



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO
CENTRO DE ESTUDOS
SUPERIORES DE CAXIAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIODIVERSIDADE,
AMBIENTE E SAÚDE

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO – UEMA
CENTRO DE ESTUDOS SUPERIORES DE CAXIAS - CESC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE, AMBIENTE E
SAÚDE - PPGBAS**

SÁRVIA RAFAELLY NUNES SANTOS

***Bacillus thuringiensis*: uma análise da produção científica, e estudo sobre
fatores abióticos de solos do Cerrado na sua abundância e
susceptibilidade para larvas de *Aedes aegypti***

Caxias - MA
2021

SÁRVIA RAFAELLY NUNES SANTOS

Bacillus thuringiensis*: uma análise da produção científica, e um estudo sobre fatores abióticos de solos na sua abundância e susceptibilidade para larvas de *Aedes aegypti

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ambiente e Saúde – PPGBAS/CESC/UEMA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade, Ambiente e Saúde.

Orientadora: profa. Dra. Valéria Cristina Soares Pinheiro

Coorientador: prof. Dr. Henrique Antunes Souza

Caxias - MA

2021

S237b Santos, Sárvia Rafaelly Nunes

Bacillus thuringiensis: uma análise da produção científica, e estudo sobre fatores abióticos de solos do cerrado na sua abundância e susceptibilidade para larvas de Aedes aegypti / Sárvia Rafaelly Nunes Santos. __Caxias: CESC/UEMA, 2021.

48f.

Orientador: Prof^a. Dra. Valéria Cristina Soares Pinheiro.

Dissertação (Mestrado) – Centro de Estudos Superiores de Caxias, Curso de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ambiente e Saúde.

SÁRVIA RAFAELLY NUNES SANTOS

Bacillus thuringiensis*: uma análise da produção científica, e um estudo sobre fatores abióticos de solos na sua abundância e susceptibilidade para larvas de *Aedes aegypti

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ambiente e Saúde – PPGBAS/CESC/UEMA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade, Ambiente e Saúde.

Orientadora: profa. Dra. Valéria Cristina Soares Pinheiro

Coorientador: prof. Dr. Henrique Antunes Souza

Aprovada em 27/07/2021

**Prof. Dra. Valéria Cristina Soares Pinheiro -
(orientadora) Universidade Estadual do Maranhão –
UEMA**

**Prof. Dra. Onilda Santos Silva
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)**

**Prof. Dra. Melissa Oda-Souza
Universidade Estadual do Piauí
(UESPI)**

Sumário

INTRODUÇÃO GERAL	8
<i>Bacillus thuringiensis</i>: uma bactéria que ainda apresenta grande interesse mundial	11
RESUMO	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. RESULTADOS E DISCUSSÕES	14
3. METODOLOGIA	17
4. CONCLUSÃO	19
5. REFERÊNCIAS	19
Influência dos fatores abióticos na obtenção de <i>Bacillus thuringiensis</i> do solo no bioma do Cerrado do Maranhão, Brasil	23
RESUMO	23
1. INTRODUÇÃO	25
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
2.1 Abundância de <i>Bacillus thuringiensis</i> em solos do cerrado maranhense.	27
2.2 Caracterização do solo por meio da análise da fertilidade	28
2.3 Análise de componente principal (acp)	29
2.4 Bioensaio seletivo para <i>Aedes aegypti</i>.....	34
3. METODOLOGIA	35
3.1 Área de estudo	35
3.2 Otimização da metodologia de coleta para <i>Bacillus thuringiensis</i>	35
4. Isolamento de <i>Bacillus thuringiensis</i>	37
5. Bioensaio de susceptibilidade para <i>Aedes aegypti</i>	39
6. Análise de atributos químicos do solo e textura	39
7. Análise estatística	39
8. CONCLUSÃO	40
9. REFERÊNCIAS	42

A Jesus Cristo meu único Senhor e a Santíssima Virgem Maria dedico todo o mérito.

Aos meus pais por todo amor, apoio e cuidado nesta trajetória.

Aos meus amigos, grandes tesouros do coração de Deus.

Aos meus orientadores pela paciência, conselhos e pelo apoio.

*Meu Jesus: o que é meu é teu, porque o que é teu é meu, e o que é meu, eu o abandono em
ti.*

(FORJA 594, SÃO JOSÉ MARIA ESCRIVÁ)

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar comigo e ser o Senhor da minha vida. À minha família pela base e apoio. Aos meus amigos da fé pela companhia, torcida e contribuições. Ao curso de Pós-graduação em Biodiversidade, Ambiente e Saúde da Universidade Estadual do Maranhão, campus Caxias pela disponibilidade da linha de pesquisa e as contribuições acadêmicas. À 6ª turma do mestrado pelo acolhimento e torcida. À equipe do Laboratório de Entomologia Médica da Universidade Estadual do Maranhão, campus Caxias na pessoa da Dra. Valéria Cristina Soares Pinheiro e a Prof. Dr. Joelma Soares da Silva pelo apoio estrutural e científico. À equipe do Laboratório de Solo e Planta da Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias (EMBRAPA-Meio Norte) na pessoa do Prof. Dr. Henrique Antunes de Souza pelo apoio estrutural e científico. À Prof. Dra. Melissa Oda-Souza pelo apoio científico e à Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA), pelo financiamento.

INTRODUÇÃO GERAL

Bacillus thuringiensis (Berliner 1911) é uma bactéria Gram-positiva da Família Bacillaceae e distingue-se pelo seu potencial entomopatogênico. Desta forma, tem sido encontrada na maioria dos biopesticidas fabricados comercialmente. Atualmente, essa bactéria representa o princípio ativo mais utilizado comercialmente para o controle biológico de insetos de importância médica como *Aedes aegypti*, que é a principal espécie de mosquito transmissora dos vírus da Dengue, Zika e Chikungunya, os quais causam doenças consideradas como um sério problema na saúde pública no Brasil e no mundo (Brasil/SVS/MS, 2019; Zogo et al., 2019; Rabinovitch, 2017).

Bacillus thuringiensis é considerado um organismo ubíquo podendo ser isolado de solo (Rampersad & Ammons, 2005), da superfície foliar de espécies vegetais (Smith & Couche, 1991), de insetos vivos ou mortos e seus habitats (Asokan & Puttaswamy, 2007), a partir de amostras de água (Iriarte et al., 2000) e sedimentos marinhos (Maeda et al., 2001).

No entanto, o solo tem sido apontado como um dos ambientes nos quais há maior quantidade de esporos desta bactéria (Ibarra et al., 2003; Costa et al., 2010; Dagga et al., 2016). Apesar de sua ampla distribuição no solo, os fatores que possibilitam a permanência de seus esporos e quais fatores abióticos do solo que pode exercer influência sobre esta bactéria, ainda são poucos conhecidos.

Assim, este trabalho está dividido em dois capítulos, no qual o um dos objetivos foi fazer uma revisão sobre o estado de arte dos últimos 20 anos sobre o uso de *B. thuringiensis* em insetos (capítulo 1), e descrever sobre a influência de fatores abióticos na distribuição desta bactéria em solos do Cerrado maranhense, e sua patogenicidade em *Ae. aegypti* (capítulo 2).

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Recorte temporal das publicações sobre <i>Bacillus thuringiensis</i>	15
Figura 2 - Distribuição continental dos trabalhos publicados.....	16
Figura 3- Características metodológicas das publicações	17

CAPÍTULO 2

Figura 1 – Biplot entre iBt, atributos químicos.....	30
Figura 2 – Dendrograma de dissimilaridade.....	31
Figura 3 – Correlação de Pearson	34
Figura 4. Média de larvas mortas por localidade.....	35
Figura 5: Áreas de coleta do solo.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados do isolamento de <i>Bacillus thuringiensis</i> no Cerrado maranhense.....	26
Tabela 2. Concentrações médias das características química	27
Tabela 3 – Estimativa das variâncias (autovalores) e porcentagem acumulada da variância total (%),.....	28
Tabela 4 – Correlação, qualidade de representação (Cos2) e contribuição (%) entre variáveis.....	28
Tabela 5. Valores entre iBt, atributos químicos e físicos do solo no Cerrado maranhense.....	32

***Bacillus thuringiensis*: uma bactéria que ainda apresenta grande interesse mundial**
Sárvia Rafaelly Nunes Santos

RESUMO

Na literatura nos últimos 20 anos de artigos foram publicados estudos relacionados a controle de insetos utilizando diversas espécies de bactérias. E por isso, tem-se a tendência a pensar que poucos pesquisadores ainda dedicam seus estudos à *Bacillus thuringiensis*. Contudo, no presente estudo foi feita uma análise sobre a produção científica nos últimos 20 anos, relacionando *Bacillus thuringiensis* a controle de insetos. O panorama da literatura demonstrou, que pesquisas envolvendo esta bactéria se manteve como uma linha de pesquisa de interesse para comunidade científica. Nas duas décadas de pesquisas os trabalhos tiveram nuances diferentes, na primeira por exemplo, se aprofundaram mais em encontrar novas cepas. Já os artigos da segunda década, buscaram realizar aplicações, como por exemplo, a eficácia de bioinseticida a base de *Bacillus thuringiensis* em relação a extratos de plantas (Kovendan, et. al. 2012). Observou-se que muitos estudos são conduzidos em diferentes países e que muitos deles apresentam alta taxa de publicações. Quanto a finalidade das publicações, em 20 anos a maioria das pesquisas se direcionam a explorar e conhecer sobre as propriedades de Bt, sem resultar em uma aplicação direta para resolução de um problema.

Palavras-chave: Bactéria, literatura, pesquisa.

ABSTRACT

In the literature in the last 20 years of articles have been published studies related to insect control using different species of bacteria. Therefore, there is a tendency to think that few researchers still dedicate their studies to *Bacillus thuringiensis*. However, in the present study an analysis of scientific production in the last 20 years was carried out, relating *Bacillus thuringiensis* to insect control. The overview of the literature showed that research involving this bacterium remained as a line of research of interest to the scientific community. In the two decades of research, the works had different nuances, in the first one, for example, they went deeper into finding new strains. The articles from the second decade, on the other hand, sought to carry out applications, such as the effectiveness of bioinsecticide based on *Bacillus thuringiensis* in relation to plant extracts (Kovendan, et. al. 2012). It was observed that many studies are conducted in different countries and that many of them have a high rate of publications. As for the purpose of the publications, in 20 years most researches are aimed at exploring and knowing about the properties of Bt, without resulting in a direct application to solve a problem.

Keywords: Bacteria, literature, research.

1. INTRODUÇÃO

A produção de insumos derivados do complexo *Bacillus thurigiensis* para controle de insetos movimentam um mercado de milhões de dólares (Jouzani; Valijanian; Sharafi, 2017). O que faz desse microorganismo alvo de grande interesse mundial é o amplo espectro da utilização de suas proteínas patogênicas para controle de nematoides, ácaros e carrapatos. Além disso, possui efeitos antagônicos contra bactérias e fungos patogênicos, atividades de

promoção de crescimento de plantas, biorremediação, biossíntese de nanopartículas e produção de biopolímeros (Jouzani; Valijanian; Sharafi, 2017).

Essas diversas funcionalidades são derivadas de suas subespécies e sorotipos, como *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* que é alvo específico de dípteros e *Bacillus thuringiensis* *kurstaki* que é alvo específicos de coleópteros e lepidópteros (Nair et. al., 2018). No âmbito do controle biológico, *Bacillus thuringiensis* é largamente utilizada como ferramenta de controle (Nair et. al., 2018). Neste sentido, desde sua caracterização em 1915 por Berliner, inúmeros estudos foram realizados a fim de conhecer suas características morfológicas, bioquímicas e genômicas, e como estes fatores relacionam-se entre si e influenciam na patogenicidade contra insetos (Nickmore, et. al., 2020).

