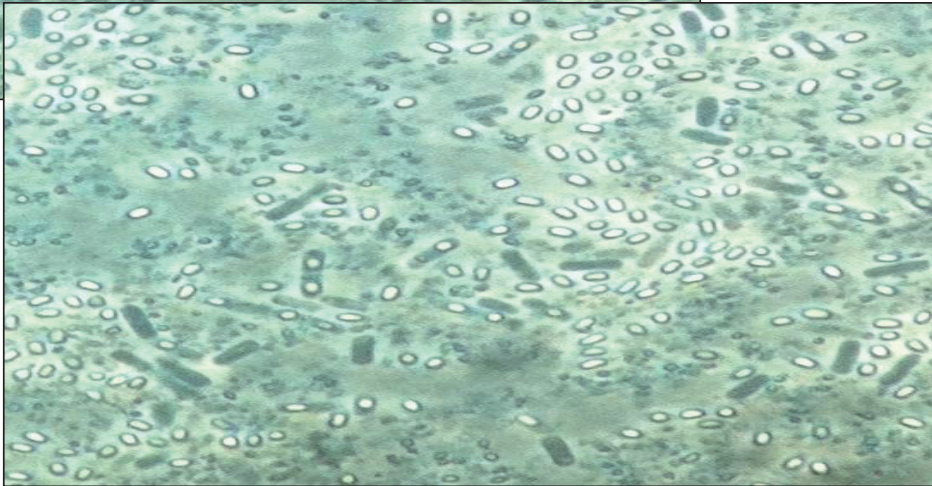
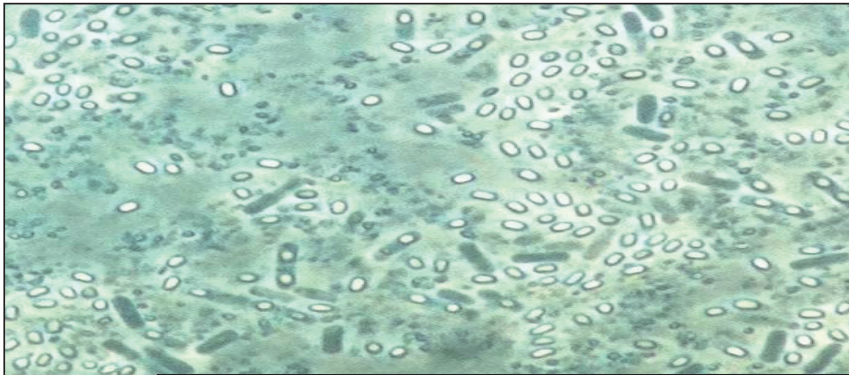


## Influência do Tempo de Cultivo sobre a Produção de $\beta$ -exotoxina por Cepas de *Bacillus thuringiensis*



ISSN 1679-0154  
Dezembro, 2013

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Milho e Sorgo  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

# **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 91**

## **Influência do Tempo de Cultivo sobre a Produção de $\beta$ -exotoxina por Cepas de *Bacillus thuringiensis***

Daniele Heloísa Pinheiro  
Fernando Hercos Valicente

Embrapa Milho e Sorgo  
Sete Lagoas, MG  
2013

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Milho e Sorgo**

Rod. MG 424 Km 45  
Caixa Postal 151  
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG  
Fone: (31) 3027-1100  
Fax: (31) 3027-1188  
Home page: [www.cnpms.embrapa.br](http://www.cnpms.embrapa.br)  
E-mail: [cnpms.sac@embrapa.br](mailto:cnpms.sac@embrapa.br)

**Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: Sidney Netto Parentoni  
Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau  
Membros: Dagma Dionísia da Silva, Paulo Eduardo de Aquino Ribeiro, Monica Matoso Campanha, Maria Marta Pastina, Rosângela Lacerda de Castro e Antonio Claudio da Silva Barros.

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros  
Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro  
Tratamento de ilustrações: Tânia Mara Assunção Barbosa  
Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa  
Foto(s) da capa: Fernando Hercos Valicente

**1ª edição**

1ª impressão (2013): on line

**Todos os direitos reservados**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Embrapa Milho e Sorgo**

---

Pinheiro, Daniele Heloísa.

