

# PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE BIOINSETICIDAS BACTERIANOS

JOSÉ MANUEL CABRAL DE SOUSA DIAS<sup>1</sup>

**RESUMO** – Dentre os agentes de controle biológico em utilização em todo o mundo, os bacilos entomopatogênicos apresentam especial importância. Produtos à base de *Bacillus thuringiensis* são comercializados há mais de 50 anos, com um mercado estimado em 60 a 80 milhões de dólares por ano. Prevê-se que esta utilização vá aumentar, na medida em que legislações de proteção ambiental mais rigorosas forem adotadas e produtos mais eficientes e baratos forem lançados. O mercado de bioinseticidas para controle de vetores também deverá se expandir acentuadamente. Atualmente, são usados produtos à base de *B. thuringiensis israelensis* para controle de mosquitos do gênero *Aedes* e de simúlídeos. Produtos à base de *B. sphaericus*, que são efetivos contra *Culex* estão em fase final de desenvolvimento. Em um trabalho de campo efetuado em Brasília, foram substituídos os larvicidas químicos por bioinseticida à base de *B. sphaericus* no controle de *Culex quinquefasciatus*, mantendo-se o mesmo nível de controle. Muitos progressos tem sido feitos na produção de bioinseticidas bacterianos, principalmente no isolamento de estirpes mais eficientes e com diferentes insetos-alvo, no desenvolvimento do processo fermentativo (meios de cultura, condições de cultivo e modo de operação) e no desenvolvimento de novas formulações mais estáveis e com maior persistência. Através da biologia molecular estão sendo desenvolvidos novos conceitos em proteção de plantas contra o ataque de insetos, como as plantas transgênicas e as toxinas empacotadas, o que permite prever que os bacilos entomopatogênicos ainda serão usados, diretamente ou como fonte de material genético, por muito tempo.

Termos para indexação: *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus sphaericus*, controle biológico, inseticidas biológicos, mosquito, lagarta, Coleoptera, fermentação de *Bacillus*.

## PRODUCTION AND USE OF BACTERIAL INSECTICIDES

**ABSTRACT** – Among the biocontrol agents used in the world, the entomopathogenic bacilli are of special importance. *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) products have been commercialized for more than 50 years, with an annual market of 60 to 80 million dollars. It is expected that the use of *Bt* will implement, as stricted environmental protection regulations are adopted, and more efficient and less expensive products become available. The bioinsecticide market for vectors control might also significantly improve. Today, a product based on *B. thuringiensis israelensis* is being used to control simúlids and mosquitoes of the genus *Aedes*. *B. sphaericus* products, effective against *Culex*, are in the final stage of development. A field work is being conducted in Brasília, where chemical larvicides were substituted by *B. sphaericus*, keeping the same control level. Much progress is being made with bacterial bioinsecticides, mainly in the isolation of more efficient strains for different insect pests, in the development of fermentation (culture media, process condition and operation) and more stable and persistent formulations. Through molecular biology, new concepts are being formulated for plant protection against insect attack, such as transgenic plants and packed toxins. This allows to predict that the entomopathogenic bacilli will continue to be used for many years, either directly or as source of genetic material.

Index terms: *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus sphaericus*, biological control, biological insecticides, mosquitoes, Coleoptera, caterpillar, *Bacillus* fermentation.

<sup>1</sup> Pesquisador – Responsável pela Área de Controle Biológico Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN/EMBRAPA) – CP 102372; 70770 – Brasília (DF).

## BREVE HISTÓRICO

Ao contrário de outros microrganismos, cuja utilização remonta a muitos séculos, a

descoberta e a exploração comercial das bactérias entomopatogênicas *B. thuringiensis* e *B. sphaericus* são eventos do Século XX, como pode ser visto na Tabela 1, onde se apresenta a cronologia de alguns fatos marcantes relacionados a esses microrganismos.

A primeira menção a doenças em insetos causada por esse tipo de bactéria data de 1902, quando ISHIWATA, no Japão, descreveu uma bactéria esporulante que causava mortalidade em bicho-da-seda (*Bombix mori*). Em 1911, BERLINER, na Alemanha, descreveu o mesmo tipo de bactéria atuando sobre a traça-das-farinhas (*Anagasta Kuhnella*) e, em 1915, a batizou de *Bacillus thuringiensis* (Habib & Andrade 1986). O potencial do *Bt* para o controle de lepidópteros logo foi reconhecido, tanto que um produto à base desse bacilo, passou a ser comercializado, na França, em 1938; chamava-se Sporeine e embora sua produção fosse muito rudimentar, era efetivo contra diversas lagartas de hortaliças e pomares (Daoust 1990).

No caso do *Bacillus sphaericus* o reconhecimento da entomopatogenicidade foi muito mais demorado. Descrito como um bacilo com

esporo subterminal esférico e deformante e batizado em 1904 (Neide 1904), apenas em 1965 sua atividade contra larvas de culicídeos foi reconhecida (Kellen et al. 1965). Entretanto, a estirpe então descoberta (*B. sphaericus* K) não era muito potente, o que limitou sua utilização.

Ainda na década de 1960, o desenvolvimento da sorologia flagelar por de Barjac & Bonnefoi (1962) permitiu grande avanço na sistemática e classificação dos bacilos entomopatogênicos, inicialmente para as subespécies de *B. thuringiensis* e, posteriormente *B. sphaericus* (de Barjac et al. 1980). Hoje, a sorologia flagelar é um método universalmente utilizado e, em alguns casos, a classificação sorológica tem sido associada com a patogenicidade contra alguns insetos (de Barjac & Frachon 1990).

Em 1977 e em 1983 ocorreram descobertas marcantes, que ampliaram o espectro de utilização dos bacilos entomopatogênicos. No primeiro caso, Goldberg & Margalit (1977) trabalhando com solos de Israel, encontraram uma estirpe de *B.t.* efetiva contra dípteros (culicídeos e simulídeos) que logo chamou a

**TABELA 1 – Resumo cronológico da descoberta e utilização de *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus*.**

ANO	EVENTO
1902	ISHIWATA - (citado por Habib & Andrade 1986) bacilos causando doença em <i>Bombix mori</i>
1904	NEIDE - <i>Bacillus sphaericus</i> não patogênico
1915	BERLINER - (citado por Habib & Andrade 1986) <i>Bacillus thuringiensis</i> atacando <i>Anagasta Kuehniella</i>
1938	SPOREINE - primeiro produto vendido (Daoust, 1990)
1962	de BARJAC & BONNEFOI - sorotipos H
1965	KELLEN et al. - <i>Bacillus sphaericus</i> patogênico contra mosquitos
1977	GOLDBERG & MARGALIT - <i>Bacillus thuringiensis</i> subesp. <i>israelensis</i> atacando culicídeos
1983	KRIEG et al. - <i>Bacillus thuringiensis</i> subesp. <i>tenebrionis</i> atacando coleópteros
1987	ADANG et al. - tabaco transgênico BARTON et al. - tabaco transgênico FISCHOFF et al. - tomate transgênico VAECK et al. - tomate transgênico
1989	GELERNTER & QUICK - toxinas de <i>Bt</i> empacotadas em <i>Pseudomonas fluorescens</i>

atenção por sua elevada potência larvicida e que foi batizada como *Bacillus thuringiensis* subesp. *israelensis*. Da mesma forma, em 1983, na Alemanha, foi isolada uma estirpe bacilar efetiva contra coleópteros, principalmente crisomelídeos, e que foi batizada como *B. thuringiensis* subesp. *tenebrionis* (Krieg et al. 1983).

Em 1987 foram conseguidas as primeiras plantas transgênicas, com a incorporação dos genes codificadores das proteínas tóxicas de *B. thuringiensis* em tabaco (Adang et al. 1987; Barton et al. 1987; Vaeck et al. 1987) e em tomate (Fischhoff et al. 1987). Estes trabalhos abriram grandes perspectivas para a criação de novas variedades de plantas, que podem incorporar características de resistência seletiva a insetos, com interesse econômico imediato.