Com o surgimento de técnicas moleculares, os genes de expressão das proteínas inseticidas, as formas de arranjo proteico proporcionaram um avanço no conhecimento sobre *B. thuringiensis*. Porém, áreas como, o nicho ecológico desta bactéria no ambiente e a sua relação filogenética com *B. cereus* ainda permanecem sem elucidações (Raymond, 2017).

Na literatura científica dos últimos 20 anos, observa-se que alguns estudos relacionados a controle de insetos têm-se utilizado diversas espécies de bactérias (Kandhasamy, et. al., 2020; Shokal, et. al., 2016; Sonawane, et. al., 2018). Como estes estudos são publicados em várias regiões do globo, tem-se a tendência a pensar que poucos pesquisadores ainda dedicam seus estudos à *B. thuringiensis*. Contudo, no presente estudo foi feita uma análise sobre a produção científica nos últimos 20 anos, relacionando-se *B. thuringiensis* a controle de insetos. Observou-se que muitos estudos ainda são conduzidos em diferentes países e que muitos deles apresentam alta taxa de publicações.

2. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram identificados 1.528 trabalhos na pesquisa geral das quatro bases de dados sobre *B. thuringiensis* no controle biológico de insetos. Na ferramenta de busca avançada 1.419 trabalhos que eram capítulos de livro, *short communications*, relatórios dissertações ou tese foram excluídos. Resultando em uma amostra de 109 trabalhos para quantificação e análise.

O panorama da literatura demonstra, que ao longo do tempo, pesquisas com *B. thuringiensis* associadas a insetos tem se mantido como uma linha de pesquisa de interesse para comunidade científica (Figura 1). Tendo em vista que esta bactéria é generalista e está em todo o globo, o advento das tecnologias genéticas, pode abrir uma nova forma de compreender os processos que ocorrem nesta bactéria (El-kersh *et. al*, 2016).

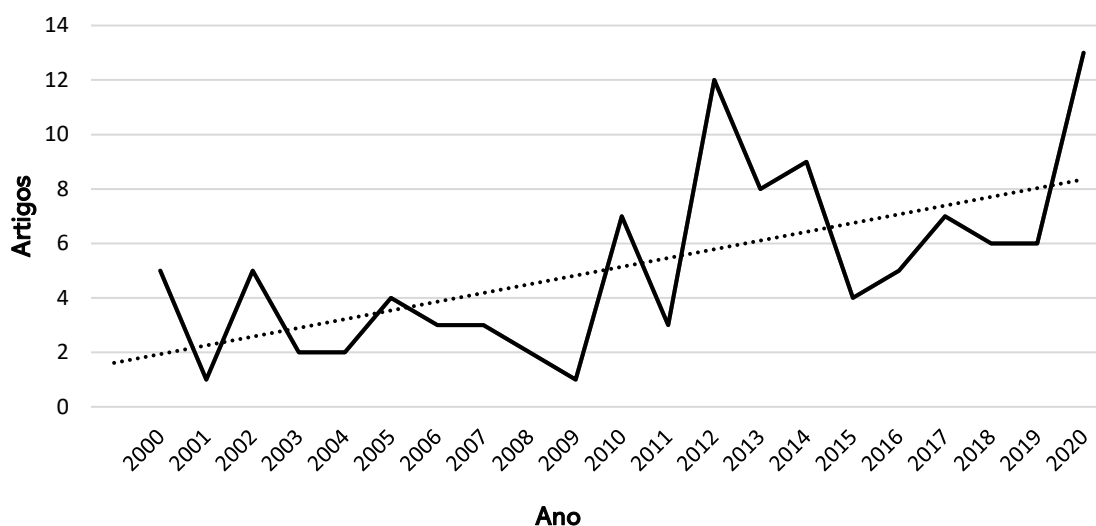


Figura 1. Recorte temporal dos 109 artigos selecionados sobre *Bacillus thuringiensis*

Os artigos das primeiras décadas apresentaram como objetivo encontrar novas cepas (Iriarte, *et. al.*, 2000), caracterizar os genes envolvidos no controle biológico (Letowski, *et.*

al., 2005), alguns primeiros estudos sobre a variabilidade gênica e proteica de *B. thuringiensis* (Zheng, et. al., 2010) (Tabela 1). Já os artigos da segunda década objetivam-se testar a eficácia de bioinseticida a base de *B. thuringiensis* em relação a extratos de plantas (Kovendan, et. al. 2012), buscar por cepas nativas (Soares-da-Silva, 2015; Rabha, et. al., 2017), compreender a percepção humana sobre as combinações de biolarvicidas a base de *B. thuringiensis* e fertilizantes (Mazigo, et. al., 2019), o sinergismo proteico com outras bactérias (Konecka, et. al., 2020),

Ano	Título	Autor
2000	Characterization of INTA 51-3, a New A typical Strain of <i>Bacillus thuringiensis</i> from Argentina	Iriarte, et. al.
2002	Distribution and characterization of <i>Bacillus thuringiensis</i> in the phylloplane of Piper species (Piperaceae) at three altitudinal levels	Manduell, et. al.
2005	Assessment of cry1 Gene Contents of <i>Bacillus thuringiensis</i> Strains by Use of DNA Microarrays	Letowski, et. al.
2010	Characterisation and expression of a novel haplotype cry2A-type gene from <i>Bacillus thuringiensis</i> strain JF19-2	Zheng, et. al.
2012	Mosquitocidal properties of <i>Calotropis gigantea</i> (Family: Asclepiadaceae) leaf extract and bacterial insecticide, <i>Bacillus thuringiensis</i> , against the mosquito vectors	Kovendan, et. al.
2015	Isolation of <i>Bacillus thuringiensis</i> from the state of Amazonas, in Brazil, and screening against <i>Aedes aegypti</i> (Diptera, Culicidae)	Soares-da-Silva, et. al.
2017	Isolation and characterization of <i>Bacillus thuringiensis</i> strains native to Assam soil of North East India	Rabha, et. al.
2019	Rice farmers' perceptions and acceptability in the use of a combination of biolarvicide (<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israeliensis</i>) and fertilizers application for malaria control and increase rice productivity in a rural district of central Tanzania	Mazigo, et. al.
2020	Synergistic interaction between carvacrol and <i>Bacillus thuringiensis</i> crystalline proteins against <i>Cydia pomonella</i> and <i>Spodoptera exigua</i>	Konecka, et. al.

Tabela 1. Recorte amostral dos artigos selecionados para análise. Fonte: Própria.

Quanto à origem geográfica das publicações, os continentes asiático e americano foram os que apresentaram maior número de publicação (Figura 2). A China correspondeu a maior parte das publicações do continente asiático. País que possui muitos desafios em termos de controle, a China, em 2000 chegou a perder mais de 15 milhões de quilos de safra de alimentos. O que fez governo chinês investir em programas de controle, logo também

pode ter favorecido também aumento nas pesquisas relacionadas a este tema (Huang; Zhang; Song; Lang, 2007).

O Brasil foi o país que mais apresentou publicação relacionada a controle biológico com *B. thuringiensis* (Figura 2). Desde 1990, esse país possui programas de controle de pragas com microorganismos entomopatogênicos (Fontes; Inglis-Valadares, 2020). Além disso desde 2001, *B. thuringiensis*, foi incorporada nos programas de combate à dengue (Braga et al. 2004).

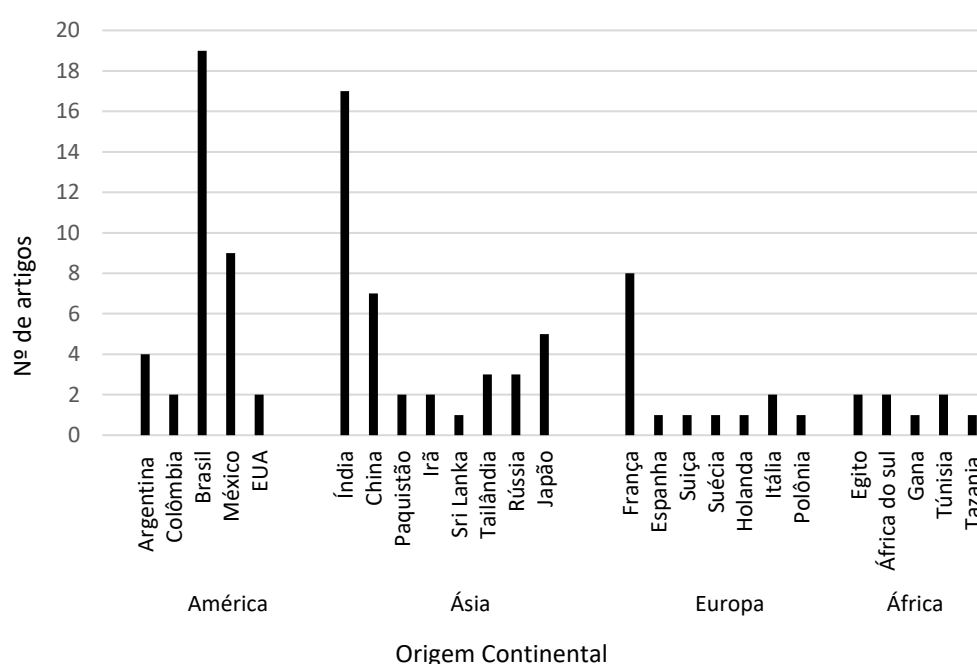


Figura 2. Países em que os trabalhos publicados estavam relacionados a *Bacillus thuringiensis* no controle de insetos

Quanto a finalidade das publicações, em 20 anos a maioria das pesquisas se direcionam a explorar e conhecer sobre as propriedades de *B. thuringiensis*, sem resultar em uma aplicação direta para resolução de um problema (Figura 3). O interesse por conhecer, surgiu com o primeiro isolamento de *B. thuringiensis*, em 1901, e se propagou em todo o globo a busca por estirpes com novas toxinas. O que pode justificar a proporção encontrada para a pesquisa básica (Fontes; Valares-Inglis, 2020).

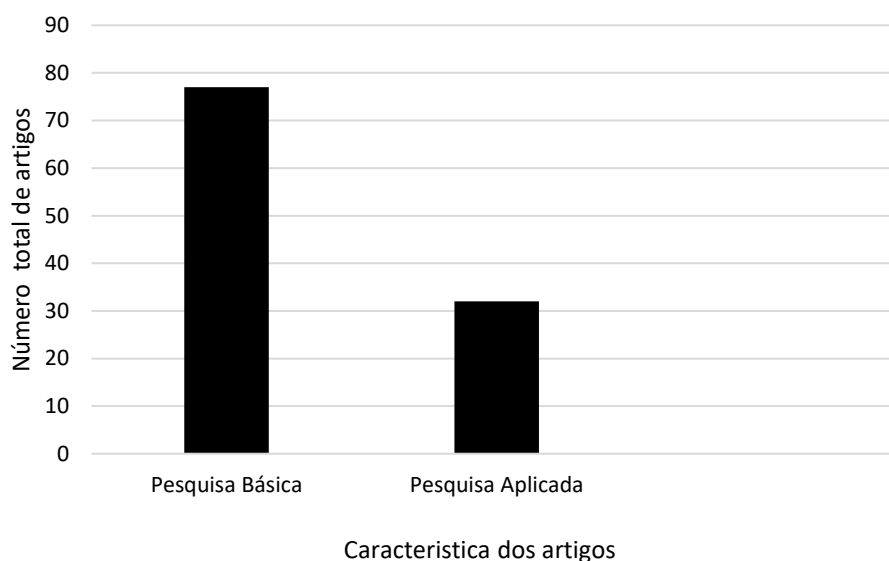


Figura 3. Características metodológicas das publicações

Observou-se que a tendência mundial das pesquisas sobre *B. thuringiensis*, está em aplicar o conhecimento já produzido, seja com formação de bioprodutos contra pragas agrícolas e/ou insetos vetores (Thammasittirong; Prigyai; Thammasittirong, et. al., 2017), na aplicação em biorremediação (Suresh et. al., 2021), na interação com partículas de prata para biocontrole (Banu; Balasubramanian; Moorthi, 2013), no combate a fungos (Jouzani; Valijanian; Sharafi, 2017), ou no combate ao câncer (Jouzani; Valijanian; Sharafi, 2017).

