus thuringiensis, em florestas do Canadá, Sibéria e Ille de France (6, 21, 107), bons resultados foram conseguidos. Na Horticulura, especialmente na Olericulura, em brássicas folhosas e folhosas diversas, tais como: alface, rúcula, couve, couve-flor, repolho, brócolos, mostarda, bem como tomate e batata(48), o produto é isento de requerimentos de tolerância para uso contra larvas que infestam tais hortaliças, já determinadas pelo

"United States Department of Agriculture" (2, 28, 102).

Interessante notar que, em 1966, em alguns dos estados - dos Estados Unidos da América, foi proibido o emprego de inseticidas químicos, em fumo e recomendado o uso de inseticidas produzidos com Bacillus thuringiensis contra Heliothis virescens (que também é praga do algodão e qui-ri), Protoparce sexta e Protoparce quinquenaculata (praga do tomate), para evitar contaminação do fumo com resí- duos tóxicos dos inseticidas sintéticos (2, 118)

No Texas em 1970 Mc Garr et alii (91, 93) testaram, no campo, o inseticida microbiano e inseticidas químicos no combate a Heliothis virescens, em algodão, obtendo bons resultados com o inseticida microbiano. Na Califórnia, - em 1965 - 1967, Oatman et alii (103), empregaram-no con- tra Heliothis zea ( Boddie ), a mais destrutiva praga de feijão, algodão, tomate e milho (verde e seco ), com óti- mos resultados.

Pinnock , D.E. ( 106) verificou a persistência, no cam- po, de produtos baseados em esporos de Bacillus thurin- giensis, com relação a clima em duas regiões da Califór- nia. Empregou para combate à praga do carvalho obtendo - uma persistência mínima de três dias e máxima de vinte - e dois. O mesmo pesquisador (107) relatou experiências - comparativas entre o inseticida microbiano e sintéticos, considerando excelente o controle com produtos obtidos a partir de Bacillus thuringiensis.

Burgerjon A. et al (23) verificaram a suscetibilidade de

vinte e quatro espécies de Lepidoptera ao Bacillus thuringiensis. Estabeleceram um coeficiente de suscetibilidade cujo padrão  $E_{58}$  é dado para Pieris brassicae L. coeficiente 1, ou 900 U.B (Unidades Biológicas), e foi estabelecida no "Laboratoire de lutte biologique", de "La Minière, France".

Burges H.D. et alii (24, 26, 28, 29) verificaram a possibilidade de controlar Galleria mellonella e Achroia grisella, Lepidoptera (que atacam os favos de mel), usando um produto baseado em Bacillus thuringiensis incorporado à cera da colméia, sem afetar as abelhas.

Dulmage, H. T. et alii (38, 39) testaram a endotoxina contra Trichoplusia ni (Hübner) em hortaliças, obtendo resultados satisfatórios no controle; verificaram a persistência da toxina na planta, sendo o intervalo entre as aplicações determinado pela velocidade de crescimento da planta, que é uma função das condições de temperatura, fertilização e umidade.

White, C.A. et al (124) verificaram a suscetibilidade de quinze espécies, pertencentes a cinco famílias de Lepidoptera, encontrando valores de  $LD_{50}$ , com diferença de até 100 vezes entre a espécie mais e a menos sensível (a mais sensível com  $LD_{50} = 0,12$  mg produto/100 ml suspensão aquosa, e a menos sensível com 150 mg/100ml). Foi empregado o produto comercial Thuricide (complexo esporo-cristal).

Frye, R.D. (51) determinou a suscetibilidade de vários Lepidoptera ao Bacillus thuringiensis durante os anos de 1963 a 1966, usando esporos, tendo obtido percentuais -

de mortalidade variando de 80% a 100%, experiência essa feita exclusivamente em laboratório.

Grigarick, A.A. et al(54) testaram vários inseticidas químicos e inseticidas de Bacillus thuringiensis, obtendo excelentes resultados para o inseticida microbiano contra Trichoplusia ni (Hbn.) em alho. Usaram em duas formulações, obtendo com Bacillus thuringiensis, em pó, resultados comparáveis aos obtidos com Malathion + Perthane e DDT + Toxaphene.

Hall, I.M. (59) reportou as vantagens do controle integrado especialmente em culturas atacadas por Tripes(Thysanoptera) e pulgões (Homoptera, Aphididae) além de Lepidoptera; Os programas de controle integrado visam utilizar da melhor forma os inseticidas, integrando-os, atingindo os insetos de suscetibilidades diversas, evitando o problema de resíduos e indução de resistência, pela aplicação moderada dos inseticidas químicos até certo estágio de desenvolvimento da planta, passando-se a seguir, à aplicação dos inseticidas microbianos en quanto necessário.

Na aplicação dos inseticidas devem ser considerados, os fatores que possam afetar a potência e eficácia do produto, especialmente a viabilidade do esporo tóxico.

Estudo dos fatores como: temperatura e umidade, Ignoffo, C. (66) emprego de hipoclorito de sódio por Ignoffo, C. et al (65), espectro da sensibilidade a antibióticos e sulfanamidas por Ignoffo et al (73), estudos de ecologia por Norris (100), efeito de substâncias voláteis das folhas dos vegetais, por Smirnoff (116), visaram determinar as melhores condições para emprego do Bacillus thu-

ringiensis como inseticida eficaz.

Os primeiros produtos comerciais contendo Bacillus Thuringiensis nos Estados Unidos da América do Norte (USA) surgiram em 1958 (22, 120), sendo que, desde então, procurou-se aperfeiçoar a tecnologia de fermentação, seleção de linhagens e, principalmente foram pesquisadas novas formulações do inseticida.

Com respeito à obtenção do produto, os vários pesquisadores (15,16,32,34,35,41,42,44,60,72,92,104) ratificam a validade das técnicas de fermentação submersa, em escala industrial. Conseguiram bom crescimento e esporulação do microrganismo, associada à produção do cristal tóxico, usando substratos econômicos, tais como: melão, vinhaça, água de maceração de milho, farinha de peixe, de soja, etc. Agitação, aeração, pH e temperaturas ótimas, de produção, devem ser controlados. A composição do meio de cultura para produção em escala industrial, será determinada através de uma análise de custos, comparada ao rendimento das frações endotóxicas e exotóxicas.

Completada a fermentação, recuperam-se os cristais e esporos que são concentrados, secos e moídos a fino pó. Relativamente à formulação, os inseticidas microbianos podem ser preparados como o são os inseticidas químicos isto é, Pó seco, Pó molhável e concentrado emulsionável (1, 76, 102).

Quanto a padronização do produto (27,30,31,36,46,49,50, 92, 123), originalmente acreditavam que a contagem de esporos viáveis fosse um método adequado para determinar a eficácia do Bacillus thuringiensis como inseticida.

Entretanto, diferenças em eficácia de várias linhagens e variações na relação esporo/cristal: eficácia requerem teste envolvendo o inseto, ou seja um bioensaio (50,114)

Em 1966 foi adotado como padrão (123) o E<sub>61</sub> (produzido - em 1961 pelo Instituto Pasteur, Paris, França, cujas características estão apresentadas no Apêndice 1 página 50 e cuja amostra foi recebida do "Centre d'Identification des Bacillus thuringiensis de L'O.I.L.B. de L'Institute Pasteur France". Foi tomado como índice, com um valor de 1000/mg unidades arbitrárias, ou 1000UI/mg sendo UI = Unidades Internacionais.

Atualmente existem no mercado internacional vários produtos, cujas marcas registradas são:

- Biotrol, Thuricide, Agritol, Bakthene e Dipel (USA)
- Sporeine (França)
- Bathurin (Tchecoslováquia)
- Biospor (Alemanha)
- Dendrobacillin ( Rússia)

Os produtos dos Estados Unidos da América usam como inseto teste Heliothis virescens ou Trichoplusia ni e os produtos da França usam Pieris brassicae ou Anagasta Ephestia) Kühniella. Nos últimos Congressos Internacionais (27, 31, 36) tomaram-se algumas resoluções que cada país deve adaptar às suas condições e à sua legislação, por princípio, e secundariamente à infraestrutura técnica, na cadeia produção- distribuição- utilização. Por exemplo, os Estados Unidos da América seguiram por muitos anos a norma de contagem de esporos; recentemente a



"Pesticides Regulation Division" passou a requerer a padronização do produto em Unidades Internacionais (UI), ou seja, utilizando um bio-ensaio. (1, 9, 27, 102).

Observando o rótulo de alguns produtos, encontramos:

Biotrol-XX	7500	UI/mg
Biotrol-Plus	6000	UI/mg
Dipel	16000	UI/mg.

Cada pesquisador pode ter seu próprio padrão se a linha-gem utilizada for diferente da que produz E<sub>61</sub>. Suas características devem ser obtidas pelo desenvolvimento de experimentos comparativos em laboratório e no campo, tendo os métodos, parâmetros técnicos, condições experimentais e inseto teste especificados.

Burges, H.D. (27) coletou resultados de contagem de esporos obtidos por 13 (treze) pesquisadores, em amostras E, T, N (E=E<sub>61</sub>, T = Thuricide, N= Biotrol), os quais, empregando técnicas similares, obtiveram demasiada variação nos resultados, evidenciando que a inconsistência da contagem de esporos torna-se ineficiente para avaliação do poder inseticida.

Fischer, R. (50) também apresentou resultados variáveis para a mesma amostra.

Entretanto o teste biológico apresentou reprodutibilidade; os resultados apresentados por Burges (27) levam a concluir que poucos insetos, ou poucos testes, são suficientes, conforme as pesquisas de Golebiowska e Cavard com técnicas similares. Entre os vários pesquisadores os

insetos-teste utilizados foram: Anagasta Kühniella, Pieris brassicae, Trichoplusia ni, Estigmene acrea e Galleria mellonella.

Uma análise de custos no desenvolvimento do produto, comparando o custo do inseticida microbiano com o do inseticida químico Sevin, foi apresentada num estudo de Ignoffo (72); mostra uma relação de 2:2,5 milhões de dólares, ou seja, o custo para desenvolver o inseticida microbiano é 80% do custo referente ao inseticida químico. Apêndice 2, página 51.

Evidência da inocuidade do produto pode ser obtida por métodos diretos ou indiretos. Historicamente se comprovava que as moléstias dos insetos se propagam a invertebrados, assim como as doenças clássicas do homem e/ou animais, dificilmente se transmitem aos insetos.

Portanto, entomopatógenos naturais são geralmente inócuos a vertebrados.

Além da evidência indireta, testes tem sido efetuados para comprovarem a inocuidade do Bacillus thuringiensis ao homem, sendo que 15% do custo total de desenvolvimento do produto, são gastos em tais testes. (72,104).

Segundo Cirne Lima, L.F. (83), Ministro da Agricultura, Brasil, "Os resíduos decorrentes do excesso, inadequação ou impropriedade do uso de pesticidas, devem ser sempre uma das principais preocupações das autoridades, pelos perigos que oferecem ao homem na sua alimentação ou pela poluição do seu meio ambiente".

A pesquisa visando inseticidas microbianos eficazes, inócuos a vertebrados, sem acarretar resíduos e poluição, é trabalho que deve contar com a cooperação de Bioengenheiros, Microbiologistas, Entomologistas, Entomopatologistas e Ecologistas.

## CAPÍTULO II

### - MATERIAIS E MÉTODOS -

#### 1. MICROORGANISMO:

Foram utilizadas linhagens de Bacillus thuringiensis ATCC 13367 (da "American Type Culture Collection, Md, USA") e Bacillus thuringiensis NCIB 9207 (da "National Collection of Industrial Bacteria, Scotland"), ambas recebidas liofilizadas. Foram re-hidratadas em água destilada estéril e inoculadas em meio de cultura agar nutriente.

Os tubos inclinados foram incubados a 30°C por 72 horas para o desenvolvimento da cultura, verificando-se que para o Bacillus thuringiensis NCIB 9207, no início, a velocidade de crescimento foi mais lenta que para o Bacillus thuringiensis ATCC 13367. Com sucessivas inoculações em tubos de agar nutriente, foi conseguido vigoroso e rápido crescimento para ambas as culturas.

#### 2. MEIOS DE CULTURA:

O meio de cultura de manutenção foi o de agar-nutriente, cuja composição é a seguinte:

Quadro 1	Meio de cultura p/ manutenção
Componentes	g/l de solução aquosa
Extrato de carne	1
Extrato de Levedura	2
Peptona	5
Cloreto de Sódio	5
Agar	15

Para sementeira utilizou o meio de cultura número 9 cuja composição está no Quadro 4, página 35.

Em frascos agitados empregaram-se 13 meios de cultura experimentais afim de obter alto rendimento em endotoxinas (Quadro 2,3,4,5; páginas 33,34,35,36). Para fermentador usou-se o meio número 4 (Quadro 3, página 34).

Todos os meios de cultura foram esterilizados a 121°C, durante 30 minutos e a seguir resfriados a 30°C ± 2°C (que foi considerado o intervalo ótimo de temperatura de fermentação).

### 3. EQUIPAMENTO

#### 3.1 - Experimentos em frascos agitados

Foram efetuados em:

Agitador de movimento recíproco, da "New Brunswick Scientific Co. Inc." Modelo R.8.

Agitador de movimento excêntrico, de mesma marca e Modelo G.53.

Psychrotherm: agitador-incubador de mesma marca Modelo G 27, com câmara de temperatura controlada de 0 a 60°C ± 0,5°C.

Frascos erlenmeyer de 500 ml (capacidade nominal) com 100 ml de meio de cultura.