Influência do tempo de cultivo sobre a produção de  $\beta$ -exotoxina por cepas de *Bacillus huringiensis* / Daniele Heloísa Pinheiro, Fernando Hercos Valicente -- Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2013.

17 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1619-0154; 91).

1. Controle biológico. 2. Bactéria. 3. Inseto. 4. Praga de planta.  
I. Valicente, Fernando Hercos. II. Título. III. Série.

CDD 632.96 (21. ed.)

---

© Embrapa 2013

# Sumário

<b>Resumo</b> .....	4
<b>Abstract</b> .....	6
<b>Introdução</b> .....	7
<b>Material e Métodos</b> .....	9
<b>Resultados e Discussão</b> .....	11
<b>Conclusão</b> .....	14
<b>Referências</b> .....	14

# Influência do Tempo de Cultivo sobre a Produção de $\beta$ -exotoxina por Cepas de *Bacillus thuringiensis*

---

*Daniele Heloísa Pinheiro*<sup>1</sup>

*Fernando Hercos Valicente*<sup>2</sup>

## Resumo

*Bacillus thuringiensis* é uma bactéria Gram-positiva, entomopatogênica amplamente utilizada no controle biológico de insetos-pragas. Entretanto, algumas cepas produzem  $\beta$ -exotoxina que é tóxica tanto para insetos como para vertebrados e muito persistente no ambiente. Por isso foi proibido o uso de cepas de *B. thuringiensis* que produzam este metabólito na formulação de biopesticidas de acordo com recomendações da Organização Mundial de Saúde. O objetivo deste trabalho foi avaliar se o tempo de cultivo influencia a produção de  $\beta$ -exotoxina por isolados de *B. thuringiensis*. Para isso, uma alíquota de 10  $\mu$ l de cada cepa foi inoculada em 10 ml de meio LB com sais e incubada a 28 °C e 200 rpm por 16h. O pré-inóculo foi vertido em 50 ml de meio LB com sais de modo que a concentração inicial da cultura fosse 10<sup>6</sup> células/ml e incubado a 28 °C e 200 rpm. Os tempos de cultivo para cada

<sup>1</sup>Estudante de Doutorado em Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG – Caixa Postal 3037, CEP 37.200-000, daniele.hp@hotmail.com

<sup>2</sup>Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG – Caixa Postal 151, CEP 35.701-970 \* Autor correspondente: valicent@cnpmis.embrapa.br

cepa foram 48, 72, 96, 120 e 144h. Após o cultivo, a cultura foi centrifugada a 10000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi autoclavado a 121 °C por 20 min e filtrado. Para os bioensaios foram aplicados 165  $\mu$ l do sobrenadante sobre um pedaço de dieta com 1 cm<sup>3</sup> e oferecido a uma lagarta de *Spodoptera frugiperda* de 2 dias de idade. Por repetição, foram utilizadas 10 lagartas, sendo que cada tratamento constituiu-se de 4 repetições. A avaliação do número de lagartas mortas e do peso foi realizada 8 dias após a montagem do bioensaio. Os tempos nos quais foi detectada a presença da  $\beta$ -exotoxina nos sobrenadantes através dos bioensaios para as cepas S-332, S-231 e S-210 foram a partir de 48, 96 e 120h de cultivo, respectivamente, demonstrando que o tempo de cultivo afeta a produção desta toxina.

**Palavras-chave:** *Bacillus thuringiensis*,  $\beta$ -exotoxina, tempo de cultivo

# Influence of cultivation time on the production of $\beta$ -exotoxin by *Bacillus thuringiensis* strains

---

*Daniele Heloísa Pinheiro*<sup>1</sup>

*Fernando Hercos Valicente*<sup>2</sup>

## Abstract

*Bacillus thuringiensis* is an entomopathogenic Gram-positive bacteria widely used in biological control of insect pests but some strains produce  $\beta$ -exotoxin which is toxic to insects such as vertebrates and very persistent in the environment. It was forbidden to use strains of *B. thuringiensis* that produce this metabolite in the formulation of biopesticides in accordance to recommendations of the World Health Organization. The purpose of this study was to evaluate whether the time of cultivation influences the production of  $\beta$ -exotoxin by isolated *B. thuringiensis*. For this, an aliquot of 10 ml of each strain was inoculated in 10 ml of LB medium with salts and incubated at 28 °C and 200 rpm for 16 hours. The pre-inoculum was poured in 50 ml of LB medium with salts so that the initial concentration of the culture was  $10^6$  cells/ml and incubated at 28 °C and 200 rpm. The culture times for each strain were 48, 72, 96, 120 and 144 hours. After this the culture was centrifuged at 10000 rpm for 10 minutes and the supernatant autoclaved at 121 °C for 20 minutes and filtered. For bioassays 165  $\mu$ l of the supernatant