3. METODOLOGIA

Considerou-se no levantamento a produção sobre *B. thuringiensis* associados a mosquitos em 20 anos. A pesquisa foi realizada durante os meses de janeiro de 2020 a junho de 2020. Foram considerados artigos de pesquisa em português e inglês que tenham sido publicados entre o ano de 2000 a junho de 2020. As bases de dados utilizadas para pesquisa

foram *Google Scholar*, *Science direct*, *Scopus* e *Springer Link*. Os descritores empregados foram: *Bacillus thuringiensis*; mosquitos; Diptera; Lepidoptera; isolados; *Aedes aegypti*; dengue; *control* ; *isolates*, os quais foram combinados entre si juntamente com os termos booleanos (*and*, *or*, *not*). Utilizou-se a ferramenta de busca avançada para selecionar somente artigos científicos completos. Fez-se, como isso, o recorte temporal dos artigos publicados nos últimos 20 anos.

A seleção dos artigos aconteceu em quatro etapas para cada base de dados (Figura 4). Posteriormente, os artigos selecionados foram organizados em planilha para cada base de dados, com o ano de publicação, país de origem, o método central da pesquisa, o título e os autores.

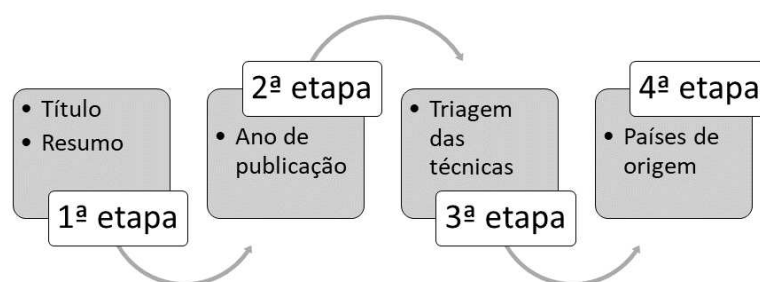


Figura 4. Fluxograma das etapas das análises dos dados

Dois pesquisadores, de forma independente, organizaram os artigos em categorias metodológicas capazes de serem analisadas de forma quantitativa. Para extrair os dados de ano de publicação foram considerados os dados da revista no qual o artigo foi publicado. A triagem das técnicas dos artigos que tinham como produto uma descrição ou o conhecimento de alguma característica de *B. thuringiensis* foram classificados como pesquisas básicas enquanto os artigos que tinham nos resultados o surgimento de um produto de aplicação

concreta foram classificados de pesquisa aplicada. Estes dados foram extraídos verificando os resultados. Na quarta etapa, foram coletados os países de origem dos artigos, no qual consistiu verificando os países dos primeiros autores.

4. CONCLUSÃO

A bactéria *B. thuringiensis* continua sendo um organismo de interesse pela comunidade científica. Nos artigos selecionados, correspondente a 20 anos de pesquisa, observou-se que as características gerais, bioquímicas e toxicológicas de *B. thuringiensis* foram os assuntos mais predominantes. No entanto, pesquisas mais recentes tem se preocupado em aplicar os conhecimentos já produzidos. Além disso, a maior parte das publicações tem-se se concentrado na América latina e na Ásia

5. REFERÊNCIAS

- Banu, A. N.; Balasubramanian, C. Moorthi, V. (2014). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Bacillus thuringiensis* against dengue vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Parasitology research.
- Banu, N. A.; Balasubramanian, C. Moorthi, V. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Bacillus thuringiensis* against dengue vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)
- Biochemistry, Pathotype, Cellular, and Molecular Aspects. In: *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus* Characterization and use in the field of biocontrol. Fiuza, LM, Polanczyk, RA., Crickmore, N. Springer. Chapter 1.
- Braga, I.A., Lima, J.B.D., Soares, S.S., Valle, D., 2004. *Aedes aegypti* resistance to
- Chaitra H.S; Vinay K. (2020). Influence of midgut bacteria on toxicity of *Bacillus thuringiensis* to pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera: Gelechiidae). Journal Entomologia Zoology Studies.
- Chatterjee, S.; Chakaborty, A.; Sinha, K. S. (2015) Spatial distribution & physicochemical characterization of the breeding habitats of *Aedes aegypti* in & around Kolkata, West Bengal, India. Indian Journal of Medical Redearch. p.79-86.
- Crickmore, N.; Berry, C.; Panneerselvam, S.; Mishra, R.; Connor, T.; Bonning, B (2020). A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and Other bactéria-derived pesticidal proteins. Journal of Invertebrate Pathology. July.
- Do Multi-year Applications of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* for Control of Mosquito Larvae Affect the Abundance of *B. cereus* Group Populations in Riparian Wetland Soils?. Microbial Ecology.

El-kersh, A. T.; Ahmed, A. M.; Al-sheikh, Y.; Tripet, F.; Ibrahim, S.M.; Metwalli, M.A.A. (2016) Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* strains from Saudi Arabia with enhanced larvicidal toxicity against the mosquito vector *Anopheles gambiae* (s.l) Parasites & Vectors.

El-kersh, T.; Ahmed, D.A.; Al-sheikh, Y. A; Tripet, F.; Ibrahim, M.; Metwalli, A.A. (2016) Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* strains from Saudi Arabia with enhanced larvicidal toxicity against the mosquito vector *Anopheles gambiae* (s.l.). Parasites & Vectors. n. 647.

Fontes, G. F. E.; Valadares-Inglis, M. C. (2020). Controle biológico de pragas na agricultura. Brasília. Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias.

Huang, D-F.; Zhang, J.; Song, F-P.; Lang, Z-H. (2007). Microbial control and biotechnology research on *Bacillus thuringiensis* in China. Journal of Invertebrate Pathology. v.95. p.175-180.

Iriate, J.; Porcar, M.; Lecadet, M.; Caballero, P. Isolation and Characterization of *Bacillus thuringiensis* Strains from Aquatic Environments in Spain. Current Microbiology. v. 402-408.

Kandhasamy, L.; Kalaimurgan, D.; Nithya, K.; Venkatesan, S.; Shivakumar, (2020) M. Antibacterial, Antifungal and Mosquitocidal Efficacy of Copper Nanoparticles Synthesized from Entomopathogenic Nematode: Insect–Host Relationship of Bacteria in Secondary Metabolites of *Morganella morganii* sp. (PMA1)

Konecka, E.; Kaznowski, A.; Grzesiek, W.; Nowicki, P.; Czarniewska, E.; Baranek, J. Synergistic interaction between carvacrol and *Bacillus thuringiensis* crystalline proteins against *Cydia pomonella* and *Spodoptera exigua*. Biocontrol. abr. v.65 p. 447-460.

Konecka, E.; Kaznowski, A.; Grzesiek, W.; Nowicki, P.; Czarniewska, E.; Baranek, J.(2020). Synergistic interaction between carvacrol and *Bacillus thuringiensis* crystalline proteins against *Cydia pomonella* and *Spodoptera exigua*.

Kovendan, K. et. al. (2012) Mosquitocidal properties of *Calotropis gigantea* (Family: Asclepiadaceae) leaf extract and bacterial insecticide, *Bacillus thuringiensis*, against the mosquito vectors. Parasitology Research. p. 531-544.

Kovendan, K.; Murugan, K.; Kumar, K. P.; Panneerselvam, C.; Kumar, M. P.; Amerasan, D.; Subramaniam, J.; Vincent, S. (2012) Mosquitocidal properties of *Calotropis gigantea* (Family: Asclepiadaceae) leaf extract and bacterial insecticide, *Bacillus thuringiensis*, against the mosquito vectors. Parasita research. aug. n.11., v.2., p. 531-44.

Lalitha, K.; Kalaimurgan, D.; Nithya, K.; Venkatesan, S.; Shivakumar, M (2020). Antibacterial, Antifungal and Mosquitocidal Efficacy of Copper Nanoparticles Synthesized from Entomopathogenic Nematode: Insect–Host Relationship of Bacteria in Secondary Metabolites of *Morganella morganii* sp. (PMA1). Arabian Journal for Science and Engineering. v.45.p.4489-4501.

Letowski, J.; Bravo, A.; Brousseau, R. Masson, L. (2005) Assessment of cry1 Gene Contents of *Bacillus thuringiensis* Strains by Use of DNA Microarrays. Appl. Environ. Microbiolo. Letwski, J.; Bravo, A.; Brousseau, R.; Masson, L. Assessment of cry1 Gene Contents of *Bacillus thuringiensis* Strains by Use of DNA Microarrays

Mazigo, H.; Massawe, I.; Rumisha, S.; Kweka, E.; Mboera, L. (2019) Rice farmers' perceptions and acceptability in the use of a combination of biolarvicide (*Bacillus thuringiensis* var. *israeliensis*) and fertilizers application for malaria control and increase rice productivity in a rural district of central Tanzania. *Malaria Journal*. mar. n.12.

Melo, A. L. A. et. al. (2011) Utilização da cama de frango em meio de cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Berliner para o controle de *Aedes aegypti* Linnaeus. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*.

Nair, K.; Al-Thani, R.; Al-Thani, D.; Al-Yalei, F. Anmed, T.; Jaoua, S. (2018) Diversity of *Bacillus thuringiensis* Strains From Qatar as Shown by Crystal Morphology, δ -endotoxins and Cry Gene Content. *Frontiers in Microbiology*. Apr. v.9.

Rabha, M.; Sharma, S.; Acharjee, S.; Sarmah, B. (2017) Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains native to Assam soil of North East India. *3 biotech*. oct. n.7. v. 5.

Rabinovitch, L., Vivoni, AM., Machado, V., Knaak, N., Berlitz, DL., Polanczyk, RA., Fiuza, LM. (2017) *Bacillus thuringiensis* Characterization: Morphology, Physiology, Schneider, S.; Tarjrin, T.; Lundström, J.; Hendriksen, N.; Melin, P.; Sundh, I.; (2017) Sergipe and Alagoas, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99, 199-203.

Shokal, U.; Yadav, S.; Atri, J.; Accetta, J.; Kenney, E.; Banks, K.; Katakam, A.; Jaenike, J.; Eleftherianos, L. (2016) Effects of co-occurring *Wolbachia* and *Spiroplasma endosymbionts* on the *Drosophila* immune response against insect pathogenic and non-pathogenic bacteria. *BMC Microbiology*. n. 16.

Sonawane, M.; Chaudhary, R.; Shoude, S.; Sayyed, R (2016). Insect Gut Bacteria: A Novel Source for Siderophore Production. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*. v. 88, p.567-572.

Sonawane, M.D.; Chaudhary, R.D.; Shouche, Y.S.; Sayyed, R.Z.; (2018) Insect Gut Bacteria: A Novel Source for Siderophore Production. p. 567-572.

Suresh, G. et. al. (2021). Bioremediation of hexavalent chromium-contaminated wastewater by *Bacillus thuringiensis* and *Staphylococcus capitis* isolated from tannery sediment. *Biomass Conversion and Biorefinery*.
temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro,

Thammasittirong, A.; Prigyai, K.; Thammasittirong, S. N. Mosquitocidal potential of silver nanoparticles synthesized using local isolates of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and their synergistic effect with a commercial strain of *B. thuringiensis* subsp. *Israelenses*.