#### 3.2 - Experimentos em fermentador, em escala de laboratório.

Empregou-se um fermentador da "Fermentation Design Inc", modelo Mini-Ferme M-1000, equipado com:

- a) Vaso de fermentação em vidro Pyrex  
altura 180 mm  
diâmetro 83 mm  
capacidade 57 ml/cm de altura
- b) Agitador Magnético cilíndrico com 5 cm de comprimento por 1 cm de diâmetro.
- c) Controle de temperatura: aquecimento por resistência elétrica e resfriamento com água.
- d) Aeração: Bomba de diafragma da "Metaframe Corp" modelo Comet 90, capacidade máxima 1 litro de ar/minuto.
- e) Rotâmetro "Fast & Tite" 0- 1,5 l/min a 1 atmosfera e 21,1°C.
- f) Filtro para esterilização do ar, com leito em lã de vidro.
- g) Analisador de Oxigênio dissolvido, da "Fermentation Design Inc.", modelo DOAR, dotado de registrador.
- h) Eletrodo da "Fermentation Design Inc." do modelo E-100.
- i) Autoclave elétrica em alumínio, Tipo "All American Automatic Steroclave nº 25-X" da Winsconsin Aluminium Foundry Co., Inc.

#### 4. Determinação do crescimento celular

Foi controlado o crescimento celular, medindo a turbidez do meio de cultura em diversos tempos de fermentação, pa

ra os vários meios de cultura.

Determinações foram feitas empregando-se um Turbidímetro NEL da "Evans Electroelenium Ltd". Halstead, Essex, En gland.

Efetuarão-se as leituras com o filtro verde, os valores estão dados em densidade ótica (DO), e são proporcionais à massa celular obtida.

#### 5. Recuperação do produto. Separação das frações endotóxica e exotóxica

Após concluída a fermentação separa-se o complexo esporo-cristal ou endotoxin do mosto de fermentação, no qual permanecem as exotoxinas.

Emprega-se centrifugação ou filtração e o material cremoso é levado a secar em estufa à vácuo, sendo depois bem moído, resultando um produto concentrado finamente dividido.

Condições de pH e temperatura devem ser observadas para reter viabilidade dos esporos, bem como, toxicidade e eficácia do complexo endotóxico.

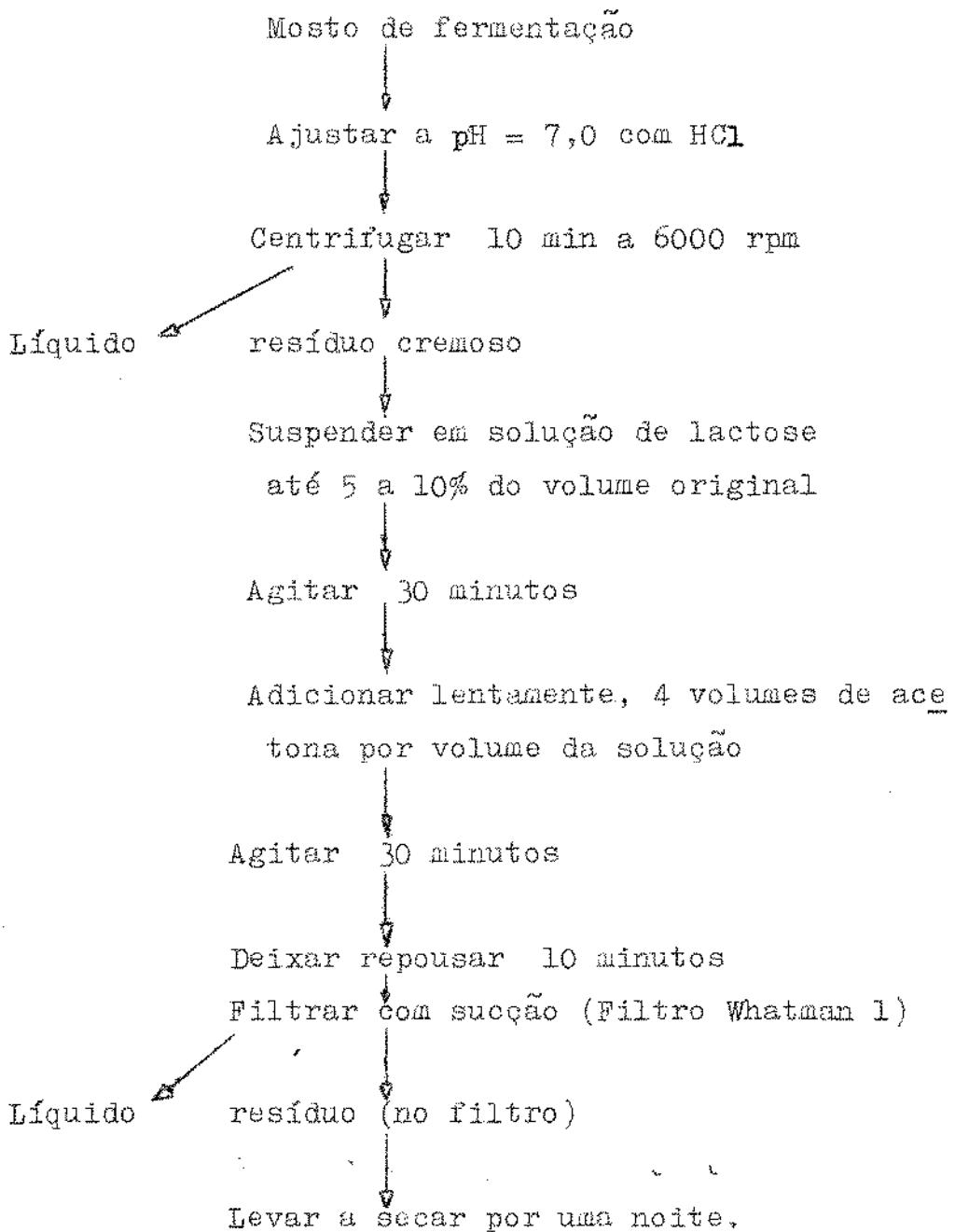
Se a fração exotóxica, for desejável, então o líquido proveniente da centrifugação é levado a "spray drier" para secar (pois é termo-estável), ou então é liofilizada.

#### 6. Purificação da endotoxina

Foi utilizado o método de Dulmage, H, T. (37), de co-precipitação da endotoxina com lactose e acetona, que acarreta um produto de fácil suspensão, para ser usado como

inseticida líquido; O emprego da acetona, sem antes sus  
pender a endotoxina em lactose 5%, acarretava produto de  
difícil suspensão. A lactose se emprega, além disso, pa  
ra proteção ao material biológico.

O fluxógrama do processo, é o seguinte:





## 7. Determinação da concentração de proteína

Foi determinada a concentração proteica, pelo método apresentado por Layne, E. (85) em "Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins".

Baseia-se no fato das proteínas apresentarem um distinto pico de absorção a 280 nm, devido, principalmente, à presença de tirosina e triptofano na amostra. Como os ácidos nucleicos absorvem mais fortemente a 260 nm, que a 280 nm, isto foi empregado para eliminar por cálculo a interferência dos ácidos nucleicos na determinação da proteína.

Utilizou-se um Espectrofotômetro Carl Zeiss, modelo PMQII, empregando cubetas de quartzo com 1 cm de largura, para efetuar as leituras.

Procedimento: Obter a DO de uma solução de proteína diluída a 280 nm e 260 nm.

O coeficiente de extinção  $\beta$  é dado por:

$$\beta = \frac{1}{c} \cdot \frac{1}{d} \ln \frac{i_0}{i} = \frac{1}{c} \cdot \frac{1}{d} \cdot 2,303 \cdot DO$$

onde

c = concentração, mg/ml

d = largura da cubeta, cm

$i_0$  = intensidade da luz incidente

i = " " " " transmitida

DO = densidade ótica

A concentração da proteína (cp) na mistura proteína-ácido nucleico será dada por:

$$cp = \frac{1}{\beta_{280}} \cdot \frac{1}{d} \cdot \frac{\% \text{ proteína}}{100} \cdot DO_{280}$$

Para cada mistura proteína-ácido nucleico, são constantes o percentual de proteína e o coeficiente de extinção  $\lambda_{280}$ , então, pode-se definir  $R = \frac{DO_{280}}{DO_{260}}$  relação esta que corresponde a um fator  $F = \frac{2,303}{\lambda_{280}} \cdot \frac{\% \text{ proteína}}{100}$

Os valores de R e F estão tabelados, afim de facilitar a determinação (Apêndice 3 página 52)

Para calcular a concentração de proteína na mistura a equação se reduz a:

$$C_p = F \cdot \frac{1}{d} \cdot DO_{280} \quad C_p = \text{mg/ml}$$

Para determinar a  $DO_{280}$  e  $DO_{260}$ , após a centrifugação do mosto separando o complexo endotóxico, suspende-se o mesmo em solução de NaOH 0,08N, deixa por 30 minutos e em seguida centrifuga-se novamente fazendo-se as leituras do líquido obtido.

### 8. Normalização do produto. Biotestes

Empregam-se os biotestes para determinar o grau de susceptibilidade do inseto-teste ao inseticida. Nos insetos-teste são verificadas as respostas às aplicações de várias concentrações do inseticida, determinando-se a dose letal média,  $DL_{50}$ , que indica o nível de toxicidade aguda de cada inseticida.

O inseticida microbiano age no inseto, por ingestão, a toxina é ingerida juntamente com o alimento e atua através do canal alimentar. O ponto de absorção é o intestino médio, sendo daí transportada através da hemolinfa

para certos músculos e tubos de Malpighi.

O cristal proteico somente será tóxico em meio alcalino, daí a especificidade a insetos cujo intestino médio possua um pH acima de 7,0. Países produtores de inseticidas microbianos têm o inseto-teste já recomendado. Na Europa utilizam Heliothis virescens ou Trichoplusia ni e na França usam Pieris brassicae ou Anagasta kuehniella.

Para testar nosso produto obtido foi empregado Plodia interpunctella (Hbn., 1813).

São mariposas com 20 mm de envergadura, cabeça e tórax pardo-avermelhados, asas anteriores com dois terços distais com essa mesma coloração e com o basal acinzentado, com alguns pontos escuros muito nítidos. Esse primeiro par de asas é bastante característico e permite a diferenciação desta espécie de outras, conforme Gab et alii (52).

Ataca produtos armazenados: cereais, farinhas, farelos, frutas e doces secos, amendoas, chocolate, etc.

Pertencem à família Phycitidae, da ordem Lepidoptera.

#### Bioteste:

Amostras do farelo com várias concentrações do inseticida e com um número conhecido de lagartas por amostra, foram armazenadas durante um período de tempo.

A concentração letal média,  $CL_{50}$ , foi determinada, traçando-se uma curva pelos pontos cujas coordenadas eram a taxa de mortalidade e a concentração correspondente, plotadas em papel probabilístico normal.

Este papel apresenta a propriedade de que o gráfico de toda função de distribuição, da distribuição normal, se apresenta como uma reta. Assim, sendo, a média é a abs

cissa do ponto de interseção da reta obtida com a horizontal relativa a 50%.

Determinamos a  $CL_{50}$ , em vez de  $DL_{50}$ , devido a dificuldade de determinação da dose letal (DL) realmente ingerida pelo inseto.

Como o inseto teste é uma praga de superfície do produto armazenado, estabelecemos uma relação entre o peso do inseticida e a superfície do alimento, tratada. Utilizamos frascos cuja base apresenta  $78\text{cm}^2$  de superfície. Os resultados estão dados em  $\text{g/m}^2$ . (grama por metro quadrado)

## CAPÍTULO III

### - Resultados e Discussão -

#### 1. Frascos Agitados

Bacillus thuringiensis NCIB 9207 e Bacillus thuringiensis ATCC 13367 foram estudados para determinar a máxima taxa de produção do inseticida bacteriano.

Melhores rendimentos foram obtidos com o Bacillus thuringiensis NCIB 9207, passando-se a utilizá-lo nos experimentos posteriores (Gráfico 1 e 2, páginas 41 e 42).

Os experimentos iniciais foram feitos em agitador de movimento recíproco ou/e excêntrico, à temperatura ambiente, com 200 rotações por minuto (200 rpm) (Gráfico 1, página 41 ).

No Gráfico 2 página 42 , observamos que os resultados obtidos, com o emprego do Psychrotherm com temperatura controlada a  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e 200 rpm, foram melhores que os obtidos anteriormente, por isso optamos pelo Psychrotherm, nos experimentos posteriores.

Os frascos usados foram erlenmeyer de 500 ml (nominal) com 100 ml de meio de cultura.

#### 1.1 - Efeito da concentração de glicose sobre o crescimento celular

Verificamos pelos Gráficos 3 e 4 (páginas 43 e 44 ) que o crescimento bacteriano é afetado pelas diferentes con

centrações de glucose, obtendo-se um máximo com 6 gramas de glucose por litro de meio de cultura, e menores valores para concentrações superiores ou inferiores a este valor.

Pelos Quadros 2 e 7, (páginas 33, 37) e Gráfico 3 (página 43) verificamos o mencionado para 3 g/l e 5 g/l bem como para 7 g/l e 8 g/l nos Quadros 2, 7 e 10, Gráfico 4 (páginas 33, 37, 39, 44).

## 1.2 - Efeito da fonte nitrogenada sobre o crescimento celular.

O Gráfico 5 (página 45) mostra a influência da fonte nitrogenada no crescimento celular, observando-se que o meio contendo peptona deu mais rápido crescimento; pode-se observar que a tangente à curva de crescimento, durante a fase logarítmica, apresenta maior inclinação, seguida daquela apresentada pela triptose e por último a da triptona.