Em 1989, foi desenvolvido o conceito de "toxinas empacotadas": os genes codificados das toxinas de *B.t.* foram transferidos para *Pseudomonas*, que passou, então, a produzir os cristais protéticos (Gelernter & Quick 1989). Essa nova estratégia de utilização das toxinas será discutida mais adiante.

Observa-se, então, que importantes avanços científicos e tecnológicos foram realizados recentemente, no tocante aos bacilos entomopatogênicos, o que permite prever que esses microrganismos continuarão a ser estudados e utilizados, diretamente ou como fonte de material genético, ainda por muito tempo.

## PRODUTOS E MERCADOS

O mercado mundial de inseticidas está estimado em cerca de 4,0 bilhões de dólares e nele os produtos à base de *B. thuringiensis* ocupam modesta posição, com vendas anuais entre 60 e 80 milhões de dólares, o que corresponde a cerca de 1,5 a 2,0% do total. Quais as causas para que esses produtos, que, a princípio, teriam utilização vantajosa em termos de preservação ambiental, proteção da saúde dos trabalhadores e produção de alimentos menos contaminados, apresentem tão pequena expressão?

Existem, pelo menos, três causas que podem ser imediatamente apontadas como limitantes para a utilização dos inseticidas bacterianos. A primeira diz respeito aos elevados custos de produção, que se refletem em custos de utilização tão ou mais elevados do que os dos inseticidas químicos. Outra causa aparente para a baixa utilização dos biológicos é a sua especificidade. O que para a preservação do meio ambiente é uma grande vantagem, para o agricultor pode ser um sério problema, devido à necessidade da utilização de outros produtos contra as pragas não controladas pelos larvicidas biológicos. E um terceiro aspecto, também importante, é a baixa persistência do efeito larvicida dos produtos quando usados a campo.

As Tabelas 2 e 3 apresentam uma compilação efetuada recentemente (Rajinchapel-Messai, 1990) a respeito dos bioinseticidas comerciais existentes no mundo. Na Tabela 2 aparecem os produtos à base de *B. sphaericus*, *Agrobacterium* e *Pseudomonas*. Dos três, vislumbra-se um mercado promissor para o *B. sphaericus*, que será, dentro em breve, lançado comercialmente na França e nos Estados Unidos, para o controle biológico de mosquitos, principalmente os do gênero *Culex*.

Os produtos à base de *B. thuringiensis* estão colocados na Tabela 3 e, como se nota imediatamente, há uma grande quantidade de fabricantes envolvidos, em diversos países como os Estados Unidos, Bélgica, Suíça, França e até mesmo na União Soviética. Alguns destes produtos já estão consolidados no mercado, enquanto aqueles desenvolvidos contra coleópteros, iniciaram recentemente seu ciclo comercial.

Devido, então, aos novos princípios ativos, à tendência mundial de diminuição do uso de inseticidas químicos e ao interesse das indústrias, o consumo dos bioinseticidas bacterianos tende a aumentar. Diversos estudos prospectivos apontam que novos produtos estão em desenvolvimento e que esses produtos irão combinar estirpes mais potentes com melhores formulações para obtenção de produtos mais eficientes e estáveis. Um exemplo recente da

TABELA 2 – Principais bioinseticidas bacterianos (excluindo *Bacillus thuringiensis*)

Bactéria/Espécie	Alvo	Cultura	Nome Comercial	Empresa/País
<i>Agrobacterium radiobacter</i> K84	<i>A. tumefaciens</i>	árvores frutíferas e ornament. videira	Gallitrol Galleine	Austrália Covagri (França)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Bacillus sphaericus</i>	<i>Phytium</i> <i>Rizoctonia</i> mosquitos	algodão	Dagger G.  Sphaerimos*	Ecogen (USA)  Solvay (Bélgica) Duphar (P. Baixos)

\* Registro pedido

FONTE: RAJNCHAPEL-MESSAI 1990

TABELA 3 – Principais bioinseticidas à base de *Bacillus thuringiensis*

SOROTIPO/SUBESPEC. ALVO		NOME COMERCIAL	EMPRESA/PAIS
H1/ <i>thuringiensis</i> H3/ <i>kurstaki</i>	muitas espécies de lagartas	Dipel Bactospeine Thuricide Javelin Foray 48B Biobit  Foil/Condor Dendrobacilline	Abott (USA) Solvay (Bélgica) Sandoz (Suíça) Sandoz (Suíça) Calliope (França) Novo-Nordisk (Dinamarca) Ecogen (USA) Glavmikrobioprum (URSS)
H7/ <i>aizawai</i>	<i>Galleria melonella</i>	Certan Florbac	Sandoz Solvay
H14/ <i>israelensis</i>	mosquitos e simuliídeos	Vectobac Bactimos Teknar Skeetal	Abbot Solvay Sandoz Novo Nordisk
H8/ <i>morrisoni</i> ( <i>tenebrionis</i> & <i>san diego</i> )	coleópteros	Di-Terra M-One Trident Novodor	Abbot Mycogen Sandoz Novo Nordisk

FONTE: RAJNCHAPEL-MESSAI 1990

ampliação do uso desses produtos foi apresentado na Reunião da Society of Invertebrate Pathology-SIP, mostrando que, na China, em uma unidade fabricante de *B. thuringiensis* para utilização agrícola, a produção, em três anos quase triplicou, pois passou de 260 toneladas em 1986 para 732 em 1989 (Tianjian et al. 1990).

### NOVAS ESTIRPES

Um aspecto muito importante no desenvolvimento de novos bioinseticidas é a descoberta de estirpes com maior atividade ou melhor adaptadas às condições em que os produtos serão utilizados. Podemos apontar, como exemplo desse tipo de trabalho, o isolamento, em nosso laboratório, de uma estirpe de *B. sphaericus* altamente tóxica contra larvas de mosquitos. (Schenkel et al. 1988). Essa estirpe, batizada como S2, mostrou-se mais letal do que a estirpe 2362, recomendada pela Organização Mundial de Saúde, como demonstram os resultados de bioensaios comparativos efetuados contra larvas de segundo estágio de *Culex quinquefasciatus* que são apresentados na Tabela 4. (Vilarinhos et al. 1988b). De acordo com os resultados experimentais pode-se concluir que o bacilo S2 é cerca de 25% mais eficiente do que *B. sphaericus* 2362, quase duas vezes mais potente do que a

Cypermtrina e cerca de nove vezes mais letal do que *B. thuringiensis* subesp. *israelensis*, nas condições estudadas.

### ASPECTOS DA FERMENTAÇÃO

Outro fator muito importante para a diminuição dos custos de produção dos bioinseticidas bacterianos é a melhora da fermentação, que pode ser conseguida tanto pela utilização de matérias-primas mais baratas e que resultem em maiores fatores de conversão dos nutrientes em células e/ou em toxinas, quanto pela otimização do processo fermentativo propriamente dito.