Wu, F.; Liu, L.; Wang, J.; Song, X.; Ren, D. (2011). Distribution of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Northwestern China. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*.v.11.

Zheng, A.; et. al.Characterisation and expression of a novel haplotype cry2A-type gene from *Bacillus thuringiensis* strain JF19-2.

Zheng, A.; Zhu, J. Tan, F.; Tan, F.; Guan, P.; Yu, X.; Wang, S.; Deng, Q.; Li, S.; Huainian, L; Li, P. (2010) Characterisation and expression of a novel haplotype cry2A-type gene from *Bacillus thuringiensis* strain JF19-2. *JAnnals of Microbiology*. v. 60. Jan. p.126-134.

Zheng, et. al. (2019). Incompatible and sterile insect techniques combined eliminate mosquito $\text{\u00f3es}$. *Nature*. v. 572.

Influência dos fatores abióticos na obtenção de *Bacillus thuringiensis* do solo no bioma do Cerrado do Maranhão, Brasil

Sárvia Rafaelly Nunes Santos

RESUMO

A influência de fatores abióticos sobre a abundância de populações de microrganismos no solo tem sido pouco estudada, principalmente com relação à bactéria *Bacillus thuringiensis*. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi analisar a relação entre os fatores abióticos do solo do Cerrado maranhense na abundância de *B. thuringiensis* e comparar sua patogenicidade em larvas de *Aedes aegypti*. As coletas de solo foram feitas em cinco municípios do centro ao leste do Estado: São Mateus do Maranhão, Alto Alegre, Coroatá, Timbiras e Codó. As amostras foram obtidas na camada de 0-0,2 m, observando-se a fertilidade do solo e sua textura. Além disso, nos locais de coleta foram medidas a umidade e a temperatura. Com o isolamento e o crescimento bacteriano, as colônias foram avaliadas quanto à morfologia. Aquelas que apresentaram características típicas de *Bacillus* spp. foram visualizadas sob microscopia de contraste de fase para verificar a presença de inclusões paraesporais (cristais de proteínas). Para o bioensaio seletivo, os isolados de *B. thuringiensis* foram cultivados em caldo nutriente e solução de sais a 180 rpm, 28°C, por 5 dias. Para verificar a patogenicidade dos isolados de *B. thuringiensis* em larvas de *A. aegypti* utilizou-se o seguinte método: em copos contendo 10ml de água destilada foram adicionadas 10 larvas de 3º estágio, 1 ml da cultura total em triplicatas. De posse dos dados procedeu-se análise de componentes principais, agrupamentos e correlação. *Bacillus thuringiensis* foi encontrado em solo ácido e de baixa fertilidade, o que indica que este microorganismo possui uma capacidade metabólica capaz de se manter viável nestes locais. Os atributos abióticos analisados K, Ca, Mg, H+Al, MO, SB, CTC, V, argila e silte se correlacionaram de maneira elevada e positiva e, de forma negativa a areia e o iBt. A análise de agrupamento permitiu

verificar que os solos com altas concentrações de alumínio e acidez potencial não apresentaram iBt. Dos 63 isolados de *Bacillus thuringiensis*, 43 (68,2%) apresentaram susceptibilidade para larvas de *Aedes aegypti*. Destes, sete isolados apresentaram mortalidade acima de 50% em 48 horas. Conclui-se que Bt possui correlações com a textura do solo, que as concentrações de alumínio no solo podem influenciar na permanência de *B. thuringiensis* no solo. Comparando os dados do bioensaio de susceptibilidade pode-se inferir que a capacidade de adaptação ao meio ambiente desta bactéria pode alterar sua capacidade inseticida.

Palavras-chave: Bactéria, ambiente, inseto

Influence of abiotic factors on the obtainment of *Bacillus thuringiensis* from soil in the
Cerrado do Maranhão biome, Brazil

ABSTRACT

The influence of abiotic factors on the abundance of sources of microorganisms has not been poorly studied, especially in relation to the bacterium *Bacillus thuringiensis*. Thus, the objective of this work was to analyze a relationship between abiotic factors in the Cerrado Maranhense soil and the abundance of *B. thuringiensis* and to compare its pathogenicity in *Aedes aegypti* larvae. Soil collections were carried out in five municipalities from the center to the east of the state: São Mateus do Maranhão, Alto Alegre, Coroatá, Timbiras and Codó. The primaries were slid in the 0-0.2 m layer, observing soil fertility and texture. In addition, at the collection sites, humidity and temperature were measured. With isolation and bacterial growth, as colonies were evaluated for morphology. Those that characterize the typical characteristics of *Bacillus spp.* were visualized under phase contrast microscopy to verify

the presence of parasporal inclusions (protein crystals). For the selective bioassay, eligible *B. thuringiensis* were cultivated in nutrient broth and salt solution at 180 rpm, 28°C, for 5 days. To verify the pathogenicity of *B. thuringiensis* in *A. aegypti* larvae, the following method was used: 10 ml of distilled water were added to 10 ml of 3rd stage larvae, 1 ml of the total culture in triplicates. With the data, principal components, clusters and correlation were analyzed. *Bacillus thuringiensis* was found in acidic soil with low fertility, which indicates that this microorganism has a metabolic capacity capable of remaining viable locally. The abiotic attributes stimuli K, Ca, Mg, H + Al, MO, SB, CTC, V, clay and silt were highly positively correlated and negatively correlated with sand and iBt. A common cluster analysis verifies soils as high aluminum highs and iBt undissipated potential acidity. Of the 63 points of *Bacillus thuringiensis*, 43 (68.2%) were susceptible to *Aedes aegypti* larvae. Of these, seven standardized above 50% in 48 hours. It is concluded that Bt has correlations with soil texture, that aluminum applications in the soil can influence the permanence of *B. thuringiensis* in the soil. Comparing the data from the susceptibility bioassay, it can be inferred that the ability of this bacterium to adapt to the environment can change its insecticidal capacity.

Keywords: Bacteria, environment, insect

1. INTRODUÇÃO

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria ubíqua, gram-positiva, formadora de esporos, os quais possuem uma ou mais proteínas inseticidas utilizadas no controle de pragas de insetos das ordens Lepidoptera, Diptera e Coleoptera (Pinto, et al., 2009; Jouzani; Sharafi, 2017; Rabinovitch, et al., 2017). Em relação aos insetos da ordem Diptera, *B. thuringiensis* possui comprovada toxicidade para *Aedes aegypti* que é mosquito vetor de importantes

arbovírus que causam doenças como dengue, Zika e Chikungunya, (Bravo et al., 2009; Pruszyński; Hribar; Mickle; Leal, 2017).

Além das características entomopatogênicas, esta espécie de bactéria tem se destacado por possuir propriedades específicas também contra algumas espécies de nematódeos e carrapatos. Além disso, age como promotora de crescimento e resistência a pragas em plantas, como produtora de proteínas com atividade anticâncer e como antagonista de fungos patogênicos (Jouzani; Sharafi, 2017). Apesar das novas aplicações, e de seus atributos em outros campos de pesquisa, a ecologia desta bactéria constitui-se uma linha de pesquisa pouco elucidada (Raymond, 2017).

As primeiras pesquisas sobre a ecologia desta bactéria trabalhavam com a hipótese de que *B. thuringiensis* tinha seu habitat natural dentro de determinadas espécies de insetos (Prasertphon et al., 1973; Suzuki et al., 2004). Contudo, Martin e Travers (1989) indicam que esta bactéria é nativa de solos e possui atividade inseticida acidental.

O solo ainda hoje é apontado como um dos ambientes nos quais há maior quantidade de esporos de Bt (Ibarra et al., 2003; Costa et al., 2010; Bakri et al., 2012; Soares-da-Silva et al., 2017; Dagga et al., 2016). Este ambiente tem capacidade de proporcionar micro habitats que variam em sua disponibilidade de nutrientes, em suas características físico-químicas, nas características dos agregados do solo (Moreira; Siqueira, 2006; Duchicela et al., 2013), nas interações intraespecíficas, interespecíficas, e entre os fatores abióticos do ambiente externo e do próprio solo (Cotta, 2016; Fierer, 2017).

Entretanto, a influência desses fatores sobre a abundância de populações de microrganismos no solo é pouco conhecida, em parte porque a maioria dos micróbios e suas interações, não podem ser diretamente observados ou medidos (Karimi et al., 2019). No entanto, foram encontradas novas cepas de *B. thuringiensis* com elevada taxa de toxicidade

para *A. aegypti* em solos da Mata Atlântica (Santos *et al.*, 2011). Da mesma forma outros autores as coletaram em solos do Cerrado maranhense, Amazônia e Caatinga (Soares-Silva, 2017), em solos de restinga e manguezal (Viera-Neta, *et al.*, 2020) e continuam a levantar questões sobre as características e a influência de fatores abióticos do ambiente e do solo na obtenção de isolados de *B. thuringiensis*.

Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar a relação entre os fatores abióticos ambientais e do solo de um bioma do Cerrado maranhense, na abundância e patogenicidade de *B. thuringiensis* para larvas de *A. aegypti*.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 Abundância de *Bacillus thuringiensis* em solos do cerrado maranhense.

No isolamento foram obtidas 192 colônias bacterianas, sendo 63 (32,8%) identificados como *B. thuringiensis*. Para o mesmo bioma o trabalho de (Lobo *et al.*, 2018) apresentou um índice de (31,2%). E em comparação a pesquisas realizadas na Mata Atlântica (37, 04%) (Santos *et al.*, 2011), a Caatinga (53,3%) e a Amazônia (72, 7%) (Soares-silva, 2017) o Cerrado, apresentou o menor índice de *B. thuringiensis* no isolamento.

O índice de colônias *B. thuringiensis* em relação ao número de colônias bacterianas (*iBt*) variou de 0,00 a 0,64 (Tabela 1). Uma possível explicação para índices baixos em relação ao trabalho de (Polanczyk, 2004), está no fato de que no ambiente conservado, a competição por nutrientes e o número de interações e inibições antagônicas pode tornar a abundância microbiana restrita para algumas populações (Karimi *et al.*, 2019).

Tabela 1. Isolados de *Bacillus thuringiensis* encontrados em amostras de solo (com respectivos números de colônias e índice de *iBt*) coletadas em diferentes cidades no Cerrado maranhense

Local	Número de colônias bacterianas (ncb)	Número de colônias de Bt (nbt)	Índice bt (nbt/ncb)x100
SM 01	14	4	0,29
SM 02	8	5	0,63
SM 03	10	3	0,30
AT 04	5	1	0,20
AT 05	15	5	0,33
AT 06	10	1	0,10
CT 07	17	0	0,00
CT 08	11	0	0,00
CT 09	16	6	0,38
TB 10	11	7	0,64
TB 11	20	10	0,50
TB 12	20	3	0,15
CD 13	18	11	0,61
CD 14	10	5	0,50
CD 15	7	3	0,43
Total	192	64	0,33

Nota: Legenda das abreviaturas SM- São Mateus do Maranhão; AT- Alto Alegre; CT- Coroatá; TB-Timbiras; CD-Codó. Fonte: Autores

2.2 Caracterização do solo por meio da análise da fertilidade

O índice de saturação por bases (v), que se refere à proporção de cátions trocáveis (Ca, Mg, K, Na), indica que as condições gerais do solo analisado são de baixa fertilidade para uso agrícola (Tabela 2). De acordo com Bernardi, (2015; 2002) esta condição é habitual na maioria dos solos das regiões tropicais, que comumente são intemperizados e apresentam baixos teores de macronutrientes.