Convém lembrar que a taxa específica de crescimento, u velocidade específica de crescimento, é dada pela expressão matemática:

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt}$$

onde  $x$  = concentração celular (função da densidade ótica) ; g/l

$t$  = tempo ; h

$\mu$  = velocidade específica de crescimento;  $h^{-1}$

Por outro lado,  $\mu$ , é representada gráficamente pela tan

gente à curva de crescimento (X versus t), no intervalo de tempo considerado.

Pelos resultados de peso seco no Quadro 10 (página 39) vemos que o meio 8 (com triptose) apresenta melhor rendimento que o meio 13 (com peptona) vindo a seguir o meio-9 (com triptona)

### 1.3 - Variação de pH, durante a fermentação.

Observando-se o Gráfico 6 (página 46), vemos que o pH decresce nas primeiras horas de fermentação, atingindo um mínimo no entorno de 16 horas.

A seguir, passa a aumentar até um valor que permanece constante após as 48 h de fermentação.

No caso de meios com glucose o pH máximo atingido foi menor que o pH inicial (pH = 7,3), mas nos demais meios o máximo valor de pH ultrapassou o valor inicial. O Quadro 9 mostra essa variação.

Quando o pH final é maior que 7,0, o processo de recuperação deve receber cuidados especiais, devido aos problemas acarretados pela alcalinidade do mosto ao cristal proteico.

Estima-se que parte do produto que seria obtido como peso seco tenha passado à fração aquosa durante a centrifugação, porisso o rendimento esperado para o meio 13 (com peptona) foi menor que o do meio 8 (com triptose) conforme se observa no Quadro 10 (página 39), contradizendo o Gráfico 5.

O meio 10 (com amido) apresentou seu mínimo de pH (Quadro 9), no entorno de 8 h e pH maior que os outros meios estudados durante toda a fermentação (48 h).

#### 1.4 - Efeito do meio de cultura na concentração de proteína.

O Quadro 11 (página 39) mostra que a variação na concentração de glucose acarretou variação na concentração de proteína. O meio de cultura 13 (sem glucose) apresentou menor teor de proteína que o daqueles com glucose - (2,10 mg/ml).

Concentrações crescentes de glucose (3 g/l, 5 g/l, 7 g/l) acarretaram concentrações crescentes de proteína (2,52-mg/ml, 2,86 mg/ml e 3,06 mg/ml respectivamente)

#### 1.5 - Efeito da adição de melaço, ou "Milhocina 50%" - (Água de maceração de milho) ao meio de cultura.

Os meios de cultura 11 e 12 (Quadro 5, página 36) apresentam como fonte nitrogenada a caseína hidrolizada e foram suplementados com melaço ou "Milhocina 50%".

Resultados de peso seco no Quadro 10, (página 39), - mostram que aquele com "Milhocina 50%" apresenta rendimento ligeiramente superior ao daquele com melaço, porém é inferior ao rendimento obtido com os demais meios excetuando aqueles com glucose, cuja concentração foi -  $\leq 5$  g/l.

#### 1.6 - Eficiência de recuperação do produto.

Concluída a fermentação foram comparados dois processos



de recuperação do complexo esporo-cristal proteico.

Os resultados estão no Quadro 10 (página 39).

No caso de filtração em Buchner usando papel de filtro-Whatman nº 42, a retenção foi muito menor que usando - centrifugação seguida de co-precipitação com lactose e acetona.

As porcentagens de retenção em filtração relativa a centrifugação dão os seguintes resultados:

$$r_1 = \frac{2,62}{3,5} = 75\% \quad \text{para o meio 3}$$

$$r_2 = \frac{3,0}{5,0} = 60\% \quad \text{para o meio 5}$$

$$r_3 = \frac{1,08}{5,95} = 18\% \quad \text{para o meio 8}$$

$$r_4 = \frac{1,05}{4,92} = 21\% \quad \text{para o meio 9}$$

O método de co-precipitação é mais eficiente que o de - filtração, tendo sido escolhido, pelo rendimento apre - sentado, embora demande mais tempo.

Nosso maior rendimento foi de 6,5 g/l, usando o meio de cultura 4, o tempo total de fermentação foi 48 horas.

Resultado de literatura, Dulmage (39), dá 7 g/l para o - meio de cultura 10 em fermentação de 72 a 96 horas.

Com meio de cultura 10, nosso resultado foi 5,5 g/l po - rém com 48 h de fermentação.

#### 1.7 - Potência e eficácia do complexo esporo-cristal.

Nossos resultados para o bioteste foram satisfatórios.

Comparamos com o único resultado disponível, de teste -

com inseto de grão armazenado, obtido por Newmark (94) com Anagasta kuehniella (Lepidoptera, Phycitidae). Nossos resultados estão no Quadro 13 expressos em  $g/m^2$  e  $g/100g$  alimento em relação à taxa de mortalidade, obtida para Plodia interpunctella (Lepidoptera, Phycitidae). O resultado de Newmark para 75% de mortalidade foi  $37,2 g/m^2$  enquanto que o nosso, para 70% e 77,5% foi  $25,8 g/m^2$  e  $32, g/m^2$  respectivamente.

Em papel probabilístico normal determinamos a taxa de mortalidade em função da concentração do inseticida no alimento, tendo-se determinado a  $CL_{50}$ , Gráfico 9, página 49.

Nosso resultado foi 0, 725% grama de inseticida para -- grama de alimento para  $CL_{50}$ .

Newmark (95) encontrou  $DL_{50} = 0, 27\%$ . No **nosso** experimento não determinamos a dose letal, realmente ingerida (DL) mas sim a concentração letal fornecida ao inseto (CL).

## 2. Fermentador

O experimento com fermentador Mini-Ferm, visou comparar os resultados obtidos, com aqueles dos frascos agitados. Foi feito em descontínuo para se obter informações em escala piloto, que poderão ser macro-escaladas futuramente, e servirão para estudos posteriores de fermentação contínua.

Utilizamos 500 ml do meio de cultura 4, (Quadro 3, página 34) por ter apresentado os melhores resultados em frascos agitados a 30 C, 280 rpm, incubados 24 horas, pa

ra atingir a máxima taxa de crescimento.

As condições de agitação e aeração foram 500 rpm e 1 - vvm (volume de ar estéril, por volume de meio por minuto) respectivamente.

O pH inicial de fermentação foi 7,3 e a temperatura controlada a 30 C durante toda a fermentação que se manteve por 24 horas, quando se efetuou a recuperação do produto (segundo o método de co-precipitação com lactose e acetona. Capítulo II - 6 página 16).

Observando o Gráfico 7 (página 47) vemos que a variação na taxa de Oxigênio Dissolvido (OD) foi uma função das fases de fermentação.

Tivemos a fase de latência de  $t_0$  a  $t_3$ , passando à fase-transiente de  $t_3$  a  $t_7$ , a seguir a fase logarítmica de  $t_7$  a  $t_{10}$ , seguiu-se-lhe a fase de esporulação e formação do complexo esporo-cristal desde  $t_{10}$  até  $t_{15}$  e finalmente a fase de recuperação do produto a partir de  $t_{15}$ .

O Gráfico 8 confirma que a fase logarítmica iniciou-se quando o pH atingiu seu mínimo valor e possibilita o cálculo da taxa específica de crescimento, bem como o tempo de duplicação do microrganismo em estudo.

Sendo:

X = rendimento em biomassa/unidade de volume, g/l

$$\frac{\text{grama de célula seca}}{\text{lítro de meio de cultura}}$$

S = concentração do substrato, g/l

$$\frac{\text{grama de substrato}}{\text{lítro de meio de cultura}}$$

$\mu$  = velocidade específica de crescimento,  $\text{h}^{-1}$   
t = tempo de duplicação ou tempo de geração, h.

Obtivemos os seguintes resultados para o Bacillus thu. -  
ringiensis NCIB 9207, meio de cultura 4 e condições já-  
especificadas:

$$X = 5 \text{ g/l (em 24 h)}$$

$$S = 6 \text{ g/l (glucose)}$$

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = 0,425 \text{ h}^{-1}$$

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = 1,63 \text{ h}$$

Verificamos que para frascos agitados o rendimento máxi-  
mo obtido foi 6,5 g/l que corresponde a 48 horas de fer-  
mentação, enquanto que em fermentador, o valor 5 g/l -  
corresponde a 24 h de fermentação. Assim sendo o ganho-  
(G) em produtividade do fermentador, em relação aos --  
frascos agitados, pode ser calculado:

Sendo  $P = \frac{dX}{dt}$  produtividade g/l.h

$P_a$  = produtividade do fermentador

$P_b$  = produtividade dos frascos agitados

Temos:

$$G = \frac{P_a}{P_b} = \frac{(dX/dt)_a}{(dX/dt)_b} = \frac{5/24}{6,5/48} = 1,54$$

O ganho em produtividade nesta fermentação foi 1,54.

A produtividade do fermentador é 1,54 vezes a produtivi-  
dade dos frascos agitados.

## CAPÍTULO IV

### - Conclusões -

1. Foram pesquisados 13 (treze) meios de cultura, visando a obtenção do máximo rendimento celular, devido à presença do complexo esporo-cristal proteico tóxico, intracelularmente.

2. Concentrações crescentes de glucose no meio de cultura, favoreceram o aumento no teor de proteínas do complexo esporo-cristal proteico, tendo sido obtidos os melhores rendimentos com 6 gramas de glucose por litro de meio de cultura.

3. O processo de recuperação do produto tóxico, que possibilitou maiores rendimentos foi o de co-precipitação com lactose e acetona; os resultados obtidos são, comparáveis àqueles de Dulmage (39) autor do método, cujo resultado é 7 g/l com 72 horas de fermentação e o nosso 5,5 g/l com o mesmo meio de cultura por ele empregado, sendo a recuperação feita após 48 horas. Nossa produtividade foi portanto maior que a obtida por ele.

4. A taxa de Oxigênio Dissolvido no meio de cultura, em fermentação, foi um importante parâmetro para determinar as fases de fermentação, conforme se observa nos Gráficos 7 e 8.

5. O tempo de fermentação, no fermentador, foi de um terço à metade, daquele decorrido com frascos agitados. Como a concentração celular atingiu aproximadamente os mesmos níveis tanto para fermentador como para frascos no agitador, concluímos que a produtividade do fermentador foi de até três vezes a que aquela obtida com os frascos agitados.

6. No fermentador, o valor mínimo de pH, atingido durante a fermentação, indica o início da fase logarítmica de crescimento, a seguir, temos uma fase de pH estável, durante todo o crescimento; um ligero acréscimo no valor de pH, se verifica após esta fase, indicando o início da esporulação e quando o pH atinge um máximo e novamente estabiliza esta mos na fase de recuperação do complexo esporo-cristal proteico.

7. O rendimento máximo em biomassa foi de 6,5 g/l em 48 horas, usando frascos agitados. Para Dulmage (39) o rendimento foi de 16g em 2300 ml de mosto fermentado, ou seja, 7 g/l, porém o tempo de fermentação nesse caso foi de 72-96 horas o que redonda em diminuição de produtividade, relativa ao nosso produto.

$$\frac{P}{P_D} = \frac{(dx/dt)}{(dx/dt)_D} = \frac{6,5}{48} \bigg/ \frac{7}{72} \approx 1,4$$

P = nossa produtividade

P<sub>D</sub> = produtividade de Dulmage.

Conclue-se que obtivemos uma produtividade 1,4 ve-

zes maior que a de Dulmage, em frascos agitados.

8. O bioteste realizado contra praga de produtos armazenados comprova a potência e eficácia do inseticida bacteriano obtido. O inseto-teste escolhido foi Plodia interpunctella (Lepidoptera-Phycitidae) que está classificada entre as sete pragas mais importantes de grãos armazenados, no Brasil (52).

A concentração ( $32\text{g/m}^2$ ) utilizada para tratar a superfície do alimento ( $78\text{ cm}^2$ ) que deu 77,5% de mortalidade foi aproximadamente igual aquela usada por Newmark (94) para 75% de mortalidade; a concentração por ele usada foi  $37,2\text{g/m}^2$ , tendo sido usado como inseto-teste Anagasta kuehniella da mesma família (Phycitidae) e ordem (Lepidoptera), que o nosso inseto-teste.