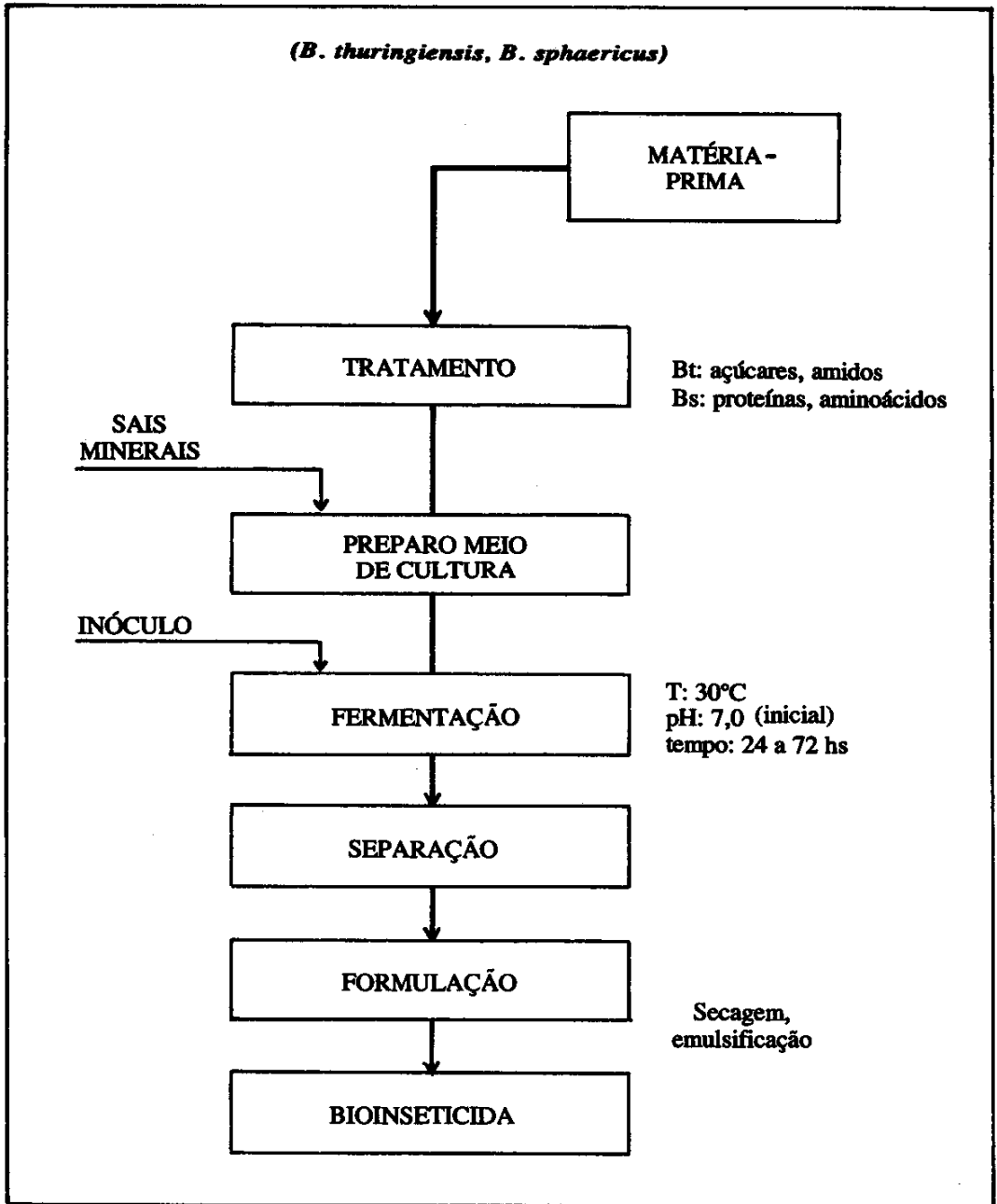
De uma forma geral, a produção, tanto de *Bacillus thuringiensis* quanto de *B. sphaericus*, é bastante simples, (Dulmage et al. 1990) como pode ser visualizado na Figura 1. Os substratos passam por pré-tratamentos que visam aumentar sua pureza ou a disponibilidade dos nutrientes essenciais ao crescimento microbiano, e são transformados em meios de cultura pela adição de sais mineirais e, muitas vezes, vitaminas e fatores de crescimento. A fermentação deve ser conduzida em temperatura entre 28° e 32° C, havendo necessidade, em alguns casos de controle de pH em torno de 7,0. O tempo de processo, dependendo das condições pode demorar de 24 a 72 horas. É muito importante salientar que o processo de-

TABELA 4 – Valores de  $Cl_{50}$  de larvicidas testados em três dias consecutivos (R1, R2, R3) e potência\* comparativa à estirpe S2.

Larvicida	$Cl_{50}$ 48 h (ng/ml)				Potência relativa (%)
	R1	R2	R3	Média	
<i>Bt israelensis</i>	56,8	41,3	81,6	59,9	12,2
Cypermtrina	14,4	14,8	11,2	13,1	55,7
<i>B. sphaericus</i> 2362	5,3	8,6	11,6	9,5	76,8
S2	7,1	7,2	7,4	7,3	100,0

$Cl_{50}$  – Concentração letal para matar 50% da população de larvas de *Culex* de segundo estágio.

\* Potência relativa dada por:  $\{(Cl_{50})_{S2}/(Cl_{50})_X\} \cdot 100\%$



**FIG. 1 - Produção de bioinseticidas.**

ve ser conduzido através de estratégias que permitam o crescimento bacteriano, a esporulação e a produção de toxinas.

Em seguida, o caldo fermentado passa por operações de separação e/ou concentração dos microrganismos (precipitação, centrifugação, filtração tangencial, ultrafiltração, etc.) e a biomassa concentrada é enviada para a formulação e para o controle de qualidade.

As matérias-primas que podem ser utilizadas diferem um pouco, no caso de *B. thuringiensis* ou de *B. sphaericus*, uma vez que este último não consome açúcares, sendo aminoácidos e proteínas as suas principais fontes de carbono e nitrogênio. Para essa bactéria alguns outros substratos constituídos por ácidos orgânicos e álcoois estão sendo pesquisados e serão enfocados posteriormente. *B.t.* consome açúcares e amido, além de aminoácidos e proteínas, tornando mais simples a escolha de seus substratos.

Existe uma quantidade muito grande de subprodutos e resíduos de agroindústrias que podem ser usados como substratos para os bacilos mencionados. Melaço, águas de lavagem e prensagem de frutas e cereais, resíduo de monossódio glutamato, soro de queijo, peptonas, sangue e resíduos de matadouros, tortas

oleaginosas, farinha de peixe encontram-se entre os que podem ser explorados com a finalidade de produção desses bacilos. Respeitadas as limitações nutricionais do *B. sphaericus*, esta gama de substratos, permite, inclusive, a produção regionalizada em função da disponibilidade de matérias-primas.

Muitos trabalhos têm sido realizados para a formulação de meios de cultura adequados à produção de bacilos entomopatogênicos (veja Ertola 1987). Um exemplo é o desenvolvimento do processo de fermentação de *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki* (Btk) efetuado na Argentina. Esse bacilo é utilizado contra muitas lagartas de importância econômica e é a base de diversos produtos comerciais, como pode ser visto na Tabela 3. Arcas et al. (1984) estudaram a concentração ótima de glicose para o crescimento e toxicidade do referido bacilo contra *Galleria melonella*. No processo original, usava-se 8 gramas de glicose e 2 gramas de extrato de levedura por litro de meio de cultura, além de sais minerais. Esses autores trabalharam com meios mais ricos, tendo-se aumentado proporcionalmente as concentrações de todos os componentes, de 3 a 11 vezes. Como se observa da Figura 2, a velocidade específica de crescimento e o fator