Tabela 2. Concentrações médias de compostos químicos encontrados nas amostras de solos do Cerrado maranhense e componentes que compõem sua textura

pH	M.O	P	K	Na	Ca	Mg	Al ³⁺	H+AL	SB	CTC	V	m	Areia	Argila	Silte
(H ₂ O)	dag	(mg/dm ³)	(cmol _c dm ⁻³)								%				
	k ⁻¹ g														
4,41	0,89	6,5	0,25	0,04	2,12	0,90	1,53	10,43	3,31	13,76	24	33	56,9	13,8	29,3

. Nota: pH, P - fósforo, K -potássio, Na - sódio, Ca - cálcio, Mg - magnésio, M.O - matéria orgânica, SB - soma das bases), CTC - capacidade de troca catiônica, V - saturação por bases, m -saturação por alumínio, H+Al - acidez potencial. Fonte: Autores

A bioquímica da solução do solo é formada principalmente por reações ácido-base e redox (Voroney; Heck, 2015). Essas reações podem afetar os microrganismos em suas

funções enzimáticas, ou podem favorecer um ou outro antagonista (Voroney; Heck, 2015). No solo analisado que é ácido e de baixa fertilidade, estes resultados apontam para a capacidade de adaptação metabólica de *B. thuringensis*, confirmando sua característica de bactéria generalista e sua presença em vários tipos de solo.

2.3 Análise de componente principal (acp)

A análise ACP gerou três componentes que explicam 87,04% dos dados do isolamento e da média dos atributos (Tabela 3). Os dois primeiros componentes explicaram 76,18% da variabilidade das amostras. O primeiro componente principal correlacionou-se com doze das 17 variáveis estudadas. Os atributos K, Ca, Mg, H+Al, MO, SB, CTC, V, argila e silte se correlacionaram de maneira elevada e positiva e, de forma negativa a areia e o iBt (Tabela 4).

Tabela 3 – Estimativa das variâncias (autovalores) e porcentagem acumulada da variância total (%), obtidas pela análise de componentes principais considerando-se 15 amostras de solos do Cerrado maranhense

CP	Autovalores	% Acumulada
1	8.63	50.74
2	4.33	76.18
3	1.85	87.04

No segundo componente principal, com 25,44 % da variabilidade total dos dados, os atributos Al e m apresentaram correlação elevada e positiva e pH e v, elevada e negativa (Tabela 4). As contribuições, v e m foram as variáveis que mais contribuíram para variabilidade dos componentes principais (Tabela 4). Em relação, a variável resposta, iBt, o m, no primeiro componente possui relação diretamente proporcional e inversamente no segundo componente.

Tabela 4 – Correlação, qualidade de representação (Cos2) e contribuição (%) entre variáveis originais e componentes principais em iBt e os atributos químicos e físicos de solos do Cerrado maranhense

Variáveis	Correlação		Cos2	Contribuição (%)
	CP1	CP2		
iBt	-0.6392**	-0.0448	0.4106	3.1706
pH	0.2279	-0.9304**	0.9175	7.0849
P	-0.2381	-0.2526	0.1205	0.9303
K	0.8275**	-0.1048	0.6958	5.3728
Na	0.2903	0.2255	0.1351	1.0435
Ca	0.8260**	-0.4350	0.8714	6.7289
Mg	0.8777**	-0.0616	0.7742	5.9781
Al	0.1814	0.9219**	0.8829	6.8172
H+Al	0.7484**	0.6206*	0.9453	7.2991
MO	0.7702**	0.3754	0.7343	5.6697
SB	0.9322**	-0.3135	0.9675	7.4704
CTC	0.9097**	0.3612	0.9579	7.3969
v	0.5680*	-0.7994**	0.9617	7.4261
m	-0.4876	0.8551**	0.9689	7.4813
Areia	-0.9385**	-0.1509	0.9036	6.9774
Argila	0.8587**	0.3759	0.8786	6.7847
Silte	0.9081**	0.0079	0.8247	6.3677

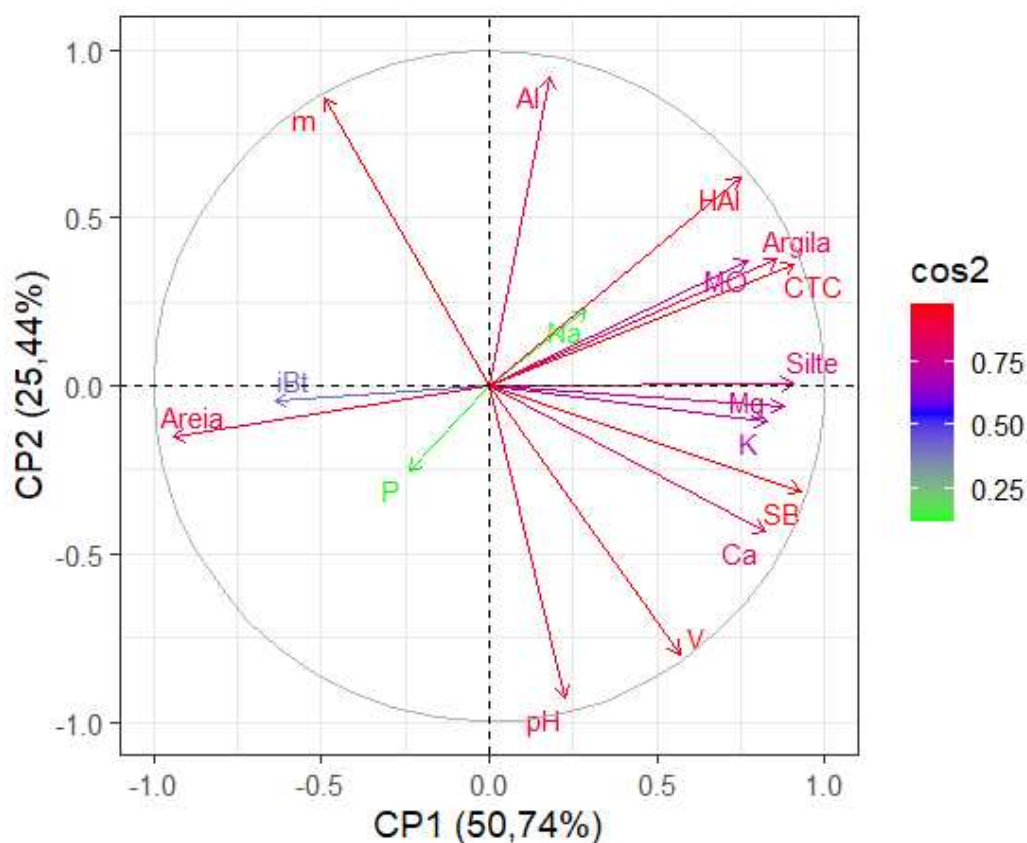
** Significativo a 1%

*Significativo a 5%

Os fatores químicos do solo se associam entre si, porém, são inversamente associados com areia e o índice iBt (Figura 1). A relação negativa entre iBt e areia pode estar ligada as vantagens ambientais, como estabilidade nas proporções de C, N, e P, que areia pode oferecer as comunidades bacterianas em relação ao meio externo (Mula-Michael; Willams, 2012).

Evidências da associação de Bt com a areia, também foram encontradas por Hossain; Ahmed; Hoque (1997), em solos de Bangladesh, apontando que esta bactéria pode estar associada à textura do solo. Explicações biológicas ainda não foram elucidadas para explicar estas associações.

Figura 1 – Biplot mostrando a associação entre iBt, atributos químicos e físicos em amostras de solo do Cerrado maranhense

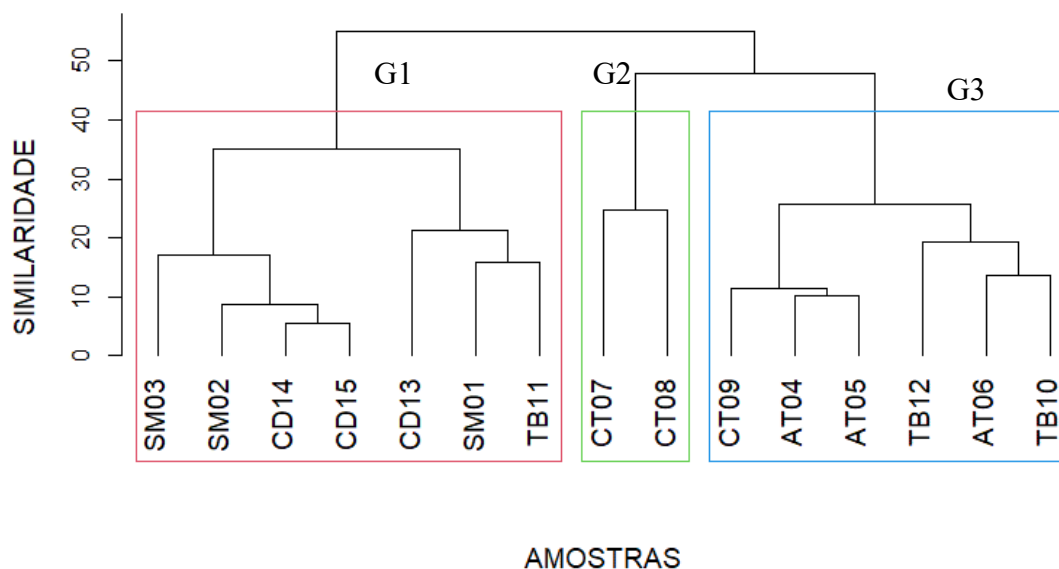


Nota: Altos valores de $\cos^2$ estão associados a uma escala de cores e proximidade do círculo de correlações, quanto mais quente a cor (vermelho) e mais próximo do círculo de correlação maior a importância dessas variáveis para interpretação desses componentes.

A análise de agrupamento evidencia a dissimilaridade entre os diferentes pontos amostrados, sendo formado três grupos. O grupo 1 (G1) pelas amostras SM01, SM02, SM03, TB11, CD13, CD14 e CD15. Outro grupo foi formado pelas amostras CT07 e CT08 (G2), e o terceiro grupo (G3) pelas amostras AT04, AT05, AT06, CT09, TB10 e TB12 (Figura 3).

Assim, quando se agrupam as amostras conforme o dendrograma, verifica-se que G2, composto pelas amostras CT07 e CT08 não apresentaram iBt, (Tabela 5) e estão localizadas em solos que possuem altas concentrações de alumínio e acidez potencial. O que pode indicar que estes atributos estão limitando a abundância de *B. thuringiensis* neste solo.

Figura 2 – Dendrograma de dissimilaridade entre iBt, atributos químicos e físicos do solo no Cerrado maranhense.



Nota: Legenda das abreviaturas SM- São Mateus do Maranhão; AT- Alto Alegre; CT- Coroatá; TB-Timbiras; CD-Codó. Fonte: Autores.

Os grupos G1 e G3 nos agrupamentos (Figura 2) possuem concentrações de cátions básicos (K, Na, Ca e Mg) com valores semelhantes (Tabela 5). Dessa forma, não é possível inferir que *Bacillus thuringiensis* esteja sendo influenciado por alguma característica destes solos.

1 **Tabela 5.** Valores entre iBt, atributos químicos e físicos em amostras de solo, coletadas no Cerrado maranhense.