## CAPÍTULO V

### Índice de quadros, gráficos e Apêndices

<u>Quadros</u>		<u>Página</u>
1	Meio de cultura para manutenção	33
2	" " " 1,2,3, para fermentação	33
3	" " " 4,5,6, para fermentação	34
4	" " " 7,8,9, " "	35
5	" " " 10,11,12,13, " "	36
6	Concentração celular em função da DO	37
7	" " " " " " " "	37
8	" " " " " " " "	38
9	Variação do pH durante a fermentação	38
10	Recuperação do produto	39
11	Concentração de proteína	39
12	Determinação das variáveis físico-químicas, no fermentador	40
13	Bioteste com <u>Flodia interpunctella</u>	40
 <u>Gráficos</u>		
1	Comparação do crescimento celular	41
2	" " " " " "	42
3	Efeito da concentração de glucose	43
4	" " " " " "	44
5	" " fonte nitrogenada	45
6	Variação de pH, durante a fermentação	46
7	Taxa de Oxigênio dissolvido no fermentador	47
8	Taxa de crescimento e variação de pH	48
9	Taxa de Mortalidade do inseto	49



<u>Apêndices</u>		<u>Página</u>
1	Características do padrão E <sub>61</sub>	50
2	Análise de custos do inseticida químico e microbiano	51
3	Determinação de proteínas por Absorção UV	52

Quadro 1 : Meio de cultura para manutenção	
Componentes (a)	g/l
Extrato de carne	1
Extrato de levedura	2
Peptona	5
Cloreto de sódio	5
Agar	15
pH = 7,3	
(a) g/l de solução aquosa final	

Quadro 2 : Meios de cultura para fermentação			
Componentes (a)	Meios de cultura		
	g/l	1	2
$K_2 H PO_4 \cdot 3H_2O$	6,8	0,5	0,5
$Ca Cl_2 \cdot 2H_2O$	0,183	0,08	0,08
$(NH_4)_2 SO_4$		2,0	2,0
$Mg SO_4 \cdot 7H_2O$	0,123	0,2	0,2
$Mn SO_4 \cdot 4H_2O$	0,002	0,05	0,05
$Zn SO_4 \cdot 7H_2O$	0,014		
$Fe_2 (SO_4)_3$	0,02		
Caseína hidrolizada	10,0		
Extrato de levedura		2,0	2,0
Glucose	5,0	3,0	5,0
pH = 7,3			
(a) g/l de solução aquosa final			

Quadro 3 : Meios de cultura para fermentação			
Componentes g/l(a)	Meios de cultura		
	4	5	6
pH = 7,3			
$K_2 H PO_4 \cdot 3H_2O$	0,5	0,5	0,5
$Ca Cl_2 \cdot 2H_2O$	0,08	0,08	0,08
$(NH_4)_2 \cdot SO_4$	2,0	2,0	2,0
$Mg SO_4 \cdot 7H_2O$	0,2	0,2	0,2
$Mn SO_4 \cdot 4H_2O$	0,05	0,05	0,05
Extrato de Levedura	2,0	2,0	2,0
Glucose	6,0	7,0	8,0
(a) g/l de solução aquosa final			

Quadro 4 - Meios de cultura para fermentação				
Componentes (a)	Meios de cultura			
	g/l	7	8	9
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>			2,5	2,5
Na Cl			5,0	5,0
Mg SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,2			
Mn SO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,05			
Ca Cl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,08			
K <sub>2</sub> H PO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O	0,5			
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,0			
Dextrose			2,0	2,0
Extrato de Levedura	2,0			
Glucose	1,0			
Triptona				20,0
Triptose			20,0	
pH = 7,3				
(a) g/l de solução aquosa final				

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

Quadro 5 Meios de cultura para fermentação

Componentes (a)	Meios de cultura			
	10	11	12	13
g/l				
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,0	1,0	1,0	
$\text{K}_2 \text{H PO}_4$	1,0	1,0	1,0	
Na Cl				2,0
Amido	5,0			
Caseina Hidrolizada		23,0	23,0	
Dextrose	5,0			
Extrato de carne				1,0
Extrato de Levedura	2,0			2,0
Melaço			10,0	
Milhocina (b)		10,0		
Peptona				5,0
Triptose	10,0			
pH = 7,3				

(a) g/l de solução aquosa final

(b) Água de maceração de milho da Refin. de Milho Brasileiro

Quadro 6 : Concentração celular em função da Densidade Ótica (a)						
Microrganismo	Meio de cultura	tempo, horas				
		8	16	24	36	48
ATCC 13367	9	0,170	0,310	0,530	0,740	0,750
ATCC 13367	13	0,370	0,460	0,600	0,730	0,780
NCIB 9207	9	0,190	0,400	0,630	0,820	0,850
NCIB 9207	13	0,440	0,590	0,770	0,890	0,900

a) Densidade Ótica (DO) determinada em colorímetro "spectronic 20" da "Bausch and Lomb", leitura a 550 mm

Quadro 7 : Concentração celular em função da densidade Ótica (a)					
Meios de cultura	tempo, horas				
	8 h	16 h	24 h	36 h	48 h
2	0,9	1,2	1,8	3,5	4,3
3	1,0	1,8	4,2	6,0	6,5
4	2,0	4,0	6,5	7,0	7,2
5	2,2	4,0	5,5	7,0	7,5
6	2,5	3,7	5,2	6,6	6,7

a) Determinada a DO (densidade ótica) em Turbidímetro EEL da Evans Electroselenium Ltd, Halstead, Essex, England, leitura usando o filtro verde.

Quadro 8 : Concentração celular em função da densidade ótica (a)					
Meio de cultura	tempo, horas				
	8h	16h	24h	36h	48h
8	0,430	0,580	0,710	0,800	0,810
9	0,580	0,705	0,800	0,960	0,950
10	0,440	0,620	0,750	0,870	0,860
13	0,480	0,670	0,800	0,970	0,970

(a) DO determinada em colorímetro "Spectronic 20" da Bausch and Lomb, leitura a 550 nm.

Quadro 9 : Variação do pH, durante a fermentação						
Meio de cultura	tempo, horas					
	0	8	16	24	36	48
2	7,3	7,0	6,7	6,8	7,0	7,2
3	7,3	6,9	6,5	6,2	6,5	6,7
4	7,3	6,8	6,2	6,4	6,6	7,0
5	7,3	7,0	6,0	6,2	6,7	6,7
6	7,3	6,5	5,4	6,2	6,5	6,7
8	7,3	7,1	6,8	7,3	7,5	7,7
9	7,3	7,0	6,9	7,2	7,5	7,7
10	7,3	7,0	7,5	8,2	8,4	8,8
13	7,3	7,0	6,8	7,8	8,0	8,6

Quadro 10 † Recuperação do produto Peso seco. g/l			
Meios de cultura	Filtro Whatman n° 42	Coprecipitação com lactose-acetona	
		pH ≤ 7,0	> 7,0
1		3,5	
2		2,7	
3	2,62	3,5	
4		6,5	
5	3,0	5,0	
6		6,0	
7		3,0	
8	1,08	5,95	
9	1,05	4,92	
10		5,5	2,75
11		4,4	
12		4,2	
13		5,0	2,2

Quadro 11 : Concentração de proteína mg/ml				
	Meios de cultura (a)			
	2	3	5	13
	DO 280nm	3,540	5,500	4,400
DO 260nm	3,920	8,100	5,000	2,720
R	0,905	0,680	0,880	0,765
F	0,711	0,537	0,695	0,965
Cp	2,52	2,86	3,06	2,10

(a) Leituras corrigidas para as diluições efetuadas

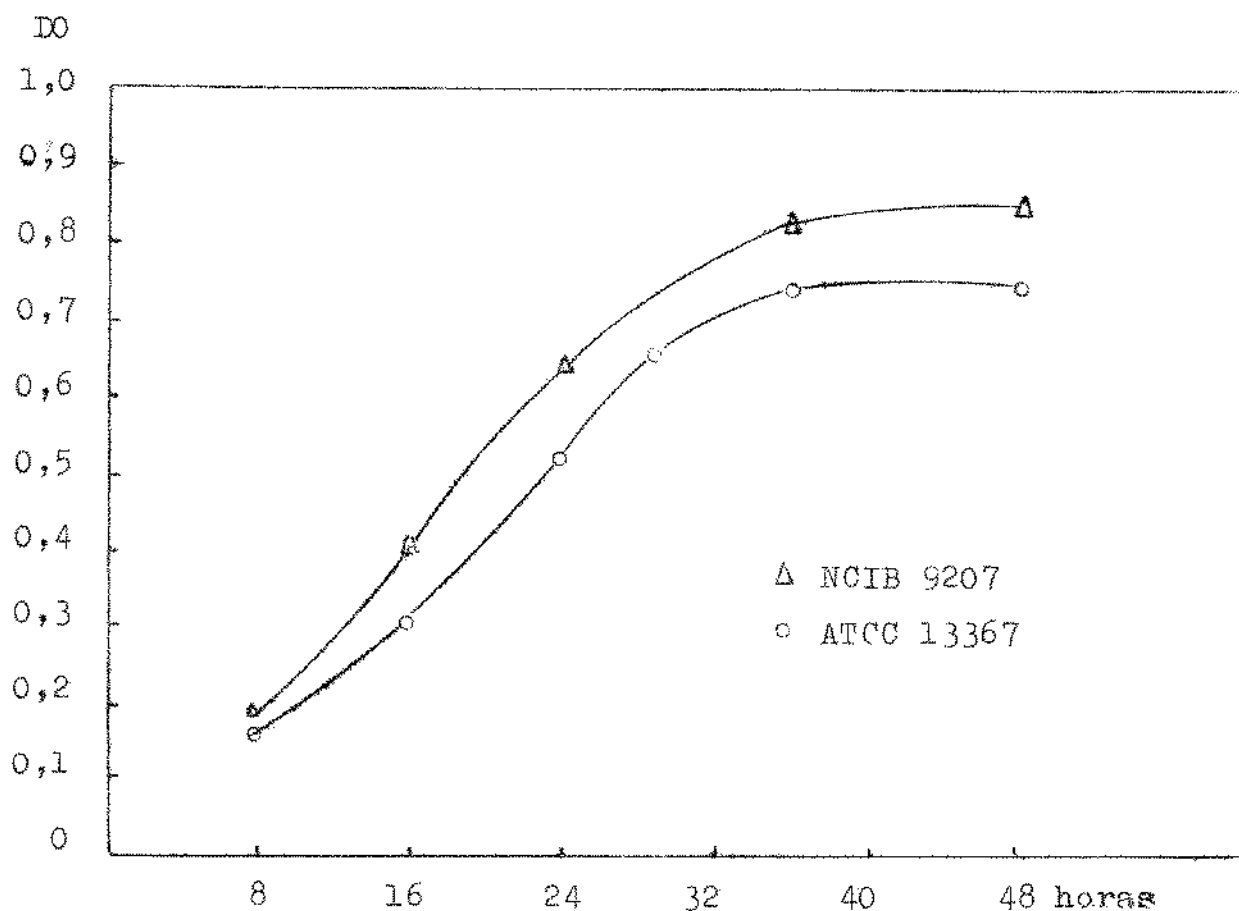


Quadro 12 : Determinações das variáveis físico-químicas, no fermentador			
Tempo, h	DO	pH	% OD
0		7,3	100
0 - 3			90
4	2,0	6,8	80
5			70
6			65
7	2,7	6,4	60
8			60
9	6,0	6,4	60
10			60
11			65
12	7,0		70
13			80
14			85
15	7,6	6,5	90
24	7,5	6,7	90

DO Densidade ótica ; OD Oxigênio Dissolvido

Quadro 13 : Bioteste com <i>Plodia interpunctella</i>				
Concentração do inseticida		nº de lagartas		
g/100g farelo	g/m <sup>2</sup>	mortas	total	% mortalidade
0,47	12,8	6	20	30
0,53	19,2	7	19	37
1,05	25,6	14	20	70
1,20	32	17	22	77,5
1,30	38,4	19	23	82,5

GRÁFICO 1



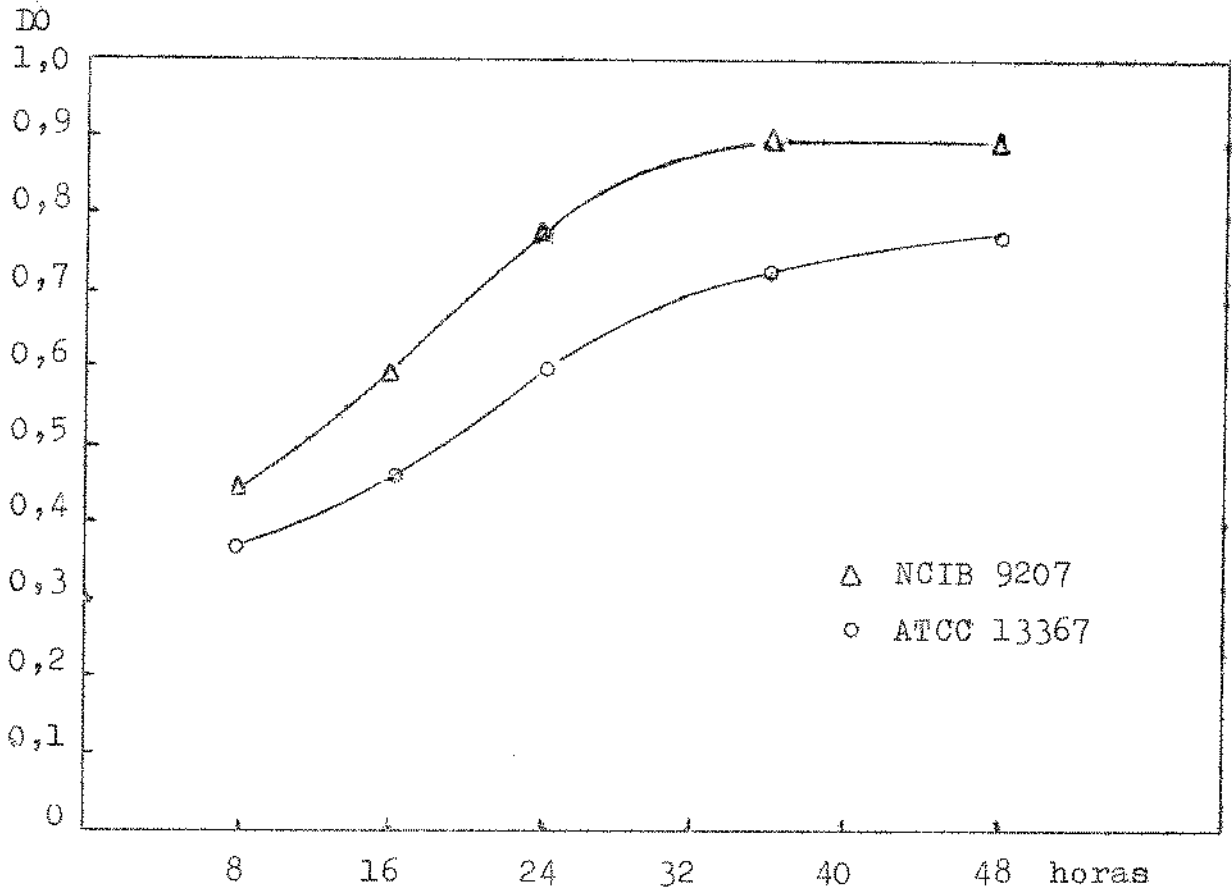
Comparação do crescimento celular de duas diferentes culturas.