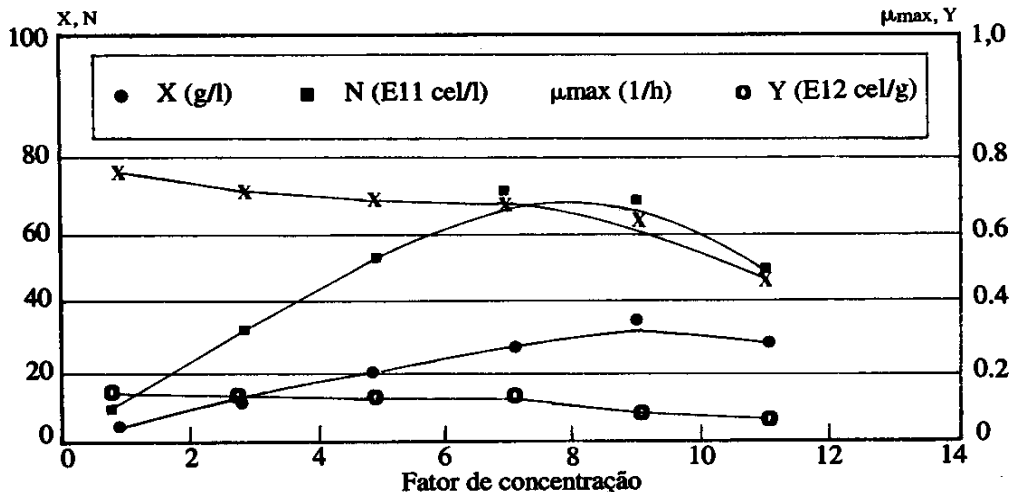


FIG. 2 - Influência da concentração de nutrientes no crescimento e toxicidade de *Bacillus thuringiensis*. (Arcas 1984)

de conversão de glicose em células, mantiveram-se praticamente constantes até um fator de concentração de 7 vezes e a concentração de biomassa e de células, aumentaram proporcionalmente ao aumento da concentração de substratos até esse mesmo fator de concentração. Neste caso, a potência larvívica do *Btk* contra o inseto-alvo foi sempre proporcional à concentração celular, o que levou a considerar o referido meio de cultura 7 vezes mais concentrado como ótimo para o processo em questão, pois permitiu aumentar significativamente a produtividade celular e de toxinas do processo.

Temos trabalhado para o desenvolvimento da produção de *B. sphaericus* com água de levedura como fonte de carbono e nitrogênio. Esse substrato tem algumas vantagens como matéria-prima industrial, por que a levedura é um subproduto das indústrias de etanol, sendo, então, relativamente barata e de fácil aquisição em diversas regiões do país.

O crescimento, esporulação e toxicidade de *B. sphaericus* cultivado em água de levedura e em outros dois meios, um à base de caldo nutritivo e extrato de levedura (NYSM) e outro à base de infusão de cérebro e coração (BHI) e extrato de levedura estão apresentados na Tabela 5. Todos os cultivos foram efetuados em fermentador de 14 litros com 10 litros de meio de cultura, em temperatura e pH controlados (31 C ; 7,0) e sem limitação de oxigênio. Os resultados da Tabela 5 referem-se às amos-

tras de 48 horas (Vilarinhos et al. 1988a). Como se observa, a concentração celular (tanto em massa seca quanto em unidades formadoras de colônias) a concentração de esporos e a porcentagem de esporulação no ensaio com água de levedura foram inferiores às observadas para os cultivos com os outros meios de cultura. Entretanto, a  $Cl_{50}$  das células cultivadas em água de levedura mostrou-se idêntica à obtida com BHI e a metade da obtida com NYSM, o que demonstra o potencial da água de levedura como substrato principal para a produção de *B. sphaericus*. Outros estudos relacionados com a concentração ótima de fermento na água de levedura e aos métodos de preparo da mesma (Honda et al. 1989) e com a influência do pH inicial e do controle desse parâmetro no processo (Dias et al. 1990a) foram posteriormente realizados. Atualmente, estuda-se a porcentagem ótima de inoculação para o processo descontínuo e a influência de fontes inorgânicas de nitrogênio e vitaminas sobre a esporulação e toxicidade do microrganismo. Com a definição desses fatores, espera-se dentro em breve ter a tecnologia para produção de *B. sphaericus* a partir de água de levedura, o que poderá resultar no lançamento de um produto comercial, caso haja empresas interessadas em explorar o mercado brasileiro de produtos para o controle biológico de mosquitos.

Substâncias puras também estão sendo pesquisadas como fontes de carbono para *B.*

**TABELA 5 – Influência de diferentes substratos nas concentrações celulares, porcentagens de esporulação e toxicidade de *B. sphaericus* 2362.**

Meio de cultura	X (g/l)	N (cel/ml)	E (esp/ml)	%E	$Cl_{50}/48h$ (ng/ml)
NYSM	2,20	$1,7 \cdot 10^8$	$1,4 \cdot 10^8$	82,4	10
BHI	5,83	$9,1 \cdot 10^{10}$	$7,7 \cdot 10^{10}$	84,7	5
ÁGUA DE LEVEDURA	1,42	$3,5 \cdot 10^7$	$3,5 \cdot 10^7$	70,0	5

NYSM – caldo nutritivo

BHI – infusão de cérebro e coração



*sphaericus*. Trabalho recente estudou diversas vias metabólicas desse microrganismo utilizando acetato, gluconato e glicerol como fontes de carbono em meios definidos (Russel et al. 1989). Outro aspecto importante foi relatado por Friedlander et al. (1989) e Klein et al. (1989): a toxicidade de *B. sphaericus* 2362 contra *Culex* aumentou cerca de dez vezes, quando glicerol foi adicionado a meios proteínicos em relação a obtida nos meios de cultura à base de proteínas sem glicerol.

Existem algumas vantagens na utilização de glicerol como componente de meios de cultura (Dias et al. 1990b) uma vez que o mesmo é relativamente barato, é produzido em grande quantidade no Brasil, é facilmente manuseado em nível industrial e simplifica o processo de produção esquematizado na Figura 1. Sendo assim, procurou-se estudar melhor a possibilidade de utilizá-lo isoladamente ou em conjunto com outras fontes de carbono para a produção de *B. sphaericus* 2362 (Villela et al. 1990).

Inicialmente efetuou-se a determinação da concentração ótima de glicerol, quando esse substrato era usado como principal fonte de carbono. O meio de cultura foi suplementado com sais minerais e 1,0 g de extrato de levedura/litro. Os cultivos foram efetuados em incubador rotativo, com temperatura controlada em 30°C e sem controle de pH. A Figura 3 apresenta um diagrama comparativo da concentração celular e da  $CL_{50}$  contra *Culex quinquefasciatus* das amostras colhidas às 48 horas de cultivo, em ensaios realizados com concentrações iniciais de 3, 7, 15 e 20g de glicerol/litro (G3, G7, G15 e G20 respectivamente).

As concentrações iniciais de glicerol de 3 e 7 g/l conduziram a maiores concentrações celulares e menores valores de  $CL_{50}$ . Nas concentrações mais elevadas, glicerol parece ter inibido o desenvolvimento microbiano e a produção de toxinas, uma vez que os valores de  $CL_{50}$  do G15 e do G20 foram cerca de 3 e 5 vezes superiores à do G3.

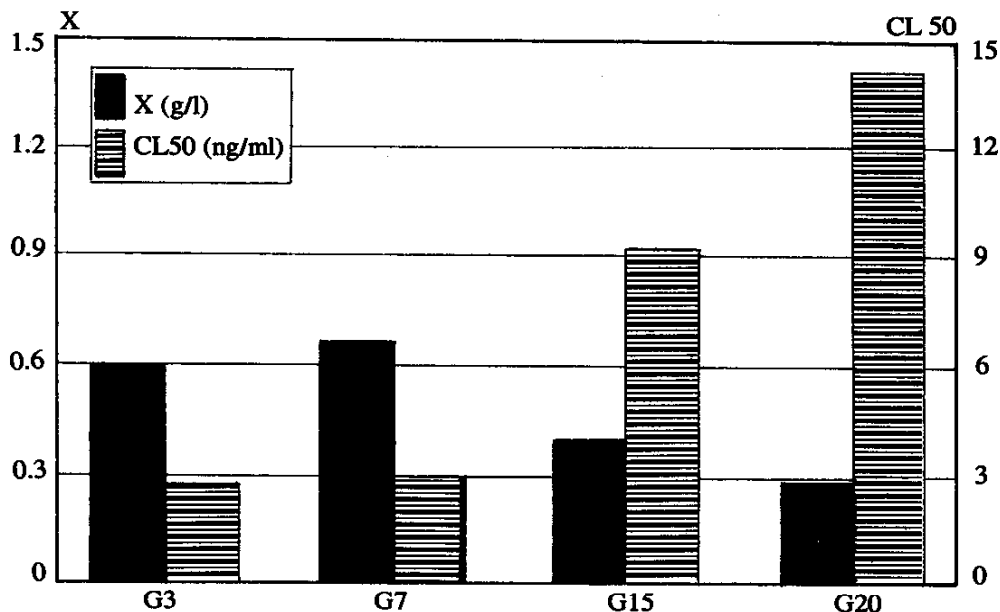


FIG. 3 - Concentração celular e  $CL_{50}$  de *B. sphaericus* cultivado em diferentes concentrações iniciais de glicerol.