AMOSTRA	iBt	pH	P	K	Na	Ca	Mg	Al	H+Al	MO	SB	CTC	V	m	Areia	Argila	Silte
	%	(H ₂ O)	(mg/dm ³)			(cmol/dm ³)				(dag/kg)	(cmol/dm ³)	(cmol/dm ³)			(%)		
SM01	0.29	4.24	6.39	0.11	0.11	1.29	0.42	2.38	8.89	0.52	1.93	10.82	17.84	55.22	56.10	10.29	33.61
SM02	0.63	4.20	6.64	0.06	0.02	0.98	0.39	1.70	7.55	0.83	1.44	8.99	16.04	54.14	79.50	7.22	13.28
SM03	0.30	4.05	5.41	0.06	0.02	1.47	0.48	2.99	10.83	1.03	2.02	12.85	15.69	59.71	74.15	5.98	19.87
AT04	0.20	4.84	4.59	0.14	0.02	2.44	0.48	0.14	6.50	0.61	3.08	9.59	32.14	4.35	61.31	6.95	31.74
AT05	0.33	4.82	3.93	0.40	0.03	3.26	1.42	0.19	9.82	0.94	5.11	14.93	34.21	3.53	57.45	12.57	29.98
AT06	0.10	4.40	6.80	0.40	0.03	2.12	1.40	0.70	9.35	0.85	3.94	13.29	29.65	15.09	49.55	12.69	37.77
CT07	0.00	4.35	6.23	0.28	0.03	3.94	1.10	1.84	15.18	1.48	5.35	20.53	26.05	25.64	21.51	27.92	50.57
CT08	0.00	4.18	3.19	0.45	0.05	2.77	1.94	4.74	18.91	1.34	5.21	24.13	21.60	47.61	27.37	27.61	45.02
CT09	0.38	4.92	10.49	0.31	0.03	3.82	1.09	0.07	7.68	0.76	5.25	12.94	40.61	1.31	58.71	10.31	30.98
TB10	0.64	4.39	10.08	0.57	0.14	2.88	0.95	1.17	13.07	1.21	4.53	17.60	25.76	20.46	51.98	18.14	29.88
TB11	0.50	4.25	7.54	0.34	0.11	1.13	0.71	2.19	12.79	0.89	2.28	15.07	15.15	48.99	48.91	20.54	30.55
TB12	0.15	4.59	4.83	0.34	0.05	2.62	1.79	1.12	10.48	0.99	4.79	15.28	31.38	18.94	36.89	20.04	43.07
CD13	0.61	4.42	6.31	0.17	0.02	1.26	0.73	1.21	10.70	0.71	2.18	12.88	16.91	35.77	61.43	11.90	26.67
CD14	0.50	4.27	7.95	0.06	0.00	1.03	0.34	1.47	8.03	0.77	1.42	9.45	15.05	50.81	82.81	7.71	9.48
CD15	0.43	4.37	7.04	0.06	0.02	0.83	0.34	1.17	6.77	0.52	1.24	8.01	15.49	48.47	86.15	7.19	6.66
Média	0,33	4,41	6,5	0,25	0,04	2,12	0,90	1,53	10,43	0,89	3,31	13,76	24	33	56,9	13,8	29,3
G1	0.46	4.26	6.75	0.12	0.04	1.14	0.49	1.87	9.37	0.75	1.79	11.15	16.03	50.44	69.86	10.12	20.02
G2	0.00	4.27	4.71	0.37	0.04	3.35	1.52	3.29	17.05	1.41	5.28	22.33	23.83	36.62	24.44	27.77	47.80
G3	0.30	4.66	6.79	0.36	0.05	2.86	1.19	0.56	9.49	0.89	4.45	13.94	32.29	10.61	52.65	13.45	33.90

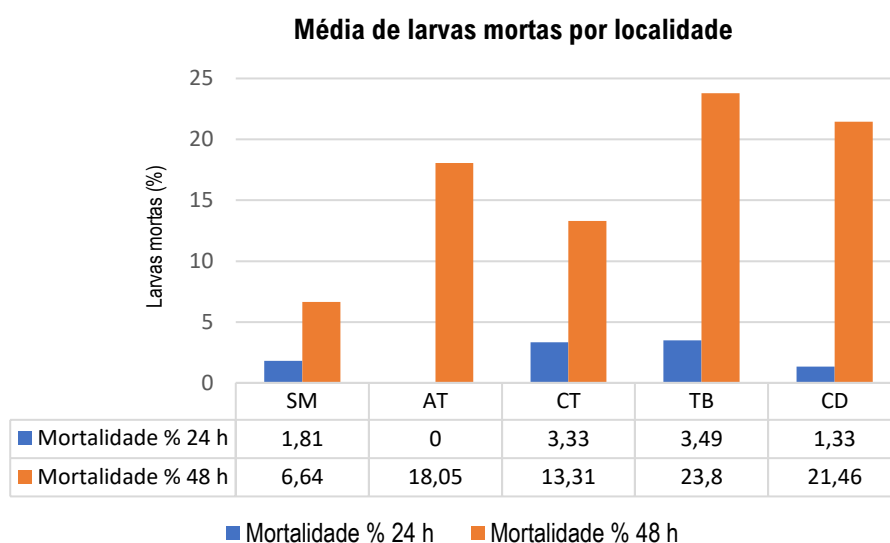
2 Nota: (G1: SM01, SM02, SM03, TB11, CD13, CD14e CD15);(G2: CT07 e CT08); (G3: AT04, AT05, AT06, TB10, TB12 e CT09)

2.4 Bioensaio seletivo para *Aedes aegypti*

Dos 63 isolados de *Bacillus thuringiensis*, 43 (68,2%) apresentaram susceptibilidade para larvas de *Aedes aegypti*. Destes, sete isolados apresentaram mortalidade acima de 50% em 48 horas. Lobo, et. al. (2018) para o cerrado apresentou índice da susceptibilidade de 12 (4,0%), sendo que o nove isolados tiveram mortalidade acima de 50% em 48 horas.

Na figura 4 mostra a média de mortalidade larval da triplicata de cada localidade, os isolados de SM e CD que apresentam baixa e alta mortalidade respectivamente, estão localizados em solos com maiores valores de saturação por alumínio. Isto indica que este fator não é limitante para abundância de *B. thuringiensis* e que as diferenças de mortalidade podem esta relacionadas à existência de diferentes linhagens com composição gênica e proteica distinta. Incluir a descrição de um autor.

Figura 3. Comparação da mortalidade média de larvas de *Aedes aegypti*, testadas com cepas de *Bacillus thuringiensis* oriundas de diversos municípios do Cerrado maranhense.



Legenda das abreviaturas (SM- São Mateus do Maranhão; AT- Alto Alegre; CT- Coroatá; TB-Timbiras; CD-Codó).
Fonte: Própria

3. METODOLOGIA

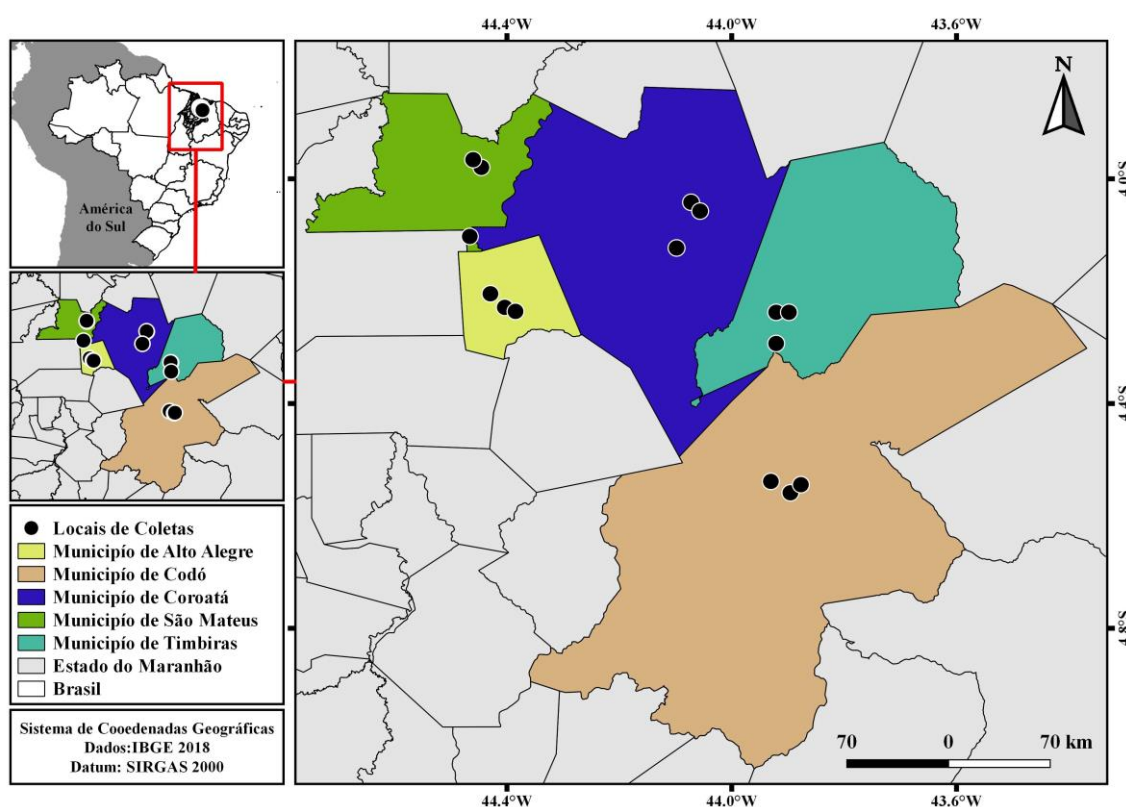
3.1 Área de estudo

A Floresta de Cocais é uma das ecoregiões do cerrado maranhense e engloba uma área de transição (ecótono) entre a Amazônia, Cerrado, e Caatinga (Sano *et al.*, 2019). Esta região se caracteriza por uma elevada abundância de palmeiras, especialmente babaçu (*Attalea speciosa* Mart.) e a carnaúba (*Copernicia prunifera* Mill. H.E. Moore) (Sano *et al.*, 2019). O Território dos Cocais tem área de 32.608,8 km² e população estimada em 839.181 habitantes, distribuídos em 41 municípios (Codevasf, 2006).

3.2 Otimização da metodologia de coleta para *Bacillus thuringiensis*

As coletas no Cerrado maranhense ocorreram no período de 28 a 31 de janeiro de 2020, percorrendo os municípios do centro ao leste maranhense: São Mateus do Maranhão (SM), Alto Alegre (AT), Coroatá (CT), Timbiras (TB) e Codó (CD). As amostras de solo foram coletadas em pontos aleatórios de matas conservadas em propriedades privadas do bioma Cerrado (Figura 5).

Figura 5: Áreas de coleta de amostras de solo no Cerrado maranhense



Neste estudo, o protocolo de obtenção para *B. thuringiensis* e para análise da fertilidade do solo foram realizados utilizando-se a mesma amostra. Ambos são protocolos padrões, sendo que o primeiro é usado para obtenção e isolamento de *B. thuringiensis* do solo (OMS, 1985). O segundo é usado para avaliação da disponibilidade de nutrientes para manejo da fertilidade do solo (Sousa; Lobato, 2004; Prezotti; Guarçon, 2013).

Foi estabelecida uma área mínima de coleta de um hectare, três áreas por município, totalizando 15 amostras. Os ambientes conservados foram selecionados de forma aleatória, e, em cada ponto de coleta foi requerido autorização para retirada do solo.

Para o estudo coletou-se primeiramente os dados climatológicos como temperatura e umidade relativa do ar com termo-higrômetro, latitude e a longitude com aplicativo *Forest Navigator Lite*. Quanto à profundidade de coleta do solo, definiu-se a

camada de 0-10 cm, tendo em vista que esta camada abrange a maioria das atividades microbiológicas (Sousa; Lobato, 2004; Prezotti; Guarçon, 2013). Para o manejo do solo para análise físico-química, a ferramenta utilizada foi o trado holandês, devido a textura e estrutura dos solos do Cerrado, em períodos chuvosos (Sousa; Lobato, 2004; Prezotti; Guarçon, 2013).

Para que se obtivesse uma abrangência da área e os dados fossem representativos, a área foi percorrida ao acaso, utilizando o caminhar em zigue-zague. Definiu-se ainda o número de 15 subamostras para formar uma composta em cada área. Com isso, foi estabelecida uma distância de 10m do início da mata e um distanciamento de 10 m de cada subamostra (Sousa; Lobato, 2004; Prezotti; Guarçon, 2013).