Meio de cultura 9.

Temperatura ambiente

DO = Densidade Ótica (absorbância lida em "Spectronic 20" da Bausch and Lomb; 550 mm).

GRÁFICO 2



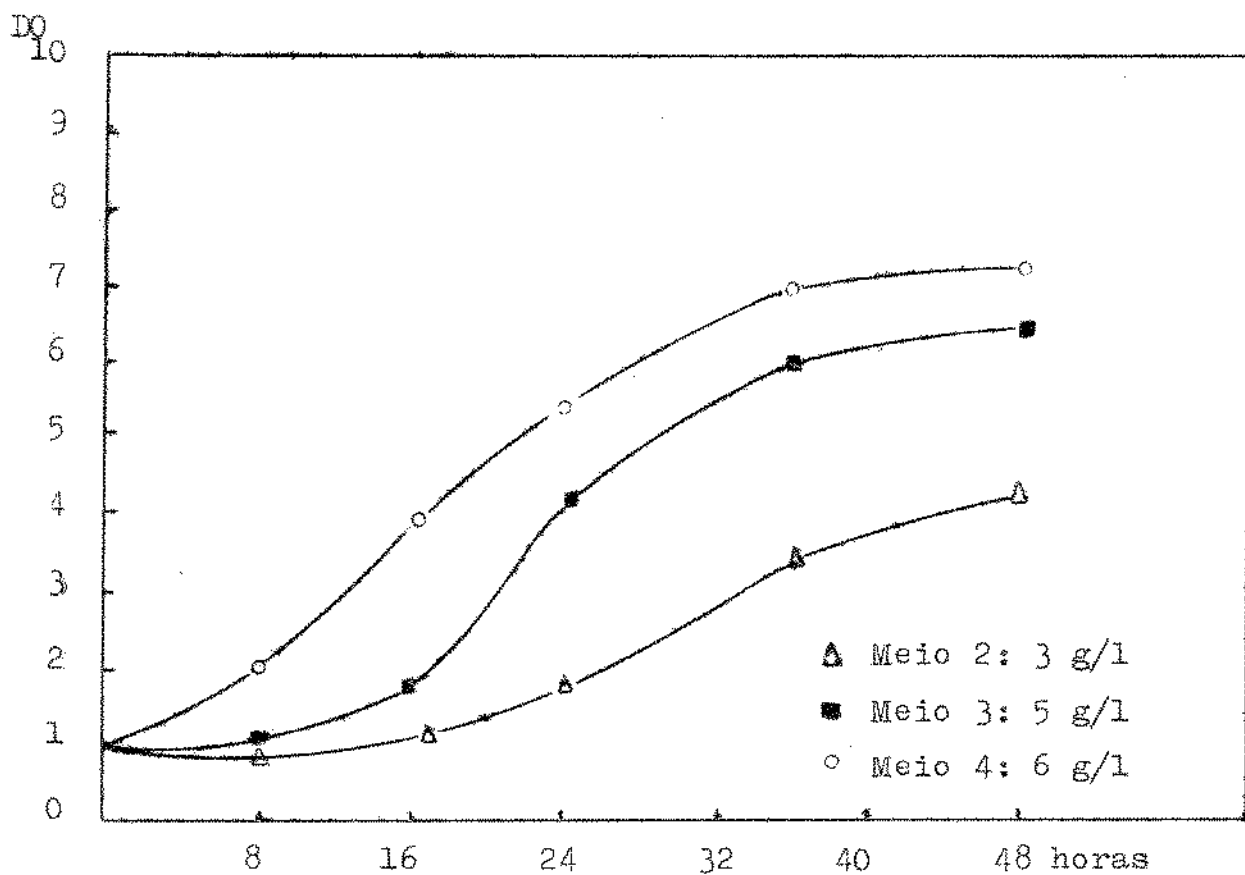
Comparação do crescimento celular de  
duas diferentes culturas

Meio de cultura 13

Temperatura  $30^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$

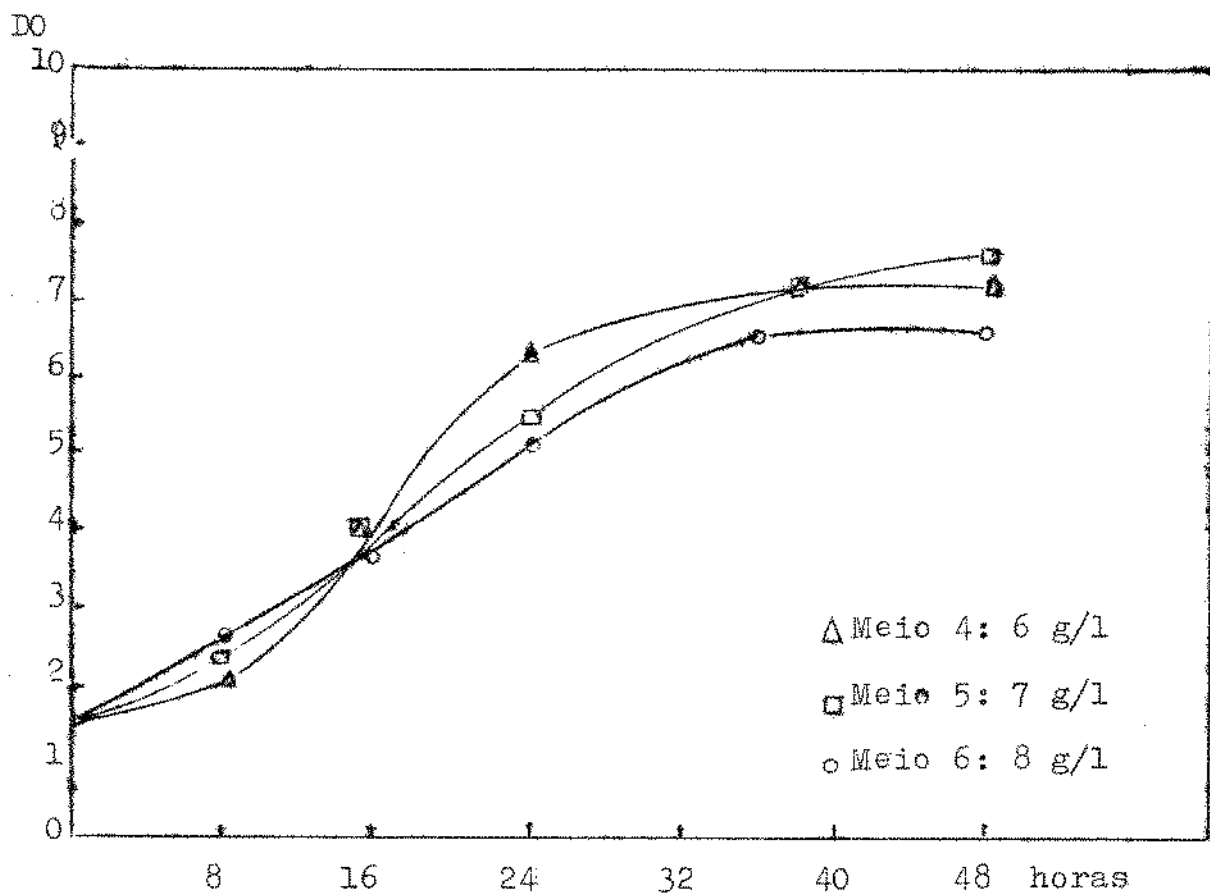
DO = Densidade ótica (absorbância lida em "Spectronic  
20" da Bausch and Lomb; 550 mm)

GRÁFICO 3



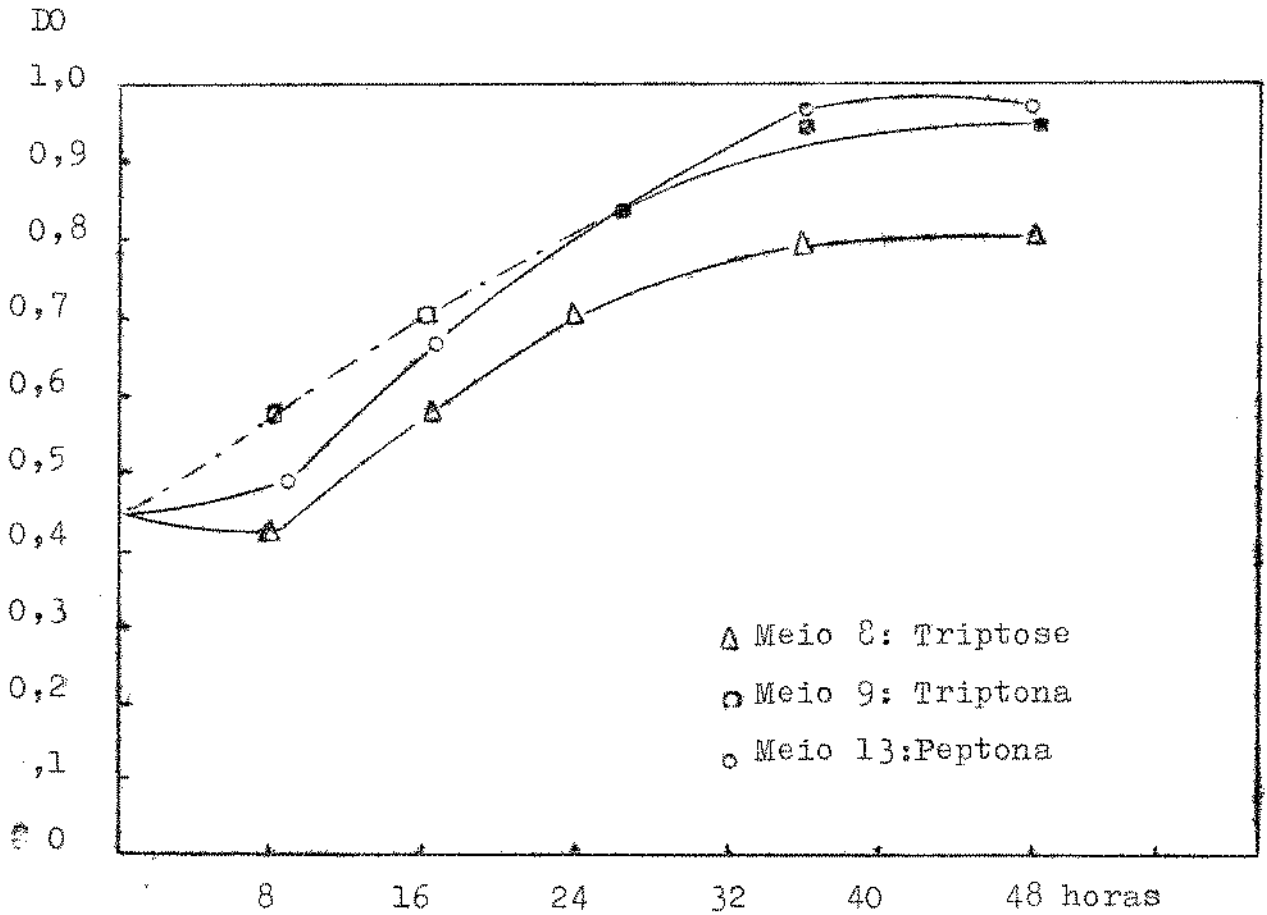
Efeito da concentração de glucose sôbre o crescimento ce-  
lular. DO determinada em Turbidímetro EEL. filtro verde.

GRÁFICO 4



Efeito da concentração de glicose sobre o crescimento celular. Densidade Óptica determinada em Turbidímetro, EEL, Filtro verde.

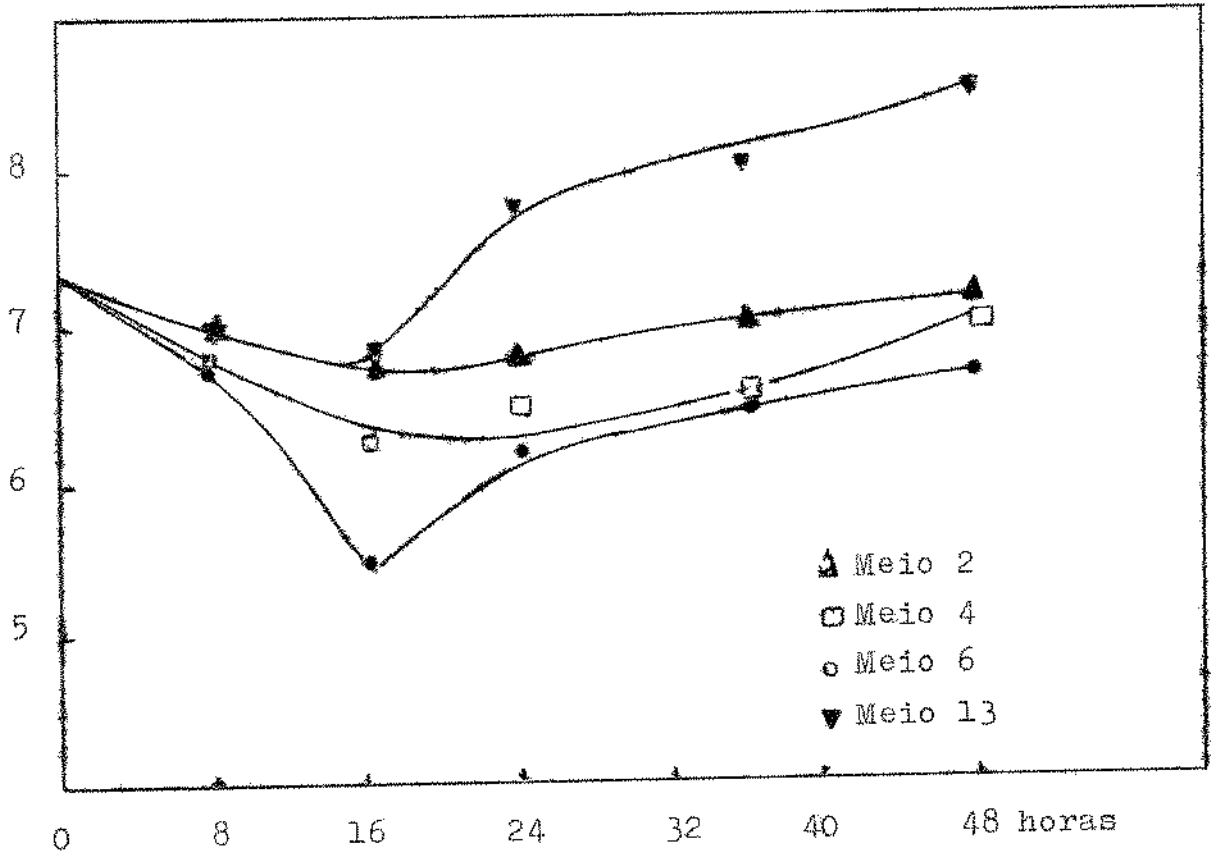
GRÁFICO 5



Efeito da fonte nitrogenada sôbre o crescimento celular. Leitura a 550 mm, determinada em ... colorímetro "Spetronic 20" da Bausch and Lomb.