Foi também avaliado o efeito da adição de glicerol ao meio de água de levedura, já mencionado anteriormente (Tabela 5). Foram conduzidos ensaios com meio à base de água de levedura e sais minerais, com meio à base de glicerol (7,0 g/l), sais minerais e extrato de levedura (1,0 g/l) e com meio à base de água de levedura, glicerol (7,0 g/l) e sais minerais. Esses ensaios foram denominados AL, G7 e ALG7, respectivamente. A Figura 4 apresenta os resultados obtidos às 48 horas de cultivo. O primeiro aspecto a comentar diz respeito a menor concentração celular obtida no ensaio ALG7, em relação ao AL. A menor massa seca medida no ALG7 deve-se à maior esporulação observada nesse crescimento: para concentrações celulares da mesma ordem de grandeza (cerca de  $3 \cdot 10^8$  UFC/ml) em ambos os ensaios, a concentração de esporos do ALG7 era cerca de 10 vezes superior à do AL ( $7 \cdot 10^7$

e  $8 \cdot 10^6$  esporos/ml, respectivamente). Observando-se a grande diferença entre as toxicidades obtidas nos dois ensaios, chega-se a conclusão análoga à de Friedlander et al (1989) de que o glicerol teve efeito indutor sobre a esporulação e a produção de toxinas em *B. sphaericus*. Isto é muito importante quando se pensa na produção deste microrganismo, na medida em que será possível aumentar a produtividade do processo, adicionando-se uma substância barata e de grande disponibilidade com o glicerol.

Um outro aspecto que merece muita atenção na busca de melhores rendimentos e produtividades para a produção de bacilos entomopatogênicos e suas toxinas é a otimização do processo fermentativo propriamente dito. Estudo muito importante nesse sentido foi realizado na Argentina, onde foram comparados os parâmetros de produção de *Bacillus*

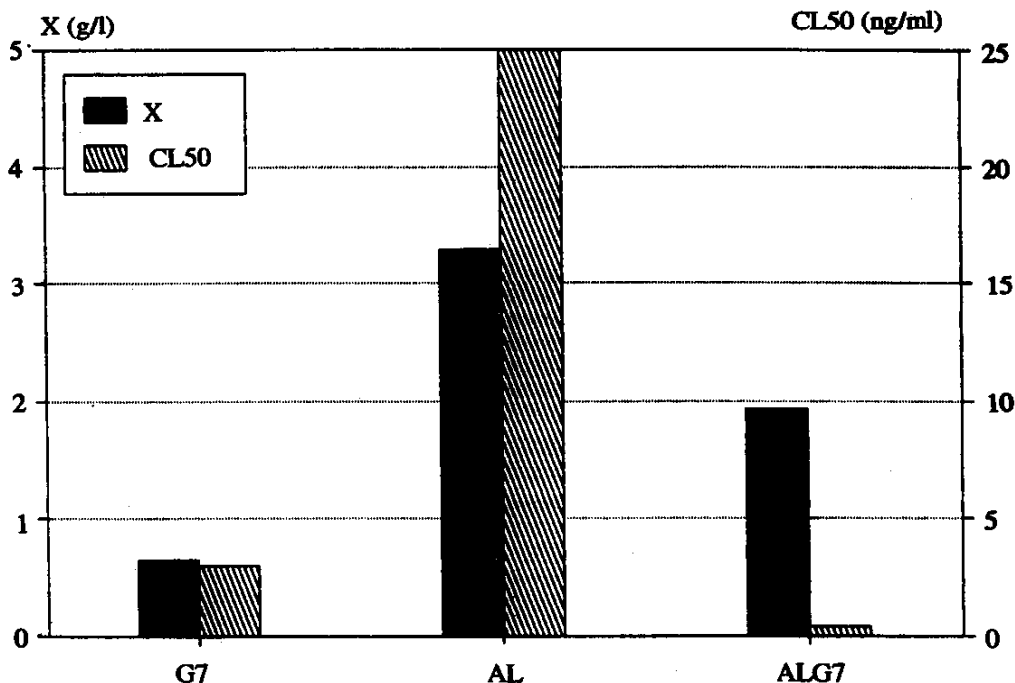


FIG. 4 - Concentração celular final e toxicidade de *B. sphaericus* crescido em glicerol e água de levedura.

*thuringiensis* subesp. *kurstaki* em processo descontínuo alimentado ("fed-batch") (Arcas 1985, Arcas et. al 1985). Usando o meio de cultura anteriormente determinado (cf fig 3, Arcas et al,1984) foram feitos ensaios comparativos dos 2 processos em fermentador de 6 litros. A Figura 5 apresenta o resultado de uma dessas comparações, onde o tempo de enchimento do tanque de fermentação foi de 20 horas. Após um tempo total de processo de 48 horas, a concentração de biomassa no proces-

so descontínuo alimentado era cerca de 42 g/l, enquanto no processo descontínuo era de 25 g/l. Assim como ocorria no processo descontínuo, também em "fed-batch" a toxicidade microbiana era diretamente proporcional à concentração celular. Neste caso, o processo descontínuo alimentado mostrou-se muito mais vantajoso do que o descontínuo, uma vez que para o mesmo consumo de substrato, foram obtidas produtividades celulares e de toxinas cerca de 90% superiores.