was applied in piece of diet with 1 cm<sup>3</sup> and offered to 2 days old *Spodoptera frugiperda* larvae. Repeating the procedure, 10 larvae were used and each treatment consisted of 4 replicates. The assessment of the number of dead larvae and the weight was carried 8 days after the assembly of the bioassay. The cultivation times in which were detected the presence of  $\beta$ -exotoxin in the supernatants by bioassay on S-332, S-231 and S-210 strains were 48, 96 and 120 hours, respectively, showing that the cultivation time affects the production of this toxin.

**Index terms:** *Bacillus thuringiensis*,  $\beta$ -exotoxin, cultivation time

## Introdução

A bactéria *Bacillus thuringiensis* é um patógeno de insetos que produz durante a esporulação diferentes  $\beta$ -endotoxinas na forma de inclusões cristalinas, conhecidas como proteínas Cry e Cyt, capazes de matar seus hospedeiros (DE MAAGD et al., 2003) representando assim uma alternativa viável para o controle de insetos-pragas na agricultura e vetores de doenças importantes na saúde pública (CRICKMORE et al., 2013). *B. thuringiensis* vem sendo usado como um agente de controle biológico há mais de 50 anos e representa aproximadamente 90% do total de biopesticidas e cerca de 2% do mercado de inseticidas (ALI et al., 2010; BRAVO et al., 2011).

As  $\beta$ -endotoxinas compreendem duas famílias multigênicas, Cry e Cyt, sendo que atualmente mais de 400 genes *cry* e 37 genes *cyt* já foram identificados. As proteínas Cry estão classificadas em 72 grupos organizados em diferentes subgrupos, além de existirem 3 grupos de toxinas Cyt (CRICKMORE et al., 2013). A maior parte das estirpes de *B. thuringiensis* é capaz



de produzir mais de um tipo de cristal, os quais podem ser formados por diferentes proteínas Cry e/ou Cyt. Além das  $\beta$ -endotoxinas, *B. thuringiensis* pode produzir uma série de outras toxinas, incluindo proteínas com atividade inseticida, como  $\beta$ -exotoxinas, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases, fosfolipases, VIPs (proteínas inseticidas vegetativas) e  $\beta$ -exotoxinas (HANSEN; SALAMITOU, 2000).

Algumas cepas de *B. thuringiensis* produzem  $\beta$ -exotoxina I, uma toxina termoestável secretada no meio de cultura, análoga ao nucleotídeo adenina e com baixo peso molecular (701 Da), que apresenta amplo espectro de ação (DE BARJAC; DEDONDER, 1965). Ela é ativa contra dípteros, coleópteros, lepidópteros e algumas espécies de nematoides (BOND; BOYCE, 1971). A  $\beta$ -exotoxina I age inibindo a atividade da RNA polimerase através da competição com o ATP pelos sítios de ligação e consequentemente interfere na síntese de RNA (LECADET; BARJAC, 1981). Em doses subletais, esta toxina afeta a muda e a pupação dos insetos e pode resultar em adultos com desenvolvimento anormal, além de ter efeitos teratogênicos e mutagênicos (BURGERJON et al., 1969; LECADET; BARJAC, 1981).

Usando cromatografia líquida de alta performance (HPLC) foi inicialmente isolada e parcialmente caracterizada a partir da estirpe HD-12 (*B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* sorotipo 8ab) uma  $\beta$ -exotoxina denominada tipo II, um análogo do UTP cuja toxicidade é maior que a do tipo I, principalmente para coleópteros (LEVINSON et al., 1990). A síntese e secreção da  $\beta$ -exotoxina I requer a ativação de vários genes (HORSKA et al., 1975), que ainda não foram identificados e tem sido associada com a presença de plasmídeos nos quais os genes *cry* estão

contidos. Vários estudos têm relatado que a habilidade de secretar  $\beta$ -exotoxina I e de produzir cristais foram transferidos juntos em cepas de *B. thuringiensis* e *Bacillus cereus* através de conjugação (LEVINSON et al., 1990).