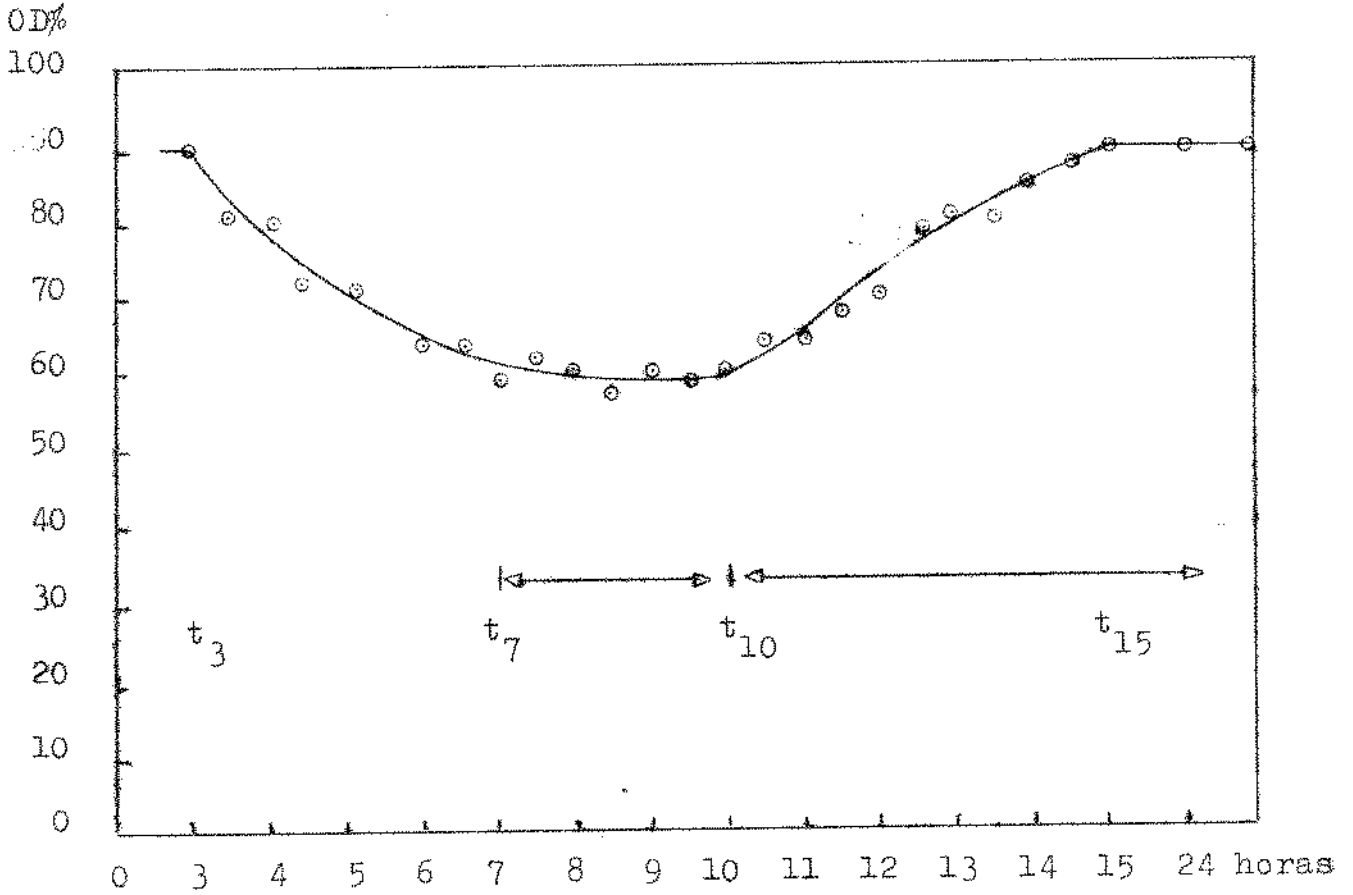
GRÁFICO 6

pH



Variacão de pH durante a fermentacão

GRÁFICO 7



Taxa de Oxigênio dissolvido, durante a fermentação.

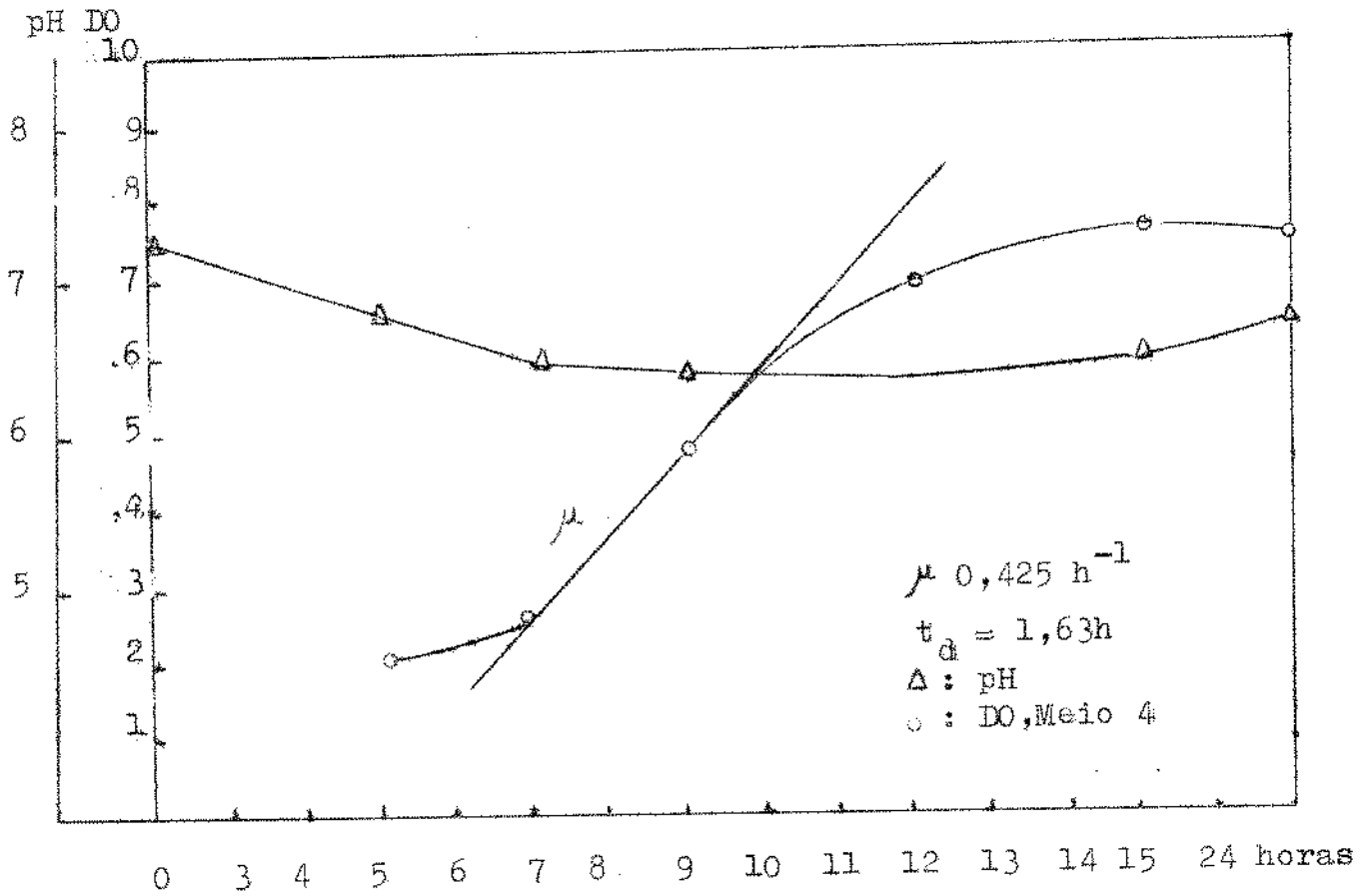
Determinada em Analizador de Oxigênio dissolvido com registrador. (Modelo DOAR)

a : fase logarítmica.

b : fase de esporulação e produção do complexo esporo-cristal.



GRÁFICO 8



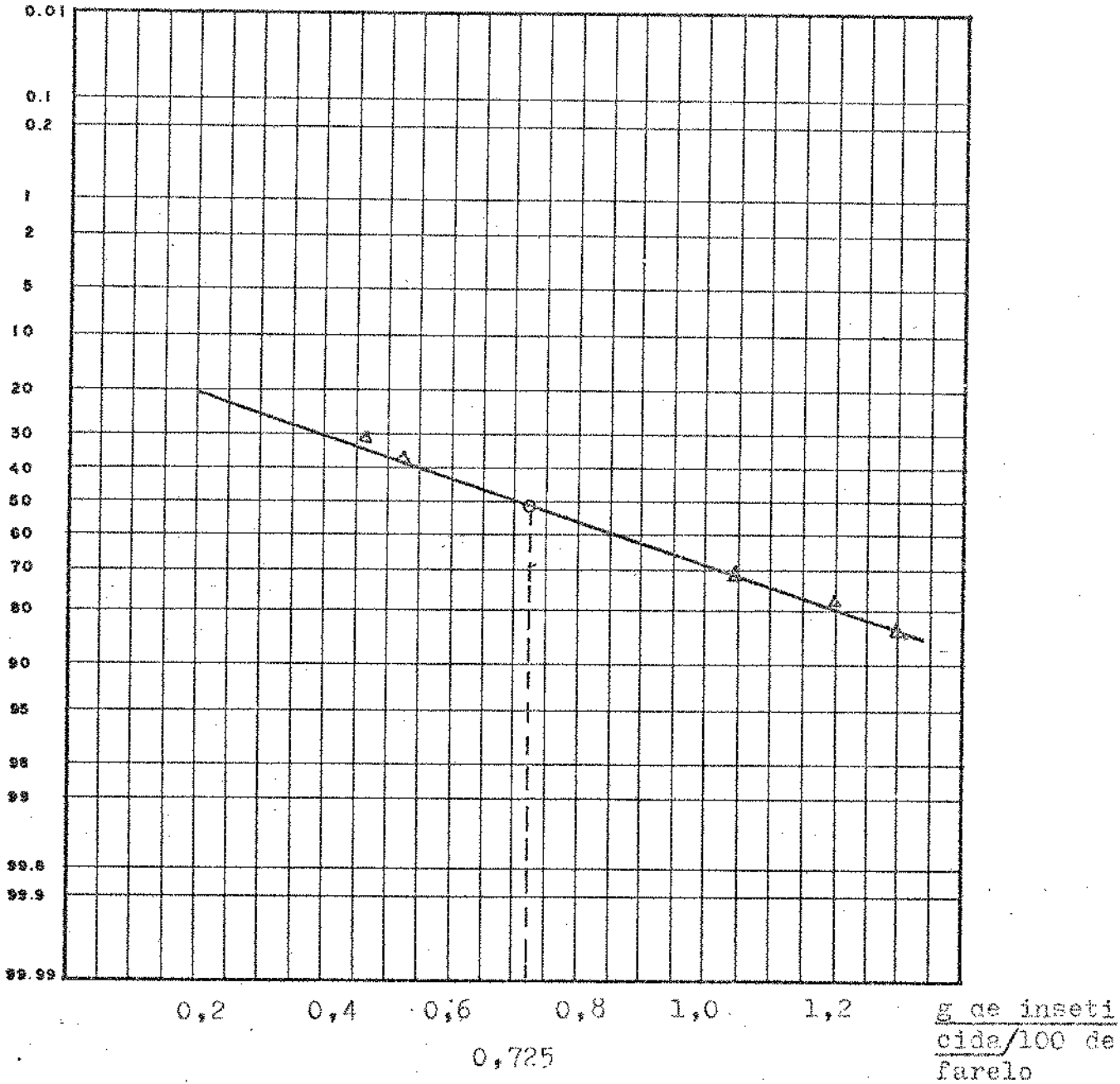
Taxa de crescimento e variação de pH, em fermentador. Meio de cultura 4.

$\mu$  = velocidade específica de crescimento

$t_d$  = tempo de duplicação

GRÁFICO 9

CL - %



Determinação da concentração letal para 50% de mortalidade (CL<sub>50</sub>). Resultado para o bioteste com Plodia interpunctella (Hbn, 1813).