No ambiente natural, não são todos os lugares que atendem ao critério de coleta para *B. thuringiensis*. Por isso, definiu-se que na sexta sub amostra, em um ambiente sombreado, no mesmo orifício em que foi retirado o solo para obtenção das amostras de análises físico-química, seria coletado amostras de solo para isolamento de *B. thuringiensis*. Esta sucedeu-se retirando o solo com espátula de madeira e a amostra foi armazenada em tubos de centrifugação do tipo Falcon, previamente estéreis. Seguindo com a identificação da amostra para transporte, armazenamento e isolamento no Laboratório de Entomologia Médica - LABEM, da Universidade Estadual do Maranhão do Campus Caxias.

4. Isolamento de *Bacillus thuringiensis*

O isolamento de *B. thuringiensis* foi realizado no Laboratório de Entomologia Médica-LABEM - CESC/UEMA de acordo com o protocolo preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 1985), que consistiu em misturar 1 g de solo de

cada amostra a 10 mL de solução de sais (0,006 mM FeSO₄.7H₂O; 0,01 mM CaCO₃. 7H₂O; 0,08 mM MgSO₄.7H₂O; 0,07 mM MnSO₄.7H₂O; 0,006 mM ZnSO₄.7H₂O).

Em seguida, as amostras foram diluídas seriadamente (10^{-1} e 10^{-2}) em solução salina (NaCl a 1%). Posteriormente, uma alíquota de 1 mL da última diluição foi homogeneizada em agitador de tubos vortex e submetida a choque térmico a 80 °C por 12 min, em banho-maria, e posteriormente em gelo por 5 min. Após este processo, 100 µL da solução foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura ágar nutriente (AN) (peptona 5 g/L, cloreto de sódio 5 g/L, extrato de carne 1,5 g/L, extrato de levedura 1,5 g/L e ágar 15 g/L) (Himedia). As placas foram invertidas e armazenadas em estufa bacteriológica a 28 °C, durante 48 h para o crescimento das colônias bacterianas.

Após o crescimento, as colônias foram avaliadas quanto à morfologia (forma, bordo, elevação, estrutura, tamanho e coloração) conforme Rampersad; Ammons, (2005). Aquelas que apresentaram características típicas de *Bacillus* spp. foram visualizadas sob microscopia de contraste de fase (aumento de 1000 X) para verificar a presença de inclusões paraesporais (cristais de proteínas). As colônias positivas para *Bacillus* spp. foram semeadas em placas de Petri contendo ágar e incubadas em estufa bacteriológica por 48 horas. Ao término do tempo desta etapa, cada colônia foi plaqueada isoladamente, incubada em estufa por cinco dias e devidamente armazenada. Para o índice Bt (iBt) foi calculado a porcentagem de colônias do número total de colônias obtidas no isolamento.

Os isolados identificados como *B. thuringiensis* foram depositados no Banco de Bacilos Entomopatogênicos do Maranhão – BBENMA, no Laboratório de Entomologia Médica do CESC/UEMA. Para cada isolado identificado foi gerado um código, formado por quatro letras (BtMA: Bt - *Bacillus thuringiensis* e MA - Maranhão) acrescido do número, que corresponde a sequência do seu armazenamento no Banco.

5. Bioensaio de susceptibilidade para *Aedes aegypti*

Os bioensaios foram realizados segundo o protocolo preconizado por Dulmage et al. (1990) com algumas modificações. Os isolados de *B. thuringiensis* foram cultivados em caldo nutriente e solução de sais a 180 rpm, 28°C por 5 dias. Para o teste foram utilizados copos que continham: 10 ml de água destilada, 10 larvas de 3º estágio de *A. aegypti*, e 1 ml da cultura total. Foi realizado um controle negativo sem bactérias, para verificar a qualidade das larvas e a seleção de *Bt* dos solos coletados. Para cada amostra foi feita a triplicata e a verificação da atividade patogênica nas larvas após 24 e 48 horas (WHO, 2005).

6. Análise de atributos químicos do solo e textura

Foram determinados os seguintes atributos do solo: acidez ativa (pH em água); acidez potencial ($H + Al$); Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ e Al^{3+} trocáveis; P; e matéria orgânica, ainda se calculou a soma de bases (SB), capacidade de troca de cátions (CTC), saturação por bases (V) e saturação por alumínio; determinou-se ainda os teores de areia, silte e argila, cujos procedimentos analíticos adotados seguiram o manual de métodos de análise de solo (Teixeira et al., 2017).

7. Análise estatística

De posse dos dados da análise de fertilidade e textura do solo e índice de colônias *Bacillus thuringiensis* (*iBt*) foram submetidas a análise de componentes principais (ACP) (JOLLIFFE, 1986) e agrupamento utilizando a distância euclidiana e o método de UPGMA (Unweighted Pair-Group Average).

Para a análise dos resultados na ACP considerou-se o parâmetro $\cos^2$, indicador da qualidade de representação, e simultaneamente as contribuições (%) que traduzem a

parte da variância correspondente a cada nível da variável. Variáveis que estão correlacionadas com CP1 e CP2 são as mais importantes para explicar a variabilidade no conjunto de dados e possuem altos valores de Cos^2 e contribuição (%), indicando uma boa representação da variável no componente principal (Abid; Williams, 2010).

Na correlação de Pearson, selecionaram-se as variáveis explicativas com maior correlação com a variável resposta (iBt) e que, ao mesmo tempo, apresentassem baixa correlação entre si. A multicolinearidade foi investigada pelo fator de inflação da variância (VIF). Após a seleção das variáveis explicativas ajustou-se modelos via regressão passo a passo ou stepwise.

A técnica stepwise verifica quais variáveis são importantes para explicar o modelo. Esta técnica consiste em se iniciar o ajuste de um modelo reduzido, e iterativamente construir uma sequência de modelos de regressão, incluindo ou excluindo as variáveis, uma a uma. O critério de inclusão ou exclusão das variáveis foi baseado selecionando-se o modelo com maior R^2 ajustado e menor valor do critério de informação de Akaike (AIC). Antecedendo a análise de regressão, foi realizada uma análise exploratória descritiva dos dados, com o objetivo de observar as suas características pertencentes à distribuição normal e homogeneidade.

As análises foram realizadas pelo Software R de computação estatística (R Core Team, 2020) utilizando os pacotes “FactoMineR” (Lê; Josse e Husson, 2008), “factoextra” (Kassambara; Mundt, 2020), “Mass” (Venables; Ripley, 2002) e “leaps” (Lumley, 2020).

8. CONCLUSÃO

A abundância de *B. thuringiensis* apresenta variações entre solos do Cerrado. Considerando que este possui pH ácido e baixa fertilidade para nutrientes de planta, a

presença de Bt pode indicar a capacidade de adaptação desse organismo aos mais diversos ambientes. Os achados deste trabalho, indicam que *B. thuringiensis* apresenta uma associação negativa com a areia, índice de alumínio e acidez potencial. O que pode indicar que neste solo, a textura e estes atributos químicos, podem ser um fator limitante para *B. thuringiensis*

9. REFERÊNCIAS

- Abid, h.; Wwilliams, L. J. (2010) “Principal Component Analysis.” John Wiley and Sons, Inc. WIREs Comp Stat 2: 433–59.
- Asokan, R.; Puttaswanmy.Y (2007) Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* Berliner from Soil, leaf, seed dust and insect cadaver. Journal of biological control, v. 21, n. 1, June.
- Ammoueh, H., Harba, M., Idris, E., Makee, H., (2011) Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* isolates from Syrian soil and testing of their insecticidal activities against some insect pests. Tübitak, v. 35, p. 421-431.
- Bakri, Y.; Ammouneh, H.; El-khoury, S.; Harba, M.; Thonart, P.(2012) Isolation and identification of a new *Bacillus* strain for amylase production. Research in Biotechnology, v. 3, n. 6, p. 51-58.
- Brasil/Svs/MS.(2019) Secretaria de vigilância em Saúde do Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes* (dengue, chikungunya e Zika) até a Semana Epidemiológica 11 de 2019. Boletim Epidemiológico. Brasília-DF.
- Bravo A., Gill, SS., Soberón M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. Toxicon. 2007 Mar 15;49(4):423-35.
- Brito, CAA.; Cordeiro, MT (2016) One year after the Zika virus outbreak in Brazil: from hypotheses to evidence. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, p. 537-54.
- Canini, F.; Geml, J.; D'Acqui, L.P P; Buzzini, B.; Turchetti, S.; Onofri, S.; Ventura, L. Zucconi,(2021). Fungal diversity and functionality are driven by soil texture in Taylor Valley, Antarctica, Fungal Ecology, v. 50.
- Cardoso, N.B.J.E.; Andreote, DF. (2016) Microbiologia do Solo. 2ª edição. Piracicaba, São Paulo.
- Costa, J. R. V.; Rossi, J. R.; Marucci, S. C.; Alves, E. C. C.; Volpe, H. X. L.; Ferraudo, S. S.; Lemos, M. V. F.; Desidério, J. (2010) Atividade tóxica de isolados de *Bacillus thuringiensis* a larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). Neotropical Entomology. Londrina, set./out, v. 39, n. 5, p. 757-766.
- Charles JF, de Barjac H (1983) Action des cristaux de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Su 1 'intestin moyen des larves de *Aedes aegypti* L. en microscopie electronique. Ann MicrobiolInst Pasteur 134: 197–218.
- Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba-CODEVASF (2006). Brasília. v.2
- Consoli, RABG.; Oliveira, RL. (1994). Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Fiocruz, Rio de Janeiro. p.228.1d.

Costa, JRV.; Rossi, JR.; Marucci, SC.; Alves, ECC.; Volpe, H.; Ferraud, S.S.; Lemos, MVF; Desidério, J. (2010) Atividade tóxica de isolados de *Bacillus thuringiensis* a larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). Neotropical Entomology. Londrina, set./out, v. 39, n. 5, p. 757-766.

Cotta, SR. (2016) O solo como ambiente para a vida microbiana *In*: Microbiologia do Solo. Cardoso, EJBN. Andreote, F. D. Piracicaba. Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz. Chapter: 2. 2 ed.

Dagga, A.; Aziz, M.A.; Al Amnama, A. al'raoof.; Al-sharif, M.; El Hindi, M. (2016) isolation and molecular characterization of cry gene for *Bacillus thuringiensis* isolated from soil of gaza strip. international journal current microbiology and Applied Sciences, v. 5, n. 4, p. 659-666

Dancey, C.; Reidy, J. (2006). Estatística Sem Matemática para Psicologia: Usando SPSS para Windows. Porto Alegre, Artmed.

Duchicela, J., Sullivan, S.T., Bever, D.J (2013). Soil aggregate stability increase is strongly related to fungal community succession along an abandoned agricultural field chronosequence in the Bolivian Altiplano. Journal of Applied Microbiology, Oxford, v. 50, p. 1266-1273.

Dulmage, H. T.; Yousten, A. A.; Singer, S.; Lacey, L. A. Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus sphaericus*. Geneva. UNDP/World Health Organization/BanK/WHO Special Programme for Research and training in tropical diseases (TDR), 1990. 58p.

Fierer, N (2017) Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. Nature reviews/microbiology.

Fiuza, LM, Polanczyk, RA., Crickmore, (2017) *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus* Characterization and use in the field of biocontrol. Fiuza, LM, Polanczyk, RA., Crickmore, N. Springer. Chapter 1.

Forattini, O.P. (2002) Culicidologia Médica. Universidade de São Paulo. São Paulo. p. 860. 2 ed.

Forsyth, G.; Logan, N.A. (2000) Isolation of *Bacillus thuringiensis* from Northern Victoria Land, Antarctica. Applied Microbiology, v. 30, p. 263-266.