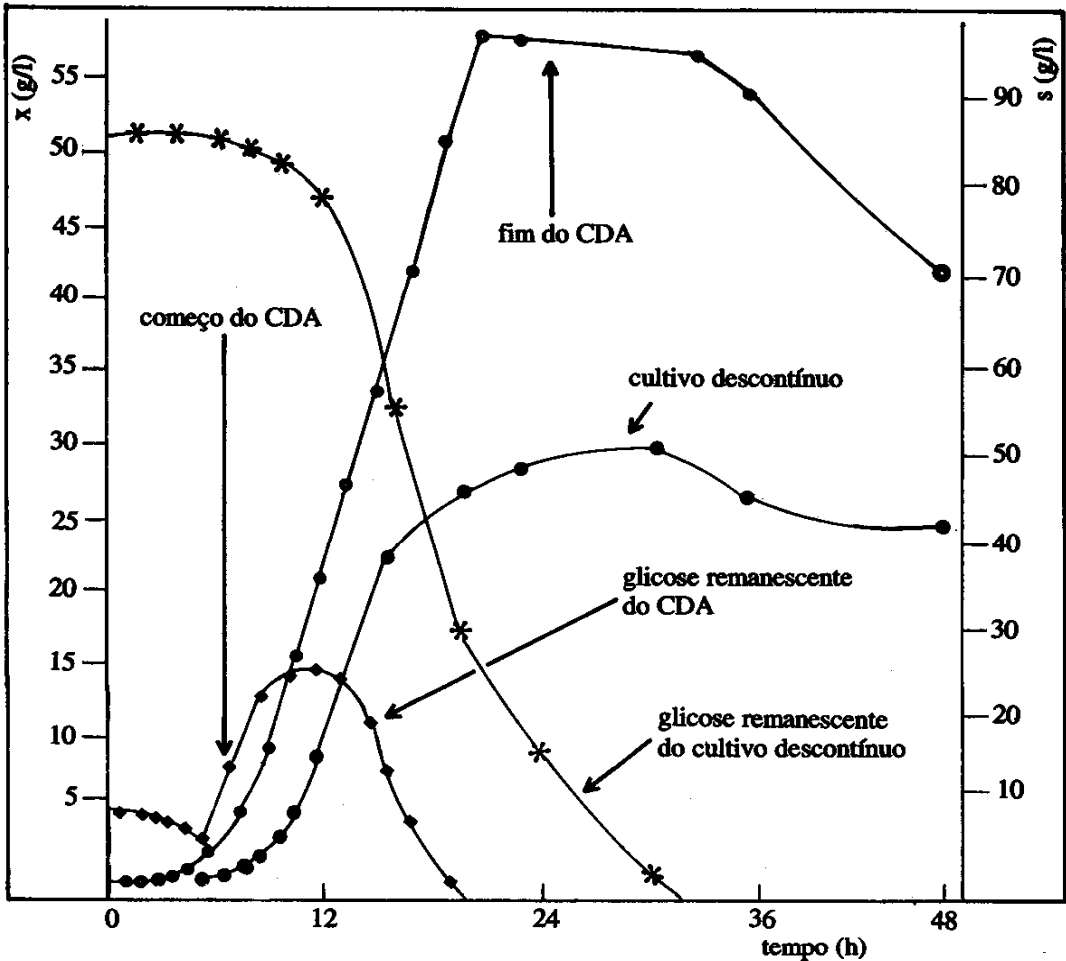


FIG. 5 - Curvas de consumo de glicose e crescimento de *Bacillus thuringiensis kurstaki* em cultivo descontínuo alimentado (CDA). (Arcas 1984)

## ASPECTOS DA FORMULAÇÃO

Tecnicamente, uma formulação é qualquer combinação de um biocida ativo com um segundo material (Couch & Ignoffo 1981). Dependendo das características desejadas para o produto, os materiais empregados na formulação de bioinseticidas podem ter propriedades aderentes, emulsificantes, dispersantes, protetoras contra radiação, flutuantes, atrativas, ou praticamente inertes.

Formular um microrganismo tem por objetivo melhorar o bioinseticida, tanto no momento da produção quanto no da utilização. O formulado apresenta, via de regra, maior uniformidade e facilita o controle de qualidade e as recomendações de uso em campo. Deve assegurar também maior estabilidade entre a produção e as diversas etapas da comercialização (vida de prateleira), evitando a degradação do princípio ativo durante o transporte e armazenamento e no momento da aplicação. A formulação eficiente, por outro lado, freqüentemente leva a uma melhora do contacto do microrganismo com os insetos-alvo.

As características dos formulados para utilização em ambientes terrestres ou aquáticos têm que ser completamente diferentes. Para o controle das pragas da agricultura (lepidópteros e coleópteros) o produto deve se dissolver, facilmente, no momento da aplicação necessitando, então, de um dispersante. Precisa também manter-se na superfície das folhas, sem ser carregado por orvalho ou chuvas fra-

cas: esse efeito é conseguido pela incorporação de um aderente. A adição de um espessante evita-se a evaporação total, que poderia expor os esporos e as toxinas a efeitos adversos por causa de temperatura e radiação; Pode ser necessário, ainda, o uso de um protetor contra as radiações solares, principalmente os raios ultra-violeta. E, finalmente, para melhorar a ingestão por parte dos insetos, pode-se acrescentar uma isca ou um semioquímico.

Quanto aos produtos para matar mosquitos, que são tipicamente aplicados em ambientes aquáticos, a necessidade principal é que o princípio ativo não afunde muito depressa ou que fique em suspensão na interface ar-água, de modo a aumentar a probabilidade de ingestão das toxinas pelas larvas de dípteros. Para tanto são usados diversos materiais, de origem vegetal ou mineral, como vésculos para o bioinseticida.

A Tabela 6 apresenta alguns dos bioinseticidas comerciais a base de *Bacillus thuringiensis* subesp. *israelensis*. Deve-se observar que o parâmetro que norteia a recomendação de uso, em termos de quantidade a aplicar por m<sup>2</sup> ou por hectare de superfície aquática é potência larvicida, expressa em UTI (Unidades Tóxicas Internacionais) /mg e esse parâmetro também pode ser usado para atribuir valores comerciais comparativos aos produtos.

Para melhorar a persistência do *Bacillus thuringiensis* subesp. *israelensis*, estão sendo desenvolvidas formulações "slow release" que

TABELA 6 – Características de formulações comerciais de *Bacillus thuringiensis* subesp. *israelensis*

Nome comercial	Tipo	Potência (UTI/mg)	Tamanho médio das partículas (um)	Fabricante
TEKNAR	conc emuls.	600	2,1	Sandoz
VECTOBAC	pó molhável	2000	5,2	Abbot
BACTIMOS	pó molhável	3500	4,0	Bactimos

liberam lentamente o complexo esporo-toxina e o mantém disponível para as larvas por mais tempo. Essas formulações são em forma de pastilhas, "pellets" ou briquetes. Segundo Becker (1990) uma formulação de *Bacillus thuringiensis* subesp. *israelensis* em pastilhas mostrou-se efetiva no controle de *Aedes aegypti* por 50 dias em experimento realizado na Indonésia.

### UTILIZAÇÃO DE BIOINSETICIDAS BACTERIANOS

Como já mencionado, os bioinseticidas bacterianos vem sendo usados contra pragas da agropecuária há mais de 50 anos e extensa literatura a respeito encontra-se disponível. Contra mosquitos, a utilização data de cerca de duas décadas incluindo muitos exemplos de bem-sucedidos programas de controle de vetores, em geral apoiados pela Organização Mundial de Saúde (Becker 1990).

Na região urbana de Brasília (DF) tem sido utilizado um bioinseticida à base de *Bacillus sphaericus* para o controle de *Culex quinquefasciatus*. Esse bioinseticida é produzido em meios à base de caldo nutritivo ou de

água de levedura em nosso laboratório e aplicado rotineiramente pela Gerência de Controle de Zoonoses nos criadouros dos insetos (Schenkel et al 1989, Schenkel et al 1990). Juntamente com o trabalho de aplicação, os trabalhadores executam a avaliação do Índice de Positividade do Criadouro, estabelecendo-se que o criadouro é considerado positivo se tiver, pelo menos, uma larva viva de *Culex*.

Os trabalhos de controle de mosquitos eram desenvolvidos há muito tempo, usando inseticidas organofosforados e piretróides. A partir de maio de 1988, passou-se a utilizar o larvicida bacteriano, substituindo completamente (no restante do citado ano) a aplicação dos produtos químicos. Os resultados das medidas efetuadas pelos próprios aplicadores de inseticidas dos parâmetros que eram normalmente computados para avaliar a eficiência global do controle de mosquitos estão condensados na Tabela 7. Nota-se que entre 1984 e 1986 o índice de positividade dos criadouros estava entre 9 e 15%. Em 1987, quando o inseticida biológico ainda não era utilizado, o número de focos examinados decaiu acentuadamente, devido, provavelmente a problemas operacionais. Em consequência, o índice de positividade aumentou para 26,7%. Da mesma

TABELA 7 - Eficiência global no controle de mosquitos em Brasília entre os anos de 1984 e 1988.

ANO	1984	1985	1986	1987	1988
Total de criadouros examinados	71.159	164.434	128.97	66.348	90.884
Total de criadouros positivos	10.270	14.797	12.643	17.697	29.269
Índice de positividade dos criadouros (%)	14,4	9,0	9,8	26,7	32,2
Média anual de criadouro por foco potencial	1,97	1,89	1,90	2,84	2,82

FONTE: Gerência de Controle de Zoonoses do Instituto de Saúde do Distrito Federal.

forma a média anual de criadouros por foco, que entre 1984 e 1986 mantivera-se inferior a 2,0, aumentou para 2,84 em 1987.