Por causa da sua toxicidade a células de mamíferos, as formulações comerciais de biopesticidas são preparadas a partir de cepas de *B. thuringiensis* que não produzem  $\beta$ -exotoxina de acordo com recomendações da Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999). Portanto, a detecção da síntese de  $\beta$ -exotoxina é uma importante etapa no desenvolvimento e produção de biopesticidas à base de *B. thuringiensis*. Bioensaio de toxicidade constitui o método tradicional para a detecção de  $\beta$ -exotoxina, permitindo identificar cepas produtoras de  $\beta$ -exotoxina I e II, contudo sem discriminar qual tipo de  $\beta$ -exotoxina a cepa de *B. thuringiensis* produz (MAC INNES, 2009).

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do tempo de cultivo sobre a produção de  $\beta$ -exotoxina em cepas de *B. thuringiensis*.

## Material e Métodos

### Cepas Bacterianas

Foram utilizadas 3 cepas de *B. thuringiensis* (S-210, S-231 e S-332) previamente caracterizadas como produtoras de  $\beta$ -exotoxina pertencentes à coleção de *B. thuringiensis* da Embrapa Milho e Sorgo.

## Cultivo dos Isolados Bacterianos

Inicialmente foi preparado um pré-inóculo adicionando 10  $\mu$ l das cepas de *B. thuringiensis* em 10 ml de meio LB acrescidos dos sais  $MgSO_4$ ,  $FeSO_4$ ,  $ZnSO_4$  e  $MnSO_4$ , de acordo com Valicente e Barreto (2003). Após serem cultivadas a 28 °C e 200 rpm por 16 h, foi realizada a contagem do número de células através da visualização em microscópio de contraste de fases. Uma alíquota do pré-inóculo foi acrescentada a 50 ml de meio LB com sais de modo que a concentração inicial fosse de  $1 \times 10^6$  células/ml e cultivada durante 48, 72, 96, 120 e 144h sob as mesmas condições citadas acima. Posteriormente, a cultura foi centrifugada à 10000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi aquecido a 121 °C durante 20 min, foi realizada a filtração com filtro marca TPP com poros de 0,22  $\mu$ m e armazenado a -20 °C até o uso.

## Bioensaios

Fragmentos de dieta artificial à base de feijão, gérmen de trigo e farelo de soja com aproximadamente 1 cm<sup>3</sup> foram colocados em copos plásticos e banhados com 165  $\mu$ l do sobrenadante da cultura bacteriana das cepas analisadas. Após a evaporação do excesso de umidade, 40 lagartas de *Spodoptera frugiperda* com dois dias de idade foram acondicionadas individualmente nos copos. Água destilada autoclavada foi utilizada como testemunha. A avaliação da mortalidade e a pesagem das lagartas foram feitas 8 dias após a montagem do bioensaio e as médias foram comparadas pelo teste t de Student a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ) utilizando o programa SISVAR. Fez-se a transformação dos dados de porcentagem de mortalidade através da fórmula  $\text{arc sen} \sqrt{\%}$  para realizar a análise estatística. Nos biensaios, os sobrenadantes das culturas foram

considerados tóxicos, ou seja, com a presença de  $\beta$ -exotoxina quando a mortalidade foi igual ou superior a 50% e/ou quando o desenvolvimento das lagartas foi anormal.

## Resultados e Discussão

### Influência do Tempo de Cultivo sobre a Produção de $\beta$ -exotoxina

Os dados referentes ao peso médio e à porcentagem de mortalidade das lagartas de *S. frugiperda* obtidos com os bioensaios mostraram que a produção da  $\beta$ -exotoxina foi detectada a partir de 96h de cultivo na cepa S-231 e a partir de 120h na cepa S-210, de acordo com os parâmetros estabelecidos (Tabela 1). Em cada uma das cepas a partir deste tempo, no geral, foram observados os maiores valores de mortalidade e menores pesos médios das lagartas de *S. frugiperda*. Na cepa S-332 foi verificada a produção da  $\beta$ -exotoxina em todos os tempos avaliados, como pode ser constatado na Tabela 1. Foi observado que o sobrenadante bacteriano causou a inibição do crescimento e lenta movimentação de algumas lagartas, sintomas que são típicos de envenenamento por  $\beta$ -exotoxina, como descrito em diversos estudos (BOND; BOYCE, 1971; ESPINASSE et al., 2002b).