Gujarati, D. N. Econometria básica. 3 ed. São Paulo: Makron Books, (2000).

Harbach, R.E. (2017). Mosquito Taxonomic Inventory [<http://mosquito-taxonomic-inventory.info/>]. Acesso em: 23 out. 2020.

Höfte H, Whiteley HR (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol Rev. 53:242–255

Ibarra, J.E., Rincón, C.M., Ordúz, S., Noriega, D., Benintende, G., Monnerat, R. Regis, L., Oliveira, MFC., Lanz, H., Rodriguez, HM., Sánchez, J., Peña, G. Bravo, A. (2003) Diversity of *Bacillus thuringiensis* Strains from Latin America with insecticidal activity

against different mosquito species. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, Sept, v. 69, n. 9, p. 5269-5274.

Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. Monitoramento Brasil. [<https://clima1.cptec.inpe.br/monitoramentobrasil/pt>]. Acesso em: 20 out. 2020.

Jolliffe, I.T. *Principal component analysis*. New York: Springer-Verlag, 1986.

Jouzani, GS., Valijanani, E., Sharafi, R. (2017) *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tiding. *Appl Microbiol Biotechnol*.

Karch, S. (1987). Effet des conditions de stockage sur la relation viabilité des spores – toxicité des poudres primaires de *Bacillus sphaericus* et de *B. thuringiensis* H-14. *Ent. méd. et Parasitol.* p. 11-15.

Karimi, B., Dequieedt, S., Terrat, S., Jolivet, C., Arrouays, D., Wincker, P., Cruaud, C., Bispo, A., Bouré-Prévost, N.C., Ranjard, L. (2019) Biogeography of Soil Bacterial Networks along a Gradient of Cropping Intensity. *Scientific Reports*.

Kassambara, A.; Mundt, F. (2020). *factoextra*: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses. R package version 1.0.7.

Kuzyakov, Y. Blagodatskaya, E. (2015) Microbial hotspots and hot moments in soil: Concept & review. *Soil Biology & Biochemistry*. 184-199

Lê, S.; Josse, J.; Husson, F. (2008) “FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis.” *Journal of Statistical Software*, 25(1), 1–18. ISSN 1548-7660.

Lima-Camara, TN. (2016) Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública no Brasil. *Revista de Saúde Pública*. p.50.

Lobo, KS., Soares-da-Silva, J., Silva, MA., Tadei, WP., Polanczyk, RA., Pinheiro, VC., (2018) Isolation and molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* found in soils of the Cerrado region of Brazil, and their toxicity to *Aedes aegypti* larvae. *Revista Brasileira de Entomologia*. 5-12.

Martin PAW, Travers RS (1989) Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl Environ Microbiol* 55:2437–2442

Matos, ER., Durrer, A., Andreote, F.D., (2016) *Ecologia Microbiana*. In: *Microbiologia do Solo*. Cardoso, EJBN. Andreote, F. D. Piracicaba. Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz. Chapter: 3. 2 ed.

Mauro, GM., Hamdy, M., Vanoli, G.P., Bianco, N., Hensen, JLM (2015). A new methodology for investigating the cost-optimality of energy retrofitting a building category. *Energy and Buildings*. v. 107. p.456-478.

Michel, M. H.; Willams, M. (2012). Soil Type Modestly Imacts Bcaterial Community Sucession Associated with Decomposing Grass Detrituspheres. *Soil Science Society of America Journal*.

Ministério do Meio Ambiente (2020) [<https://www.gov.br/mma/pt-br>]. Acesso em: 20 out. 2020

Mishra, K.P., Bish, C.S., Ruwari, P., Subbanna, S.N.R.A., Bisht, K.B., Bhatt, C.J., Gupta, S.H. (2017). Genetic diversity and functional characterization of endophytic *Bacillus thuringiensis* isolates from the North Western Indian Himalayas. *Ann. Microbiology*. v. 67. p. 143-155.

Moreira, FMS., Siqueira, J.O. (2006) *Microbiologia e bioquímica do solo*. Lavras: UFLA, p. 625.

Moreira, IM. (2018) Avaliação da suscetibilidade de populações de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) do Distrito Federal à inseticidas e seu controle de qualidade químico. Brasília. Universidade de Brasília.

Maeda, M.; Mizuki, E.; Hara, M.; Tanaka, R.; Akao, T.; Yamashita, S.; Ohba, M. (2001) Isolation of *Bacillus thuringiensis* from intertidal brackish sediments in mangroves. *Microbiological Research*, v. 156, n. 2, p. 195-198.

Nottingham, A. (2018) Microbes follow Humboldt: temperature drives plant and soil microbial diversity patterns from the Amazon to the Andes. *Ecological Society of America*. Pp. 2455-2466.

Organização Mundial da Saúde (1985). Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* a microbial larvicide. Geneva.

Osaki, F. Calagem e adubação. Campinas: Instituto Brasileiro de Ensino Agrícola, 1991. 503.

Patil, CD., Patil, SV., Salunke, BK., Salunke, RB. (2012) Insecticidal potency of bacterial species *Bacillus thuringiensis* SV2 and *Serratia nematodiphila* SV6 against larvae of mosquito species *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi*, and *Culex quinquefasciatus*.

Pinheiro, V. C. S. Controle do Dengue em Manaus-AM: Estudo da positividade/produtividade larvária, viabilidade dos ovos e investigação por RT-PCR dos sorotipos do vírus dengue em *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). (2005). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade da Amazônia, Manaus, Amazonas.

Pinto LMN, Berlitz DL, Raquel CF, Fiuza LM (2009) Toxinas de *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol. Ciênc. Desenvolvimento* (Online) 38:24–31

Polanczyk, RA (2004) Estudos de *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1911 visando o controle de *Spodoptera frugiperda* J.E.SMITH, 1797. Piracicaba, São Paulo. Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz.

Prasertphon S., Areekul P., Tanada Y. (1973) Sporulation of *Bacillus thuringiensis* in cadavers. *J Invertebr Pathol* v. 21. p.205–207.

Prezotti, LC; M. Guarçoni, A. (2013) Guia de interpretação de análise de solo e folha. Instituto capixaba de Pesquisa, assistência Técnica e Extensão Rural. Vitória, Espírito Santo.

Pruszyński, C.; Hribar, L.J.; Mielke, R.; Leal, A. A large scale biorational approach using *Bacillus thuringiensis israeliensis* (Strain AM65-52) for Managing *Aedes aegypti* populations to prevent Dengue, Chikungunya, Zika Transmission (2017). Plos one. p.1-17.

R core team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Rabinovitch, L., Vivoni, AM., Machado, V., Knaak, N., Berlitz, DL., Polanczyk, RA., Fiuza, LM. (2017) *Bacillus thuringiensis* Characterization: Morphology, Physiology,

Rampersad, J., Ammons, DA (2005) *Bacillus thuringiensis* isolation method utilizing a novel stain, low selection and high throughput produced atypical results. BMC Microbiology, Sep, v. 5, n. 52, p. 1-11.

Raymond, B. (2017) The Biology, Ecology and Taxonomy of *Bacillus thuringiensis* and Related Bacteria. In: *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus* Characterization and use in the field of biocontrol. Fiuza, LM, Polanczyk, RA., Crickmore, N. Springer Nature. Chapter 2.

Ronquim, CC. (2010) Conceitos de fertilidade do solo e manejo adequado para as regiões tropicais. Embrapa Monitoramento por Satélite. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. Campinas, São Paulo.

Rampersad, J.; Ammons, D.A. (2005) *Bacillus thuringiensis* isolation method utilizing a novel stain, low selection and high throughput produced atypical results. BMC Microbiology, Sep, v. 5, n. 52, p. 1-11.

Sano, EE., Rodrigues, AA., Martins, ES., Bettiol, GM., Bustamante, MMC., Bezerra, AS. et al. (2019). Cerrado ecoregions: A spatial framework to assess and prioritize Brazilian savanna environmental diversity for conservation. Journal of Environmental Management. v. 232. p. 818-828.

Santos, F.P., Lopes, J., Vilas-Bôas, G.T., Zequi, J.A.C. (2011). Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates with potential for control of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). Acta Tropica.v. 122, p. 64-70.

Soares-da-Silva, J., Pinheiro, V.C.S., Litaiff-Abreu, E., Polanczyk, R.A., Tadei, W.P., (2015). Isolation of *Bacillus thuringiensis* from the state of Amazonas, in Brazil, and screening against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). Rev. Bras. Entomol. 59,1-6.

Stefanov, YM., Iliev, IZ., Marhova, M. Kostadinova, S. (2018) Isolation and Purification of Proteolytic Enzymes, Produced by Strains of Genus *Bacillus*. Ecologia Balkanica. v.10, p.185-197.

Suzuki MT, Lereclus D, Arantes OMN (2004) Fate of *Bacillus thuringiensis* strains in different insect larvae. Can J Microbiol v.50. p.973-975

Smith, R.A.;. (1991) The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. Applied and Environmental Microbiology, jan v. 57, n. 1, p. 311-315.

Teixeira, P. C.; Donagemma, G. K.; Fontana, A.; Teixeira, W. G. Manual de métodos de análise de solo. 3. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2017. 574 p.

Tezza-Netto, MPD., Faria, G.J.A., Ribeiro, AR., Ribeiro, FS., Leite, CR., Silva, R.R., (2019). Óxidos e óxi-sulfatos como fontes de micronutrientes na construção da fertilidade de solo de cerrado. *Journal of Bioenergy and Food Science*. v.6 (4). p.109-118.

Tsai, SM; Rossetto, R. (1992). Transformações microbianas do fósforo *In: Microbiologia do Solo*. Cardoso, EJBN.; Neves, CM. Chapter 17.

Venables, W. N. & Ripley, B. D. (2002) *Modern Applied Statistics with S*. Fourth Edition. Springer, New York.

Vieira-Neta, MRA., Soares-da-Silva, J., Viana, JL., Silva, MC., Tadei, WP., Pinheiro, VCS. (2020). Strain of *Bacillus thuringiensis* from Restinga, toxic to *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus) (Diptera, Culicidae). *Brazilian Journal of Biology*. p.1-9.

Voroney, R. P.; Heck, R.J. (2015) *The Soil Habitat*. Chapter in: *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*. Paul, E. Fourth edition. Elsevier.

West, AS., Griffin, AS., Gardner A. (2007) Evolutionary explanations for cooperation. *Curr Biol* v.17.

Yara, K., Kunimi Y., Iwahana H. (1997) Comparative studies of growth characteristic and competitive ability in *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in soil. *Appl Entomol Zool*. v.32. p.625–634

Zhou, X., Yang, Z., Liu, H., Lu, X. Hao, J. (2018) Effect of Soil Organic Matter on Adsorption and Insecticidal Activity of Toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Pedosphere*. v.28. p. 341-349.

Who. World Health Organization . Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides world health organization communicable disease control, prevention and eradication who pesticide. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13. 2005

Zogo, B.; Tchiekoi, B. N. C.; Koffi, A. A.; Dahounto, A.; Alou, P. A.; Dabiré, r. K.; Moussa, I. B.; Moiroux, N.; PENNETIER, C. (2019) Impact of sunlight exposure on the residual efficacy of biolarvicides *Bacillus thuringiensis israelensis* and *Bacillus sphaericus* against the main malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Malaria journal*, v. 18, n. 1, p. 55.

Costa, J. R. V.; Rossi, J. R.; Marucci, S. C.; Alves, E. C. C.; Volpe, H. X. L.; Ferraudo, S. S.; Lemos, M. V. F.; Desidério, J. (2010) Atividade tóxica de isolados de *Bacillus thuringiensis* a larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Neotropical Entomology*. Londrina, set./out, v. 39, n. 5, p. 757-766.