- Apêndice 1 -

Características de E<sub>61</sub>

Barjac;H(9)

Data de fabricação : janeiro de 1961 pela firma "Roger Bellon"

peso de pó : 42,7 kg

volume de cultura : 4.135 litros (mistura de seis fermentadores)

composição do pó

complexo cristal-esporo 21,5%  
(sedimento de centrifugação)

Inertes 78,5%

Estabilidade determinada desde 1961

Unidades arbitrárias 1000/mg

Distribuição : Laboratoire de Lutte Biologique,  
Inst. Pasteur, Paris  
Dr. H. de Barjac.

Uso : França : Bactospéine

Inseto-teste: Anagasta kthniella

Produtos de La Minière

Inseto-teste: Pieris brassicae.

USA : Thuricide

Dipel

Biotrol

Inseto-teste: Heliothis virescens

ou

Trichoplusia ni

- Apêndice 2 -

Custo de desenvolvimento de um inseticida químico e um bacteriano, desde o projeto à realização. (Tempo de desenvolvimento de 7 a 10 anos)

fases	1000 US\$	
	Sevin	Thuricidei90TSC
Síntese-Seleção	500	80
Laboratório	200	480
Teste de Campo	300	250
Toxicologia	350	250
Patente	25	25
Formulação	80	100
Desenvolvimento do Produto	450	355
Desenv. Processo	350	275
Estudo de Mercado	250	200
	2505	2015
Em Ignoffo, C.M. (72)		

- Apêndice 3 -

Determinação de Proteína por Absorção Ultravioleta

Layne, E. (85)

$R_{280/260}$	F
1,75	1,116
1,63	1,081
1,52	1,054
1,40	1,023
1,36	0,994
1,30	0,970
1,25	0,944
1,16	0,899
1,09	0,852
1,03	0,814
0,979	0,776
0,939	0,743
0,874	0,682
0,846	0,656
0,822	0,632
0,804	0,607
0,784	0,585
0,767	0,565
0,753	0,545
0,730	0,508
0,705	0,478
0,671	0,422
0,644	0,377
0,615	0,322
0,595	0,278

$R_{280/260}$  : relação entre as absorbâncias a 280 nm e 260 nm.

F.  $\frac{1}{d} \cdot DO_{280}$  = concentração de proteína da amostra,  
mg/ml

d = largura da cubeta, cm.

CAPÍTULO VI

- LITERATURA CONSULTADA -

1. ABBOTT LABORATORIES - Dipel a biological insecticide  
Technical Information - USA - 1971
2. AGRICULTURE HANDBOOK nº 331. Suggested guide for the  
use of insecticides to control insects affecting crops, livestock, households, stored products, forests, and forests products -Agricultural Research Service and Forest Service -  
United States Department of Agriculture.1968.
3. ANDERSON, R.F. & EGNOFFO, C.M. Microbial insecticides In "Microbial Technology" H.P.Peppler.N.  
Y. Reinhold Publ. Corp. 172- 181, 1967.
4. ANGUS, T.A. Implications of some recent studies of  
Bacillus thuringiensis - A personal purview-  
Proceedings IV Intern. Coll. Ins. Path.Colle-  
ge Park, Md., USA. August, 1970
5. \_\_\_\_\_, Similarity of effect of valinomycin and Bacil-  
lus thuringiensis parasporal protein in lar-  
vae of Bombix moriJournal of Invertebrate Patho-  
logy - 11: 145, 1968
6. \_\_\_\_\_, Some comments on insect pathology in the Cana-  
dian Forestry Service. Ann. Soc. Entomol.17(2)  
: 81-5 1972
7. \_\_\_\_\_, Symposium on Microbial Insecticides. I. Bacte-  
rial Pathogens of insects as microbial insecticides. Bact. review 29 (3): 364 - 371, 1965

8. \_\_\_\_\_, The use of Bacillus thuringiensis as a microbial insecticide. World Review of Pest control 7 (1): 11-26, 1968
9. BARJAC, H., BURGERJON, A.- Microbial Control of insects Seminar 1971 - Helsinki - Intern.Organ. for Biotech. and Bioengineer. Dept. of Microbiology, Helsinki Sect. VI; 32 p, 1972
10. \_\_\_\_\_, Insecticides et lutte biologique - Un cas particulier; celui de Bacillus thuringiensis
11. \_\_\_\_\_, & RIOU, J. Y. - Action de la toxine thermostable de Bacillus thuringiensis var. thuringiensis administrée à des souris - Revue de Path. Comparée et de médecine expérimentale 6 : 367-374, 1969
12. BENZ, G. On the chemical nature of the heatstable exotoxin of Bacillus thuringiensis. Experientia - 22 : 81-,1966
13. \_\_\_\_\_, & PERRON, J.M. - The toxic action of Bacillus thuringiensis exotoxin on Drosophila reared in yeast-free media. Experientia 23:871, 1967
14. BOND, R.P.M., BOYCE, C.B.C. and FRENCH J.J. - A purification and some properties of an insecticidal exotoxin from Bacillus thuringiensis - Berliner- Biochem J. 114(3): 477,488, 1969
15. BRIGGS, J.D. - Commercial Production of Insect Pathogens. In: Insect Pathology, Acad. Press, Inc. N.Y. 2:519-548, 1963
16. \_\_\_\_\_, Mass propagation of bacteria pathogenic for insects. Bull. Wld. Hlth. Org. 31: 495, 1964

17. \_\_\_\_\_, Present status of Bacillus thuringiensis for insect control programs. Proceed. Northern Central Branch. ESA vol XVIII, 1963
18. \_\_\_\_\_, Reduction of adult housefly emergence by the effects of Bacillus thuringiensis spp. on the development of immature forms. Journal of Insect Pathology 2: 418, 1960
19. BUCHER, G.E., ANGUS, T.A. & ERYWIENCZYK, J. - Characteristics of a new strain of Bacillus thuringiensis var. thuringiensis Berliner (Serotype I) isolated from the Bumblebee wax moth. Journal of Invertebrate Pathology 8(4) : 485-491, 1966
20. BURGERJON A.- Adhesivité comparée de quelques préparations a base de Bacillus thuringiensis - Berliner, sur feuillage soumis a un lessivage au laboratoire. Ann. Epiphyties 15:73, 1964
21. \_\_\_\_\_, BIACHE, G- The activity of the heatstable toxin of Bacillus thuringiensis Berliner used in nature against larvae of Diprion pini-Journal of Insect Pathology 6: 538, 1964
22. \_\_\_\_\_, GRISON, P. Effects de Bacillus thuringiensis Berliner (cristaux-spores et toxine thermostable) sur le potentiel biotique de Zeiraphera Diniana Gn . Ann. Sci. Forest 28: 391, 1971
23. \_\_\_\_\_, Sensibilité de différents Lepidoptères à la souche "Anduze" de Bacillus thuringiensis Berliner Entomophaga 4(3): 1959
24. BURGESS, H.D. and BAILEY, L. Control of the greater and lesser wax moths (Galleria Mellonella and



- Achroia griselle) with Bacillus thuringiensis. Journal of Invertebrate Pathology 11: 184, 1968
25. BURGESS, H.D. - Control of insects by Bacillus thuringiensis. Proceed. 5<sup>th</sup> Br. Insect. Fungic. - Conf. 405-411, 1969
  26. \_\_\_\_\_, Control of wax moth by Bacillus thuringiensis- American Bee Journal Feb. 1966
  27. \_\_\_\_\_, et al. The standardization of Bacillus thuringiensis: tests on three candidate reference materials. Proceed Intern. Coll. Insect Path. and Microb. Control. Wageningen. The Netherlands, Sept 1966
  28. \_\_\_\_\_, Insect control by microorganisms. Academia Nazionale dei Lincei. Roma- 128:189, 1969
  29. \_\_\_\_\_, Stability of Bacillus thuringiensis in bees wax and bee comb. Pest infestation Control Laboratory, Slough, England
  30. \_\_\_\_\_, Standardization of Bacillus thuringiensis - products: homology of the standard. Nature 215: 664, 1967
  31. \_\_\_\_\_, The standardization of products based on Bacillus thuringiensis. Medelingen Rijksfaculteit Landbouw Wetenschappen Gent XXXI(3) 536, 1966
  32. CANTWELL, G.E., HELMPEL, A.M. & THOMPSON, M.J. -The production of an exotoxin by various crystalforming bacteria related to Bacillus thuringiensis var. thuringiensis Berliner. Journal Insect Pathology 6: 466-480, 1964

33. DIXON, W.J. & MASSEY JR, F.J. - Introducción al análisis estadístico - McGraw-Hill Book Company, Inc., N.York, 1966
34. DUBOIS, N.R. - Laboratory batch production of Bacillus thuringiensis spores and crystals. Appl. Microbiol. 16: 1098-9, 1968
35. DULMAGE, H.T. - Aspects of the Industrial production of microbial insect control agents. Insect-Path. and Microbial Control. North Holland, Amsterdam, 1967
36. \_\_\_\_\_, et alii - A proposed standardized bioassay - for formulation of Bacillus thuringiensis based on the international unit. Journal of Invertebrate Pathology 18: 240-5, 1971
37. \_\_\_\_\_, CORREA, J.A., MARTINEZ, A.J. - Coprecipitation with lactose as a mean of recovering the spore-crystal complex of Bacillus thuringiensis. J.I.P. 15 : 15-20, 1970.
38. \_\_\_\_\_, et alii. Field tests with the HD-1 formulation of the  $\delta$  endotoxins of Bacillus thuringiensis against the cabbage looper on cabbage. Journal of Economic Entomology 64:1421-2, - 1971
39. \_\_\_\_\_, Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of Bacillus thuringiensis var. alesti. Journal of Invertebrate Pathology 15: 232,9-1970
40. \_\_\_\_\_, MARTINEZ, A.J. & CORREA J.A. - Recovery of the nuclear polyhedrosis virus of the cabbage looper Trichoplusia ni, by coprecipitation with lactose - Journal of Invertebrate Pa

- thology, 16: 80- 3, 1970
41. \_\_\_\_\_ Production of  $\delta$ endotoxin by eighteen isolates of Bacillus thuringiensis serotype 3, in 3 fermentation media. Journal of Invertebrate Pathology 18: 353-8, 1971
  42. \_\_\_\_\_, Production of endotoxin by variants of Bacillus thuringiensis in two fermentation media. Journal of Invertebrate Pathology 16: 385-9, 1970
  43. DUNN, P.H., HALL, I.M. & SNIDEMAN, M.L., Bioassay - of Bacillus thuringiensis - Based Microbial Insecticides III continuous propagation of the Salt-Marsh caterpillar Estigmene acrea. Journal of Economic Entomology 57: 374-7, 1964
  44. FAST, P.G., ANGUS, T.A. - The  $\delta$ endotoxin of Bacillus thuringiensis var. sotto: A toxic low molecular weight fragment. Journal of Invertebrate Pathology 16: 465, 1970
  45. FAUST, R.M., DOUGHERTY, E.M. - Effects of the Bacillus thuringiensis  $\delta$ endotoxin produced by Bacillus thuringiensis var. dendrolimus on the hemolymph of the silkworm Bombix mori. Journal of Invertebrate Pathology 13: 155- 7, 1969
  46. \_\_\_\_\_, et alii- Standardization of the S endotoxin produced by several varieties of Bacillus thuringiensis. 1. Enzyme kinetics of the Trypsin Azalbumin -  $\delta$ endotoxin system. Journal of Economic Entomology 64: (3): 610,5, 1971
  47. \_\_\_\_\_, In vitro chemical reaction of the  $\delta$ endotoxin produced by Bacillus thuringiensis var. dendrolimus with other proteins. Journal of Inverte-

brate Pathology 11: 465-75, 1968

48. FILGUEIRA, F.A.R. - Manual de Olericultura: Cultura, e comercialização de hortaliças. S. Paulo, Ed. Agronômica Ceres, 1972
49. FISHER A, R. & BRIGGS, J.D.-Assay of Microbial Pesticides In: Developments in Industrial Microbiology Vol IV: 136, 1963
50. \_\_\_\_\_, Bioassay of microbial pesticides. "In Analytical Methods for Pesticides "G. Zweig Vol 1 - 430-42 - Academic Press, 1963
51. PRYE, R.D. - Infectivity tests utilizing Bacillus thuringiensis against several species of insects. Journal of Invertebrate Pathology 9(2) : Notes, 1967
52. GALO, D., et alii - Manual de Entomologia: Pragas das plantas e seu controle. S. Paulo, Ed. Agronômica Ceres, 1970
53. GLATRON, M.F., LECADET, M.M., & DEDONDER, R.- Structure of the parasporal inclusion of Bacillus thuringiensis Berliner: Characterization of a repetitive sub unit. European journal of Biochemistry 30: 330, 1972
54. GRIGARICK, A.A. & TANADA, Y. - A field test for the control of Trichoplusia ni (Hbn.) on celery - with several insecticides and Bacillus thuringiensis Berliner. Journal of Economic Entomology 52: 1013-4, 1959
55. HABIB, M.M. - Histopathological studies on the effect of Bacillus thuringiensis B; on the mediterranean flour moth Anagasta (Epehestia) Kuhniella

Zeller. Tese. Alexandria University, 1964

56. HALL, I.M., DULMAGE, H.D., & ARAKAWA, K.Y. - Laboratory tests with entomogenous bacteria and the fungus Beauveria bassiana against the little house fly species.  
Environmental entomology 1(1): 105-107, 1972
57. \_\_\_\_\_, The susceptibility of the Eye Gnath Hippelates collusor to entomogenous bacteria and fungi. Journal of Invertebrate Pathology 19: 28-31, 1972
58. \_\_\_\_\_, HUNTER, D.K., ARAKAWA, K.Y.- The effect of the exotoxin fraction of Bacillus thuringiensis on the citrus red mite. Journal of Invertebrate Pathology 18: 359-362, 1971
59. \_\_\_\_\_, Integrated microbial control and chemical control of insect pests. Proceed. of the joint U.S.- Japan Seminar on Microbial Control of Insect Pests, Fukuoka, April, 1967
60. \_\_\_\_\_, The development and use of microbial insecticide containing entomogenous bacteria and viruses - XI Pacific Science Congress, Tokyo 1966
61. HEIMPEL, A.M., - A critical review of Bacillus thuringiensis var. thuringiensis Berliner and other crystalliferous bacteria. Annual review of entomology 12: 287-322, 1967
62. \_\_\_\_\_, Introductory remarks on Microbial control. In: Developments in Industrial Microbiology vol IV: 131, 1966
63. \_\_\_\_\_, Microbial insecticides. Proceed. North Cen

tral Branch- E.S.A.- vol XVII, 1962

64. \_\_\_\_\_, Progress in developing insect viruses as microbial control agents. Proceed. of the Joint U.S.-Japan Seminar on Microbial Control of Insect Pests, Fukuoka, 1967
65. IGNOFFO, C.M., & DUTKY, S.R.- The effect of sodium hypochlorite on the viability and infectivity of Bacillus and Beauveria spores and cabbage looper. Journal Insect Pathology 5: 422-6, 1963
66. \_\_\_\_\_, Effects of temperature and water on viability and virulence of Bacillus thuringiensis - var. thuringiensis Berliner spores. Coll.Int. Path. Insects, Paris, 1962
67. \_\_\_\_\_, & GARD, I - Use of an agar base diet and house fly larvae to assay  $\beta$ exotoxin activity of Bacillus thuringiensis. Journal of Economic Entomology 63: 1987-9, 1970
68. \_\_\_\_\_, GARCIA, C. & GASPAROTTO, V.A.- Sensitivity - of larvae of the cabbage looper, Trichoplusia ni to Bacillus thuringiensis. Journal of Invertebrate Pathology 11: 97-103, 1968
69. \_\_\_\_\_, & GREGORY, B.- Effects of Bacillus thuringiensis exotoxin on larval maturation, adult longevity, fecundity, and egg viability in several species of lepidoptera. Environmental Entomology 1(3): 269-272, 1972
70. \_\_\_\_\_, MCGARR, R.L. & MARTIN, D.F. - Control of Alabama argillacea (Hübner) with Bacillus thuringiensis Berliner. Journal of Insect Pathology

gy 6: 411 6, 1964

71. \_\_\_\_\_, Microbial Insecticides: No-Yes. Now-When: Proceed. Tall Timbers Conf. on Ecological Animal Control by habitat Management. Feb. 1970
72. \_\_\_\_\_, Possibilities of mass producing insect pathogens. Ins. Path & Microbial Control - North Holland, Amsterdam, 1967
73. \_\_\_\_\_, Sensitivity spectrum of Bacillus thuringiensis var. thuringiensis Berliner to Antibiotics, sulfonamides and other substances. Journal Insect Pathology 5: 395-7, 1963
74. \_\_\_\_\_, The effects of temperature and humidity on mortality of larvae of Pectinophora gossypiella (Saunders) injected with Bacillus thuringiensis Berliner. Journal Insect Pathology 4: 63-71, 1962
75. \_\_\_\_\_, The susceptibility of Pectinophora gossypiella (Saunders) to intrahemocoelic injections of Bacillus thuringiensis Berliner. Journal Insect Pathology 4: 34-40, 1962
76. INTERNATIONAL MINERALS & CHEMICAL CORP.: thuricide<sup>(r)</sup> Microbial Insecticide - Insect Control Manual - Illinois, USA, 1969
77. JAKES, R.P. - The inactivation of foliar deposits of viruses of Trichoplusia ni (Lepidoptera: noctuidae), and Pieris rapae (Lepidoptera: pieridae) and tests on protectant additives. The Canadian Entomologist 104: 1985-1994, 1972
78. JANSEN, F.W., LUND, A.J., ANDERSON, L.E. -Colorime-

- tric assay for DPA in bacterial spores-Science 127:26-7, 1958
79. JONES, D.P.- Integrated control of pests. Pest articles and news summaries 14: 514, 1968
80. KEARBY, W.H., HOSTETTER, D.L. & IGNOFFO, C.M.- Laboratory and field evaluation of Bacillus thuringiensis for control of the bagworm. Journal of Economic Entomology 65: 477-480, 1972
81. KIM, Y.T. GREGORY, B.G. & IGNOFFO, C.M.,- The  $\beta$  exotoxin of Bacillus thuringiensis. III Effects on in vivo synthesis of macromolecules in an insect system Journal of Invertebrate Pathology 20, 46-50, 1972
82. KREYSIG, E. - Advanced Engineering Mathematics. Trad. Matemática Superior. Livros Técnicos e Científicos- Edit. Brasil Ltda. 2: 1969
83. KUCK, C. - Poluição Alimentar: Fome e pesticidas no Brasil e no mundo. O Cruzeiro- 22-23, 1972
84. LARSON, L.V. & IGNOFFO, C.M., - Activity of Bacillus thuringiensis var. thuringiensis and galleriae against fall cankerworm. Journal of Economic Entomology 64: (6) 1567-8, 1971
85. LAYNE, E.- Spectrometric and Turbidimetric methods - for measuring proteins. In Methods in Enzymology. Academic Press Inc Publishers- N.Y. 1957
86. LECADET, M.M., CHEVRIER, G. & DEDONDER, R.- Analysis of a protein fraction in the spore coats of Bacillus thuringiensis. Comparison with crystal Protein. European Journal Biochemistry 25:349, 1972



87. \_\_\_\_\_, & DEDONDER, R.- Biogenesis of the crystalline inclusion of Bacillus thuringiensis during sporulation. Eur. Journal Bioch. 23: 282, 1971
88. \_\_\_\_\_, Enzymatic hidrolisis of the crystals of Bacillus thuringiensis by the proteases of Pieris brassicae I Preparation and fractionation of the lysates. Journal of Invertebrate Pathology 9: 310, 1967
89. \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ - II Toxicity of the different fractions of the hydrolysate for larvae of Pieris brassicae. Journal of Invertebrate Pathology 9 322, 1967
90. McCONNEL, E. & RICHARDS, A.G.- The production by Bacillus thuringiensis Berliner of a heat - stable substance toxic for insects. Canadian Journal of Microbiology - 161,8 , 1959
91. McGARR, R.L., DULMAGE, H.T. & WOLFENBARGER, D.A. Field tests with H.D.1,  $\delta$  endotoxin of Bacillus thuringiensis, and with chemical insecticides for control of the tobacco budworm and the bollworm in 1970 - Journal of Economic Entomology 65: 897-9, 1972
92. \_\_\_\_\_, The  $\delta$  endotoxin of Bacillus thuringiensis HD1 and chemical insecticides for control of the tobacco budworm and the bollworm. Journal of Economic Entomology- 63: 1357-8, 1970
93. MECHALAS, B.J. & BEYER, O.- Production and assay of extracellular toxins by Bacillus thuringiensis Develop in Ind. Microbiol. vol IV, 1963

94. NEWMARK, S. - Possible control of Cadra cautella(Walk) by surface treatment of grain with Bacillus thuringiensis Berliner - Progress report for the year 1967-68- The stored products research Laboratory- Tel Aviv, Israel.
95. \_\_\_\_\_, The effect of Bacillus thuringiensis Berliner on Anagasta kuehniella Z. and Cadra cautella W . Progress report for the year 1966-67. The stored products research Laboratory- Tel-Aviv, Israel.
96. NORRIS, J.R. - Biological methods of insect control. Pest Articles and News summaries 14:505-522 1968
97. \_\_\_\_\_, Microbial Insecticides- Reports on the Progress of Appl. Chem. 52: 478-483, 1967
98. \_\_\_\_\_, et al. Crystalline inclusions in Bacillus thuringiensis. Journal Bacteriology. 98:824-826, 1969
99. \_\_\_\_\_, Sporeformers as insecticides. Journal of Applied Bacteriology, 33: 192-206, 1970
100. \_\_\_\_\_, The ecology of serotype 4B of Bacillus thuringiensis. Journal of Applied Bact.32: 261 1969
101. \_\_\_\_\_, The use of microorganisms for the control of insect pests. Chem. and Ind. 1941-1945,1967
102. NUTRILITE PRODUCTS INC. BIOTROL, Biological Insect control products- Technical Bulletins -California, 1973
103. OATMAN, E.R., et alii- Control of the corn earworm on sweet corn in Southern California with a nu

- clear polyhedrosis virus and Bacillus thuringiensis. Journal of Economic Entomology 63-(2): 415-21, 1970
104. PENDLETON, I.R.- Insecticides of crystal forming bacteria - Process Biochem.- Dec., 1969
105. PERRON, J.M., BENS, G.- Effects of yeast and yeast fractions on the action of the so-called heat-stable exotoxin of Bacillus thuringiensis in Drosophila melanogaster. Journal Invert.Path. 10(2): 379-386, 1968
106. PINNOCK, D.E., BRAND, R.J. & MILSTEAD, J.E.- The field persistence of Bacillus thuringiensis spores. Journal of Invertebrate Pathology. 18: 405-411-, 1971.
107. \_\_\_\_\_, et al. Control of the California oakworm with Bacillus thuringiensis Preparations. Journal of Economic Entomology. 64(2): 510-513, 1971
108. \_\_\_\_\_, et al. Evaluation of Bacillus thuringiensis for suppression of navel orangeworm infestation of almonds. Journal of Economic Entomology. 65: 1747-1749, 1972
109. \_\_\_\_\_, Pest control strategy. Science 175:745, 1972
110. RIBIER, J. & LECADET, M.M.- Étude ultrastructurale et cinétique de la sporulation de Bacillus thuringiensis var. Berliner. Ann. Microbiol. (- Inst. Pasteur) 124A: 311, 1973
111. \_\_\_\_\_, L'inclusion parasporale du Bacillus thuringiensis var. B 1715: moment et site de son initiation, rapports avec l'ADN sporangial. C.R. Acad. Sc. Paris- 273: 1444, 1971

112. ROGOFF, M.H. & YUSTEN, A.A.- Bacillus thuringien-  
sis: microbiological considerations. Annual  
review microb. 23: 357-386, 1969
113. ROSE, I.R. & BRIGGS, J.D. - Resistance to American  
Foulbrood in honey bees. IX Effects to ho  
ney bee larval food on the growth and via-  
bility of Bacillus larvae. Journal of Inver  
tebrate Pathology. 13: 74, 1969
114. SCHERRER, P., LUTHY, P., and TRUMPI BRUNO- Produc-  
tion of δ-endotoxin by Bacillus thuringien  
sis as a function of glucose concentrations  
Applied Microb. 25:( 4): 644-5, 1973
115. SHOREY, H.H. & HALL, I.M.- Toxicity of Chem. and mi  
crobial insecticides to pest and benefici-  
al insects on poled tomatoes. J. Econ. Ento  
mology 56: 813-17, 1963
116. SMIRNOFF, W.A.- Effects of volatile substances re-  
leased by foliage of Abies balsames-Journal  
of Invertebrate Pathology. 19: 32, 1972
117. SOMERVILLE, H.J., TANADA, Y. & OMI, E.M.- Lethal  
effect of purified spore and crystalline en  
dotoxin preparations of Bacillus thuringi-  
ensis on several Lepidopterous insects. Jour  
nal of Invert. Pathol. 16: 241-8, 1970
118. STOKES, J.L. & LARKIN, J.M.- Comparative effect of  
temperature on the oxidative metabolism of  
whole and disrupted cells of a psychrophilic  
and a mesophilic species of Bacillus. J. Bac.  
95 : 95, 1968

119. TANADA, Y.- Microbial Control of some lepidopterous pests of crucifers. J.Econ.Entom.49(3): 320-329, 1956
120. \_\_\_\_\_, & REINER, C.- Microbial control of the arctic plume moth Platyptilia carduidactyla (Riley)(Pterophoridae - Lepidoptera) J. Insect. Pathol. 2: 230 - 46, 1960
121. \_\_\_\_\_, The use of pathogens in the control of the corn earworm, Heliothis zea (Boddie).J. Insect Pathol. 4 : 139,154, 1962
122. TREMBLAY, F.L.J., HUOT, L. & PERRON, J.M.- Pénétration de l'exotoxine thermostable de Bacillus thuringiensis à travers le chorion d'Acheta domesticus. Entomol. Exp.Appl. 15(3) : 397-398, 1972
123. VAN DER GREST, L.P.S., & WASSINK, H.J.M.- Standardization of Bacillus thuringiensis preparations: A new bioassay method with Pieris brassicae as test insect. Journal of Invert Pathol. 19: 361, 1972
124. WHITE, C.A., & BRIGGS, J.D.- Comparative susceptibility of Lepidopterous larvae to Bacillus thuringiensis Berliner. Coll. Int. Pathol.-Insects, Paris, 1962
125. YAMVRIAS, C. & ANGUS, T.A.- The comparative pathogenicity of some Bacillus thuringiensis var. for larvae of the spruce budworm Choristoneura fumiferana. J.Invert. Pathol. 15:92-9,1970
126. \_\_\_\_\_, Toxicity of Bacillus thuringiensis for lar

vae of the cloths moth, Tineola bisselliella  
J. Invert. Path. 14 : 423-4, 1969

127. YUSTEN, A.A. & ROGOFF, M.H.- Metabolism of Bacillus thuringiensis in relation to spore and crystal formation. Journal of Bacteriology - 100 : ~~1229-36~~, 1969