O efeito da  $\beta$ -exotoxina foi detectado, geralmente, em fases mais tardias de crescimento. Em *B. thuringiensis*, a capacidade de produzir níveis elevados de  $\beta$ -exotoxina I durante a fase estacionária pode ter uma contribuição significativa para determinar os efeitos inseticidas das cepas bacterinas conferindo vantagens evolutivas à estirpe hospedeira (ESPINASSE et al., 2002a). Contudo, a síntese de  $\beta$ -exotoxina

pela cepa de *B. thuringiensis* impede a sua utilização na formulação do inseticida biológico.

**Tabela 1.** Médias e erros-padrão dos pesos e mortalidades das lagartas de *S. frugiperda* submetidas aos sobrenadantes bacterianos de *B. thuringiensis*.

Tratamentos	Mortalidade (%)	Peso médio das lagartas (mg)
Água	2,50±5,00 a	45,35±1,37 b
S-210 48 hs	5,00±5,77 a	37,45±12,50 b
S-210 72 hs	2,50±5,00 a	40,49±11,35 b
S-210 96 hs	17,50±9,57 a	3,60±1,86 a
S-210 120 hs	65,00±12,9 b	1,65±0,33 a
S-210 144 hs	55,00±26,45 b	2,62±1,41 a
Água	2,50±5,00 a	45,35±1,37 c
S-332 48 hs	83,75±6,23 c	1,29±0,66 a
S-332 72 hs	47,00±8,86 b	4,12±1,16 b
S-332 96 hs	58,00±5,41 b	1,14±0,36 a
S-332 120 hs	55,00±19,14 b	3,84±2,64 b
S-332 144 hs	85,00±12,90 c	1,17±0,44 a
Água	2,50±5,00 a	45,35±1,37 b
S-231 48 hs	10,00±8,16 a	61,81±19,10 c
S-231 72 hs	5,00±5,77 a	50,28±17,98 bc
S-231 96 hs	56,25±17,01 b	4,10±3,30 a
S-231 120 hs	67,50±16,58 b	1,19±0,52 a
S-231 144 hs	72,50±17,07 b	1,01±1,37 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste t de Student a 5% de probabilidade.

Não é possível afirmar que nos tempos de cultivo nos quais não foram detectados os efeitos da produção de  $\beta$ -exotoxina realmente não houve a sua síntese, uma vez que pode ter havido a produção, mas as quantidades de  $\beta$ -exotoxina foram

abaixo do limite de toxicidade detectável contra *S. frugiperda* em nossas condições de teste.

Bekheit et al. (1993), ao avaliarem o sobrenadante do meio cultivado com *B. thuringiensis* quanto à presença de  $\beta$ -exotoxina em diferentes tempos de cultivo, variando de 6 a 66 horas após a inoculação, demonstraram um aumento crescente nos níveis de  $\beta$ -exotoxina produzida. Deste modo, o fato da  $\beta$ -exotoxina ser detectada em tempos tardios de cultivo na maioria das cepas avaliadas neste trabalho se deve provavelmente ao acúmulo desta toxina no meio de cultivo até atingir um nível no qual os seus efeitos puderam ser constatados nos insetos.

Os resultados que encontramos demonstram que a detecção da síntese ou secreção da  $\beta$ -exotoxina através dos bioensaios é influenciada pelo tempo de cultivo e variável em função da cepa bacteriana. Provavelmente esta diferença entre os tempos de cultivo no qual é constatada a presença deste metabólito através dos bioensaios esteja relacionada com o início do processo de esporuração que também pode ser variável entre os isolados. Assim é aconselhável prolongar o tempo de cultivo dos isolados bacterianos para realizar a detecção da  $\beta$ -exotoxina, visto que os sobrenadantes bacterianos coletados em fases mais tardias de cultivo causaram maior taxa de mortalidade e levaram a um menor peso médio das lagartas de *S. frugiperda*, indicando que provavelmente nestes tempos a produção ou a secreção de  $\beta$ -exotoxina foram maiores. Além disso, como estas cepas produzem  $\beta$ -exotoxina, não são aconselhadas para serem utilizadas na formulação de biopesticidas.