De maio a dezembro de 1988 os inseticidas químicos foram substituídos por caldo fermentado de *Bacillus sphaericus*, diluído no momento da aplicação. O pessoal envolvido, os equipamentos de aplicação e as rotinas operacionais foram mantidos, com a única diferença de que não foram mais utilizados os equipamentos de proteção individual (máscaras, óculos e luvas). Houve um aumento do índice de positividade dos criadouros no ano de 1988 em relação ao de 1987 da ordem de 4,5%, com um incremento percentual de 16,7% (Tabela 7). Esse aumento pode ter sido consequência da necessidade de ajustes na metodologia de aplicação, ajustes esses absolutamente normais quando se inicia a utilização de um novo produto, ou devido ao recrudescimento dos problemas operacionais que já haviam sido sentidos no ano anterior. De qualquer forma, foi muito positivo que após a substituição dos produtos químicos pelos biológicos, a situação tenha-se mantido sob controle, mostrando que, nesse caso a mencionada substituição não acarretou maiores danos. Finalmente, nota-se, pela Tabela 8 um efeito bastante positivo do controle biológico de mosquitos em Brasília: foi possível substituir considerável parcela dos inseticidas químicos por pouco menos de 40 litros de caldo contendo *B. sphaericus*, que

não tem efeitos adversos sobre as populações, não é nocivo para os insetos não-alvo e não acarreta problemas para o meio ambiente.

### TOXINAS EMPACOTADAS – NOVA ESTRATÉGIA DE CONTROLE BIOLÓGICO

Através da transferência de genes de que codificam a toxina de *B.t. kurstaki* para *Pseudomonas fluorescens*, esta última bactéria passou a produzir o cristal protéico ao final da fase exponencial de crescimento, mas, ao contrário do bacilo, não sofre a lise celular (Gelernter & Quick 1989). Para aproveitar essa singular característica em um processo industrial, ao término da fermentação as bactérias são mortas através de um processo físico-químico que não afeta a toxina. Assim consegue-se a toxina encapsulada, que pode ser facilmente formulada e aplicada e cuja ação aparecerá apenas no intestino das lagartas, quando a alcalinidade e as proteases levarem à degradação da parede celular da *Pseudomonas*. Este é, exatamente, o local onde os cristais protéicos são ativados para desencadear os efeitos citopáticos que levam à ruptura das células e à morte dos insetos, de modo que as toxinas são efetivamente produzidas no momento da utilização, sem qualquer risco para o meio ambiente (Fuxa 1988).

**TABELA 8 – Consumo de inseticidas no controle de mosquitos e outros insetos em Brasília (DF) nos anos de 1987 e 1988.**

Inseticida (litros ou quilos)	Ano de 1987	Ano de 1988
Cythion	111	–
K-Othine	3,65	–
Stockade	82,42	–
Ectomin	54,79	48,20
Cymperator	–	3,68
<i>Bacillus sphaericus</i> (litros)		38,8

FONTE: Gerência de Controle de Zoonoses do Instituto de Saúde do Distrito Federal

Essa nova estratégia pode ser utilizada para outros bacilos entomopatogênicos e para outras bactérias receptoras de genes, de modo a obter cápsulas de toxinas específicas para diversos insetos de interesse econômico ou da saúde pública.

O bioinseticida à base de genes de *Btk* em *Pseudomonas*, denominado MVP, foi aprovado em 1º de março de 1990, para ensaios de campo nos Estados Unidos da América (Gelernter 1990).

Dois aspectos devem ser rapidamente comentados em relação ao sistema MVP: a biosegurança e a indução de resistência. Como este bioinseticida não contém nem microrganismos vivos, nem esporos, sua utilização não acarreta problemas de biosegurança (Fuxa 1988). Esse argumento, aparentemente, levou as autoridades norte-americanas a aprovar rapidamente a realização de ensaios de campo com este produto. Por outro lado, por ser um bioinseticida que contém apenas as toxinas como princípio ativo, pode causar o desenvolvimento da resistência a essas substâncias por parte dos insetos, com muito maior rapidez do que o complexo microrganismo-esporo-toxina poderia causar (Davidson 1990).

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Quase noventa anos passados desde a primeira menção aos bacilos entomopatogênicos, nota-se um incremento no interesse por essas bactérias, tanto do ponto de vista científico, quanto do ponto de vista tecnológico.

No primeiro aspecto, o interesse maior tem sido descobrir os fatores determinantes da especificidade da ação larvicida, associando-a com a composição genômica e a estrutura dos cristais protéicos.

No aspecto tecnológico desponta o interesse em produzir bioinseticidas com diversos insetos-alvo e que tenham preços competitivos com os dos produtos químicos atualmente em uso. Para tanto, além da busca incessante de novas estirpes com maiores potências larvicidas, tem-se procurado otimizar os processos

de fermentação de modo a utilizar matérias-primas de baixo valor comercial e conseguir elevadas produtividades de células e de toxinas. Também a formulação dos princípios ativos tem sido melhorada para garantir maior persistência e eficiência da ação larvicida.

Unindo os aspectos científicos com os tecnológicos estão em desenvolvimento os trabalhos com toxinas empacotadas e com plantas transgênicas. Fascinantes em sua concepção e extremamente úteis em sua utilização, esses produtos das biotecnologias modernas apontam a enorme importância que a disponibilidade de novas estirpes de bacilos entomopatogênicos e o conhecimento mais profundo de suas características terão no futuro.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Rose Gomes Monnerat Schenkel, Cláudia Santana Honda, Paulo de Tarso Ribeiro Vilarinhos e Paulo Oliveira Villela pela colaboração nos trabalhos experimentais realizados no Laboratório de Bacteriologia da Área de Controle Biológico do CENARGEN citados nesta revisão e a Bonifácio Peixoto Magalhães pela leitura e discussão do manuscrito.

## REFERÊNCIAS

- ADANG, M.J.; FIROZABADY, E.F.; KLEIN, J.; DeBOER, D.; SEKAR, V.; KEMP, J.D.; MURRAY, E.; ROCHELEAU, T.A.; RASHKA, K.; STAFFELD, G.; STOCK, C.; SUTTON, D.; MERLO, D.J. Expression of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein gene in tobacco plants. In: ARNTZEN, C.Y.; RYAN, C. (Eds.) **Molecular Strategies for crop protection**. New York: Allan Liss, 1987 vol 48 p. 345-353. (UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology).
- ARCAS, J. **Producción de bioinseticidas**. Universidad Nacional de La Plata, Tese de Doutorado, 1985.

- ARCAS, J.; YANTORNO, C.F.; ARRARAS, E.; ERTOLA, R. A new medium for growth and delta-endotoxin production by *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology Letters* v.6, p. 495-500, 1984.
- ARCAS, J.; YANTORNO, C.F.; ERTOLA, R. Production of delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis* by batch and fed-batch cultures. GIAM Conference, 7, 1985, Helsinki, Finland. **Proceedings**. 1985.
- BARTON, K.A.; WHITELEY, H.R.; YANG, N.S. *Bacillus thuringiensis* delta endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. *Plant Physiology*. v. 85, p.1103-1109, 1987.
- BECKER, N.; Microbial control of mosquitoes and blackflies. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM OF INVERTEBRATE PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL, 5, 1990, Adelaide, Australia. **Proceedings...** 1990, p. 84-90.
- COUCH, T.L.; IGNOFFO, C.M. Formulation of Insect Pathogens. In: BURGESS, H.D. (Ed.) **Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980**; London, Academic Press, 1981, p.621-634.
- DAOUST, R.A.; Commercialization of Bacterial insecticides. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM OF INVERTEBRATE PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL, 5, 1990, Adelaide, Australia. **Proceedings**. 1990, p. 7-11.
- DAVIDSON, E.W.; Development of Insect Resistance to biopesticides. IN: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 2, 1990, Brasília, **Resumos...** Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1990. p. 28-29. (EMBRAPA/CENARGEN, Documentos, 13)
- de BARJAC, H.; BONNEFOI, A. Essai de classification biochimie et serologique de 24 souches de *Bacillus* du type *thuringiensis*. *Entomophaga* v.7, n.2, p.5-31, 1962.
- de BARJAC, H.; FRACHON, E. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. *Entomophaga* v.35, n.2, p.233-240, 1990.
- de BARJAC, H.; VERON, M.; COSMAO-DUMANOIR, V. Caracterization biochimique et serologique de souches de *Bacillus sphaericus* pathogens ou non pour les moustiques. **Annales de Microbiologie**. Serie B v. 131, p.191-201, 1980.
- DIAS, J.M.C.S.; HONDA, C.S.; SCHENKEL, R.G.M.; Desenvolvimento do processo de produção de *Bacillus sphaericus*, um bioinseticida contra mosquitos. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 2, 1990, Brasília, **Resumos...** Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1990a. p. 99 (EMBRAPA/CENARGEN, Documentos, 13)
- DIAS, J.M.C.S.; OLIVEIRA, K.S.; FACCIOTTI, M.C.R.; SCHMIDELL, W. Determinação da concentração inicial ótima de glicerol para produção de *Azospirillum brasilense*. **Revista de Microbiologia**. v.21, n.2, p.157-62, 1990b.
- DULMAGE, T.; YOSTEN, A.A.; SINGER, S.; LACEY, L.A. Guidelines for Production of *B. thuringiensis* H.14 and *B. sphaericus*. Geneva: UNDP/WORLD BANK/WHO 1990, 58p.
- ERTOLA R. Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides. In: AIBA, S. (Ed.). **Horizons of biochemical engineering**. Tokyo: University of Tokyo Press, 1987. p.187-199.
- FISCHHOFF, D.A.; BOWDISH, K.S.; PERLAK, F.J.; MARRONE, P.G.; McCORNIC, S.M.; NIEDERMEYER, N.G.; DEAN, D.A.; KUSANOKREZMER, K.; MAYER, E.J.; ROCHESTER, D.E.; ROGERS, S.; FRALEY, R.T. Insect tolerant transgenic tomato plants. **Bio/tecnologia**, v.5, p.807-813, 1987.
- FRIEDLENDER, B.; KEREN-ZUR, M., HOFSTEIN, R.; BAR, E.; SANDLER, N.; KEYNAN, A.; BRAUN, S. The development of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* as biocontrol agents: From research to industrial production. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v.84, n.3., p. 123-127, 1989. Suplemento.
- FUXA, J.R. Environmental risks of genetically-engineered entomopathogens. In: ROBERTS, D.W.; GRANADOS, R.R. (Eds). **Biotechnology, biological pesticides and novel plant-pest resistance for insect pest management**. Itahaca: 1988. **Proceedings...** 1988. p.159-167.
- GELERNTER, W.D. MVP bioinsecticide: a



- bioengineered bioencapsulated product for control of lepidopteran larvae. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM OF INVERTEBRATE PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL, 5., 1990, Adelaide, Australia. **Proceedings...** 1990. p.14.
- GELERNTER, W.; QUICK, T.C. The MacCap (tm) delivery system: A novel approach for enhancing efficacy and foliar persistence of biological toxins. In: ANNUAL MEETING OF SOCIETY OF INVERTEBRATE PATHOLOGY, 22., 1989, Maryland, **Abstracts...** 1989. p.24.
- GOLDBERG, L.J.; MARGALIT, J. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegyptii* and *Culex pipiens*. **Mosquito news**, v.39, p.541-544, 1977.
- HABIB, M.E.M.; ANDRADE, C.F.S. Bactérias entomopatogênicas. In: **Controle microbiano de insetos**. ALVES, S.B. (Coord.). São Paulo: Ed. Manole, 1986. p. 127-170.
- HONDA, C.S.; DIAS, J.M.C.S.; SCHENKEL, R.G.M. Métodos de preparo de água de levedura e influência da concentração inicial sobre o crescimento e toxicidade de *Bacillus sphaericus*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 17., 1989. Ribeirão Preto (SP), **Anais**. 1989. p.A-9.
- KELLEN, W.; CLARK, T.; LINDEGREN, J.; ROGOFF, M.; SINGER, S. *Bacillus sphaericus* Neide as a pathogen of mosquitoes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 7, p. 442-, 1965.
- KLEIN, D.; YANAI, P.; HOFSTEIN, R.; FRIDLENDER, B.; BRAUN, S. Production of *Bacillus sphaericus* larvicide on industrial peptones. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 580-584, 1989.
- KRIEG, V.A.; HUGER, M.; LANGENBRUSCH, G.A.; SCHNETTER, W. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* ein neuer gegenuber Larven von Coleopteren wirksamer Pathotyp. **Zeitschrift tur Angewandte Entomologies**, v. 96, p. 500-508, 1983.
- NEIDE, E. Botanische besch neibung einiger sporenbildenden bacterien. **Zentralblatt tuer Bakteriologie Parasitenkunde Infektions Krankheiten Hygiene Abstracts**, v.12, p. 1, 1904.
- RAJNCHAPEL-MESSAI, J. Les biopesticides. **Biofutur**, 23-34, juillet, 1990.
- RUSSEL, B.L.; JELLEY, S.A.; YOSTEN, A.A. Carbohydrate Metabolism in the mosquito Pathogen *Bacillus sphaericus* 2362 **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n.2, p. 294-297, 1989.
- SCHENKEL, R.G.M.; HONDA, C.S.; VILARINHOS, P.T.R.; DIAS, J.M.C.S.; Controle biológico de mosquitos na região urbana de Brasília-DF. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 11, 1989, Rio de Janeiro, **Resumos**, 1989. p. 178.
- SCHENKEL, R.G.M.; HONDA, C.S.; DIAS, J.M.C.S.; VILARINHOS, P.T.R.; Controle biológico de *Culex quinquefasciatus* na região urbana de Brasília, Brasil. In: SIMPOSIO LATINOAMERICANO SOBRE BIOLOGIA Y CONTROL DE VECTORES DE ENFERMEDADES TROPICALES, 1., 1990. Mexico (DF), **Resumes**. 1990. p. 59.
- SCHENKEL, R.G.M.; VILARINHOS, P.T.R.; HONDA, C.S. Isolamento de nova cepa de bacilo entomopatogênico na região do Distrito Federal. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA AMBIENTAL, 2., 1988, Águas de Lindóia, SP, **Anais**. 1988. p. 52.
- TIANJIAN, X.; BINGAO, H.; LIANSEN, Z.; GIXIN, W. Commercial production and application of *Bt* insecticide in China. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM OF INVERTEBRATE PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL, 5., 1990, Adelaide, Australia. **Proceedings**. 1990. p. 16.
- VAECK, M.; REYNAERTS, A.; HOEFTE, H.; JANSSENS, S.; de BEUCKELEER, M.; DEAN, C.; ZABEAUM M.; VAN MONTAGU, M.; LEEMANS, J. Transgenic plants protected from insect attack. **Nature**, v. 328, n. 6125, p. 33-37, 1987.
- VILARINHOS, P.T.R.; DIAS, J.M.C.S.; SCHENKEL, R.G.M.; HONDA, C.S. Utilização de água de levedura como substrato para o cultivo de *Bacillus sphaericus*. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS E VETORES, 1., 1988, Rio de Janeiro. **Anais**. 1988a. p.

- VILARINHOS, P.T.R.; SCHENKEL, R.G.M.; HONDA, C.S.; DIAS, J.M.C.S. Comparação da potência larvicida de uma cepa de *Bacillus sphaericus* isolada no Distrito Federal com outros inseticidas. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS E VETORES, 1., 1988. Rio de Janeiro. **Anais...** 1988b. p. 50.
- VILLELA, P.O.; HONDA, C.S.; DIAS, J.M.C.S. Estudos preliminares da utilização de glicerol como fonte de carbono para *Bacillus sphaericus*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 2., 1990, Brasília, **Resumos**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1990. p. 102. (EMBRAPA-CENARGEN DOCUMENTOS, 13).