## Conclusão

A produção de  $\beta$ -exotoxina por cepas de *Bacillus thuringiensis* é influenciada pelo tempo de cultivo, e o tempo no qual é detectada a presença da  $\beta$ -exotoxina nos sobrenadantes através dos bioensaios é variável entre as cepas.

## Referências

ALI, S.; ZAFAR, Y.; ALI, G. M.; NAZIR, F. *Bacillus thuringiensis* and its application in agriculture. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 14, p. 2022-2031, Apr. 2010.

BEKHEIT, H. K. M.; LUCAS, A. D.; GEE, S. J.; HARRISON, R. O.; HAMMOCK, B. D. Development of an enzyme linked immunosorbent assay for the beta-exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 41, n. 9, p. 1530-1536, Sep. 1993.

BOND, R. P.; BOYCE, C. B. C. The thermostable exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. In: BURGESS, H. D. (Ed.). **Microbial control of insects and mites**. London: Academic Press, 1971. p. 275-301.

BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 41, n. 7, p. 423-431, Jul. 2011.

BURGERJON, A.; BIACHE, G.; CALS, P. H. Teratology of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, as provoked by larval administration of the thermostable toxin of *Bacillus*

*thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 14, p. 274-278, 1969.

CRICKMORE, N.; BAUM, J.; BRAVO, A.; LERECLUS, D.; NARVA, K.; SAMPSON, K.; SCHNEPF, E.; SUN, M.; ZEIGLER, D. R. ***Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature**. Disponível em: <[http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/index.html](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/index.html)>. Acesso em: 02 nov. 2013.

DE BARJAC, H.; DEDONDER, R. Isolement d'un nucléotide identifiable

à la "toxine thermostable" de *Bacillus thuringiensis* var *Berliner*. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l' Academie des Sciences**, Paris, v. 260, p. 7050-7053, 1965.

DE MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; BERRY, C.; CRICKMORE, N.; SCHNEPF, H. E. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 37, p. 409-433, 2003.

ESPINASSE, S.; GOHAR, M.; CHAUF AUX, J.; BUISSON, C.; PERCHAT, S.; SANCHIS, V. Correspondence of high levels of beta-exotoxin I and the presence of cry1B in *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 9, p. 4182-4186, Sept. 2002a.

ESPINASSE, S.; GOHAR, M.; LERECLUS, D.; SANCHIS, V. An ABC transporter from *Bacillus thuringiensis* is essential for beta-exotoxin I production. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 184, n. 21, p. 5848-5854, Nov. 2002b.



GOHAR, M.; PERCHAT, S. Sample preparation for beta-exotoxin determination in *Bacillus thuringiensis* cultures by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 298, n. 1, p. 112-117, Nov. 2001.

HANSEN, B. M.; SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis*. In: CHARLES, J. F.; DELECLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 41-64.

HORSKA, K. J.; VANKOVÁ, J.; SEBESTA, K. Determination of exotoxin in *Bacillus thuringiensis* cells. **Zeitschrift fuer Naturforschung**, Berlin, v. 30, p. 120-123, 1975.

LECADET, M. M.; DE BARJAC, H. *Bacillus thuringiensis* beta exotoxin. In: DAVIDSON, E. W. (Ed.). **Pathogenesis of invertebrate microbiol diseases**. Totowa: Allanheld, 1981. p. 293-316.

LEVINSON, B. L.; KASYAN, K. J.; CHIU, S. S.; CURRIER, T. C.; GONZÁLEZ JR., J. M. Identification of beta-exotoxin production, plasmids encoding beta-exotoxin and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high performance liquid chromatography. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 172, n. 6, p. 3172-3179, Jun. 1990.

MAC INNES, T. C.; BOUWER, G. An improved bioassay for the detection of *Bacillus thuringiensis* beta-exotoxin. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 101, n. 2, p. 137-139, Jun 2009.

VALICENTE, F. H.; BARRETO, M. R. *Bacillus thuringiensis* survey in Brazil: geographical distribution and insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 32, n. 4, p. 639-644, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guideline specifications for bacterial larvicides for public health use**. Geneva, 1999.



Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento

