

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E  
BIOLOGIA MOLECULAR



**MAIS DO QUE APENAS UM MATADOR DE INSETOS: AS ATIVIDADES NÃO  
INSETICIDAS DE *Bacillus thuringiensis* COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO**

**NAIANE OLIVEIRA SANTOS**

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL  
Dezembro de 2019**

**NAIANE OLIVEIRA SANTOS**

**MAIS DO QUE APENAS UM MATADOR DE INSETOS: AS ATIVIDADES NÃO  
INSETICIDAS DE *Bacillus thuringiensis* COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular - Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Linha de pesquisa: Genética Molecular e de Micro-organismos

Orientador: Dr. Leandro Lopes Loguercio  
Coorientador: Dr. Valter Cruz Magalhães

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL**

**Dezembro de 2019**

S237 Santos, Naiane Oliveira.  
Mais do que apenas um matador de insetos: as atividades não inseticidas de *Bacillus thuringiensis* com potencial biotecnológico / Naiane Oliveira Santos.  
– Ilhéus, BA: UESC, 2019.  
iii, 48 f : il.

Orientador: Leandro Lopes Loguercio.  
Dissertação (mestrado) –Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.

Referências: f. 35-43.

1. Genética molecular. 2. Biotecnologia. 3. *Bacillus* (Bactéria). 4. *Bacillus thuringiensis*. I. Título.

CDD 572.8

## **DEDICO**

À Deus por permitir a minha existência e por tornar possível a realização desta fase em minha vida. Aos meus pais, Nailton e Jocélia, meus grandes companheiros e exemplos de determinação.

## **OFEREÇO**

A minha família, por acreditar e confiar nos meus projetos, por incentivar os meus sonhos e torcerem pelo meu sucesso.

A todos os meus professores, por participarem da minha construção humana, por proporcionarem conhecimento, incentivar o bem, valores éticos e morais e contribuir com a minha formação.

Aos meus amigos, por compartilharem experiências ensinamentos, conselhos e companheirismos.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Jocélia e Nailton, que trabalham junto para tornar possível a realização dos meus sonhos. Por todo cuidado, carinho e proteção. Por orientar o meu caminho, confiar nos meus projetos e permitirem o meu crescimento com muito amor;

A minha Irmã Natalia, pelos conselhos, cuidado, orações e força concedida em todos os momentos vividos até aqui;

Aos meus avós José, Maria, Pedro e Noeme que juntos incentivaram os meus sonhos, trabalharam para que esse momento se tornasse real e por terem proporcionado amor e sabedoria a minha vida;

Ao meu namorado William pelo companheirismo, por participar de todos os momentos de dificuldades, alegrias e conquistas em minha vida. Por acreditar na realização dos meus sonhos, me aconselhar e confiar em mim;

Aos meus queridos amigos (as) Ronilma, Tiago e Jacqueline por todo o suporte, conselhos, cuidado e conhecimento compartilhado nesta trajetória;

Aos membros do grupo de pesquisa Hologeandro Lorena, Dalma, Pândila, Jhoselyn, Juan e César por todo o conhecimento compartilhado, pelos incentivos, contribuições e acolhimento;

Aos Professores: Dr. Leandro Lopes Loguercio e Dr. Vallter Cruz Magalhães pelas orientações e confiança no meu trabalho e por permitirem a oportunidade de realizar o curso de mestrado;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado;

À Universidade Estadual de Santa Cruz e ao programa de pós-graduação de Genética e Biologia Molecular pela oportunidade do mestrado;

Ao NBCGIB, pelas instalações e suporte técnico para a pesquisa;

A todas as pessoas que participaram de cada momento durante o mestrado.

Muito obrigada!

*"O sucesso nasce do querer, da determinação  
e persistência em se chegar a um objetivo.  
Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e  
vence obstáculos, no mínimo fará coisas  
admiráveis."*

José de Alencar (1829 - 1877)

## ÍNDICE

|                                                 |     |
|-------------------------------------------------|-----|
| RESUMO.....                                     | ii  |
| ABSTRACT .....                                  | iii |
| 1. INTRODUÇÃO .....                             | 1   |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....                   | 4   |
| 2.1 Biologia e ecologia dos microrganismos..... | 4   |
| 2.2 <i>Bacillus spp</i> .....                   | 5   |
| 2.3 <i>Bacillus thuringiensis</i> .....         | 7   |
| 2.4 Revisão Sistemática.....                    | 10  |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS .....                    | 12  |
| 3.1 Compilação e análise dos dados .....        | 18  |
| 4. RESULTADOS.....                              | 19  |
| 5. DISCUSSÃO.....                               | 27  |
| 6. CONCLUSÕES.....                              | 34  |
| 7. REFERÊNCIAS .....                            | 35  |
| MATERIAL SUPLEMENTAR.....                       | 44  |

## RESUMO

OLIVEIRA-SANTOS, Naiane, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Dezembro de 2019. Mais do que apenas um matador de insetos: as atividades não inseticidas de *Bacillus thuringiensis* com potencial biotecnológico. Orientador: Prof. Dr. Leandro Lopes Loguercio. Coorientador: Dr. Valter Cruz Magalhães.

*Bacillus thuringiensis* (*Bt*) é conhecido há muito tempo pelo biocontrole de importantes insetos-praga, mas os avanços científicos revelaram várias características além de sua atividade clássica como bioinseticida. Para investigar o *status* atual do conhecimento dessas atividades não inseticidas, foi realizada uma revisão sistemática sobre atividades alternativas de *Bt* com potencial biotecnológico, abordando tecnologias em desenvolvimento e tendências de aplicabilidade. Nosso protocolo de revisão estabeleceu um banco de dados de 128 artigos selecionados para coleta de dados. Encontramos 13 atividades não-inseticidas de *Bt* com potencial biotecnológico em estudos conduzidos em 32 países. As publicações relacionadas as atividades foram encontradas desde 1971, aumentando sua frequência a partir de 2001. Medidas de efeitos qualitativas foram encontradas em nove dessas atividades, com uma média de 38 cepas distintas de *Bt* por atividade. Cerca de 87% de todos os experimentos/testes identificados lidam com efeitos diretos de *Bt* nas células/organismos alvo, com metade dessas cepas estudadas para ação antibacteriana. Dos alvos microbianos testados, 92% eram bactérias, o que levou a 77% das condições experimentais serem *in vitro*. Em relação às atividades indiretas de *Bt*, 55% dos estudos relataram interações tri-tróficas de '*Bt*-planta-patógeno'. A bio/fitorremediação também apareceu como uma atividade relevante sendo investigada. As atividades alternativas de *Bt* estudadas até o momento oferecem formas de desenvolvimento de biotecnologias úteis para diferentes áreas de interesse antrópico, com cepas *Bt* multifuncionais sendo especialmente vantajosas sob uma perspectiva de bioeconomia. Os compostos bioativos de *Bt* mostraram um potencial notável tanto para a produção de drogas para combater patógenos humanos multirresistentes quanto para o uso em estratégias de remediação para ambientes poluídos/degradados. Nossos achados foram discutidos em termos de melhoria da saúde humana, agricultura sustentável e prevenção de novas perdas de biodiversidade e serviços ecossistêmicos, todos relacionados à qualidade de vida no planeta.

**Palavras-chave:** *Bacillus spp*; biotecnologia; PGPR; endofítico; diversidade microbiana; patógeno ambiental.

## ABSTRACT

OLIVEIRA-SANTOS, Naiane, M.S., State University of Santa Cruz, Ilhéus, December 2019. More than just an insect killer: the non-insecticidal activities of *Bacillus thuringiensis* with biotechnological potential. Advisor: Prof. Dr. Leandro Lopes Loguercio. Co-supervisor: Dr. Valter Cruz Magalhães.

*Bacillus thuringiensis* (*Bt*) has been known for a long time for the biocontrol of important pest insects, but scientific advances have revealed several characteristics in addition to its classic bioinsecticide activity. To investigate the current status of knowledge of these non-insecticidal activities, a systematic review was carried out on alternative *Bt* activities with biotechnological potential, addressing developing technologies and applicability trends. Our review protocol established a database of 128 articles selected for data collection. We found 13 non-insecticidal *Bt* activities with biotechnological potential in studies conducted in 32 countries. Publications related to activities have been found since 1971, increasing their frequency since 2001. Measures of qualitative effects were found in nine of these activities, with an average of 38 distinct *Bt* strains per activity. Approximately 87% of all identified experiments / tests deal with direct effects of *Bt* on target cells / organisms, with half of these strains studied for antibacterial action. Of the microbial targets tested, 92% were bacteria, which led to 77% of the experimental conditions being *in vitro*. Regarding the indirect activities of *Bt*, 55% of the studies reported tri-trophic interactions of '*Bt*-plant-pathogen'. Bio / phytoremediation also appeared as a relevant activity being investigated. The alternative *Bt* activities studied so far offer ways of developing biotechnologies useful for different areas of anthropic interest, with multifunctional *Bt* strains being especially advantageous from a bioeconomic perspective. The bioactive compounds of *Bt* showed a remarkable potential both for the production of drugs to combat multidrug-resistant human pathogens and for use in remediation strategies for polluted / degraded environments. Our findings were discussed in terms of improving human health, sustainable agriculture and preventing new losses of biodiversity and ecosystem services, all related to the quality of life on the planet.

**Key-words:** *Bacillus spp*; biotechnology; PGPR; endophyte; microbial diversity; environmental pathogen

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização dos microrganismos tem se intensificado em vários aspectos relacionados a sobrevivência da humanidade. Desde que foram descobertos, os mesmos são empregados para diversas finalidades e representam importantes fontes biotecnológicas aplicáveis. Nas áreas da saúde, agricultura e meio ambiente, por exemplo, verifica-se a utilidade dos microrganismos na fabricação de alimentos (REZAC et al., 2018), produção de medicamentos (FAUSTINO et al., 2016), plantas transgênicas (ALI; PARK; KIM, 2018), biopesticidas e fertilizantes (PÉREZ-GARCÍA; ROMERO; DE VICENTE, 2011), assim também como em processos de descontaminação de áreas degradadas por poluentes (EREQAT et al., 2018), produção de biocombustíveis (MAJIDIAN; TABATABAEI; ZEINOLABEDINI, 2017), fabricação de polímeros industriais (ATES, 2015) entre outras aplicações.

Com o crescimento da população mundial houve um aumento do fluxo de migração em várias regiões do mundo (LEE, 2011). Este aumento impulsionou diversas atividades relacionadas a indústrias, mineração, agricultura, pecuária e comercialização de espécies exóticas de animais e plantas (SARWAR et al., 2017). Essas atividades representam fatores que afetam principalmente a preservação dos ecossistemas, por estarem inteiramente relacionadas com o surgimento de epidemias, patógenos resistentes, áreas desmatadas, contaminadas e degradadas (DVM et al., 2017). Consequentemente, todas essas atividades antrópicas também têm gerado alterações ambientais que oferecem riscos à sociedade global por causarem a perda de recursos naturais e a extinção da biodiversidade (ARORA, 2018). Assim, formas alternativas que oferecem menos riscos à saúde humana e que são importantes para a redução de prejuízos ambientais têm ganhado destaque e conquistado resultados promissores como recurso biotecnológico (EZEONU et al., 2012). Entre essas alternativas, podemos encontrar a utilização de microrganismos como as bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* que são consideradas de grande relevância industrial principalmente dentro do campo da saúde (LEE et al., 2017), agricultura (JASIM et al., 2015; HASHEM et al., 2019) e meio ambiente (BABU; KIM; OH, 2013).

Um dos membros mais bem estudados pertencente ao grupo de *Bacillus* tratam-se de cepas de *B. thuringiensis* (EHLING-SCHULZ; LERECLUS; KOEHLER, 2019). Um bioinseticida amplamente conhecido pela sua especificidade em controle

de pragas agrícolas de grande interesse econômico no mundo (JOUZANI, 2017). Essas bactérias são bastonetes gram-positivas pertencentes ao grupo *Bacillus cereus sensu lato*. Possuem tamanho aproximado de 1,0 a 1,2 µm de largura por 3,0 a 5,0 µm de comprimento. A característica definidora que distingue *Bt* de todos os outros membros do grupo trata-se da capacidade de produzir cristais proteicos durante a esporulação (SANAHUJA et al., 2011). Esses cristais proteicos, intracelulares, conferem ao *Bt* potencial atividade entomopatogênica para um grande número de larvas de insetos (PALMA et al., 2014). Tal característica permitiu a essas bactérias se tornarem um dos pesticidas utilizados em larga escala no mundo desde sua primeira aplicação como mecanismo de biocontrole em 1938 (HELGASON et al., 2000).

Estudos recentes têm demonstrado que diferentes cepas de *Bt* podem servir para outras finalidades como papel essencial na bio/fitorremediação de áreas contaminadas por metais pesados (BABU; KIM; OH, 2013) promoção de crescimento em plantas (SCHWINGHAMER et al., 2015; CUI et al., 2017; KHAN; BANO, 2018), criação de plantas transgênicas (VINCENT; DENIS, 2008) produção de compostos bioativos (ZHENG et al., 2018) atividade de controle biológico de fitopatógenos (ZHANG et al., 2016), ação anticancerígena (MOAZAMIAN et al., 2018) entre outras potencialidades que podem ser explorados em diversos setores industriais (FERNÁNDEZ-CHAPA; RAMÍREZ-VILLALOBOS; GALÁN-WONG, [s.d.]; JOUZANI, 2017).

Neste sentido, devido a aspectos relacionados a custos de registro de bioprodutos e de abrangência de mercado e utilidades (ex. BERG et al., 2013 ; CHOJNACKA; ACCESS, 2015), além da perspectiva de transição para um mundo da bioeconomia (BUGGE; HANSEN; KLITKOU, 2016; VALLI; RUSSO; BOLZANI, 2018), pode-se considerar como vantajoso para um produto biotecnológico ser multifuncional. Assim, as diversas funcionalidades alternativas de *Bt* têm alto potencial de agregação de valor aos potenciais bioprodutos derivados desta bactéria (JOUZANI, 2017).

Diante disto, apresentamos aqui uma RS que tem como objetivos (i) realizar um levantamento bibliográfico sobre atividades de *Bacillus thuringiensis* com potenciais aplicações biotecnológicas para além do seu efeito inseticida; (ii) sistematizar quanti- e qualitativamente as abordagens e biotecnologias não-inseticidas em

desenvolvimento a partir do uso de *Bt*; (iii) verificar quais são as áreas de conhecimento que tendem a ter aplicações biotecnológicas não-inseticidas de *Bt*; e (iv) analisar as medidas e os métodos de avaliação dos efeitos sob investigação, discutindo lacunas e direcionamentos futuros de pesquisa nesta vertente promissora de bioeconomia.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Biologia e ecologia dos microrganismos**

Os microrganismos são conhecidos a mais de 3,5 milhões de anos e representam um grupo amplo de seres vivos identificados como os primeiros colonizadores da terra (CAVICCHIOLI et al., [s.d.]; KUMAR; CHORDIA, 2017). Eles são seres unicelulares microscópicos que podem ser encontrados dentro dos grupos das unidades taxonômicas de bactérias, fungos, algas, protozoários e vírus (TORTORA, 2012). Ao longo do tempo, os microrganismos evoluíram para todos os nichos existentes do planeta, remodelaram os oceanos e a atmosfera e deram origem a condições propícias aos seres multicelulares (CAVICCHIOLI et al., [s.d.]). Até o momento, inúmeras espécies já foram descritas e identificadas em diferentes regiões do mundo incluindo locais onde as condições ambientais são extremas e não são toleradas por muitos animais e plantas (DONATO et al., [s.d.]). A ecologia dos microrganismos é bastante curiosa e surpreendente. Diferentes espécies apresentam a capacidade de sobreviver em ambientes com baixa concentração de oxigênio (MORRIS; SCHMIDT, 2013), pouca disponibilidade de água (WIERZCHOS; RÍOS; ASCASO, 2012), elevados níveis de temperatura, temperaturas frias, salinidade e pressão (SYLVAN; ROBADOR, 2015), além de locais com presença de acidez ou alcalinidade (MERINO et al., 2019; POLI et al., 2019; ZAMITH et al., 2019). O seu potencial de adaptação permite que os mesmos possam também crescer na presença de resíduos tóxicos, solventes orgânicos, metais pesados ou em vários outros habitats que antes eram considerados inóspitos por qualquer forma de vida (RAMPELOTTO 2013; BLAMEY, 2015; CAVICCHIOLI et al., [s.d.])

Os microrganismos possuem características morfológicas consideradas relativamente simples e apresentam grande diversidade genética e metabólica (MOSTAFIZ, 2012). Eles são capazes de produzir e consumir inúmeros compostos, incluindo hidratos de carbono complexos, peptídeos e lipídios, que podem ser úteis para sua própria “alimentação” e exploração de nichos altamente específicos com diferentes estratégias de vida (DOMBROWSKI; TESKE; BAKER, 2018).

As comunidades microbianas têm um papel fundamental na ciclagem de nutrientes essenciais para outras vidas no planeta (STARK, 2010). Através de

processos biogeoquímicos eles disponibilizam oxigênio, carbono, nitrogênio e enxofre que atuam em benefício da saúde animal e vegetal contribuindo com o desenvolvimento da agricultura, manutenção dos ecossistemas e da cadeia alimentar global (CAVICCHIOLI et al., [s.d.]).

Além de sua relevância ecológica e ambiental, os microrganismos também representam importantes fontes biotecnológicas aplicáveis que podem ser utilizadas em diversas áreas industriais incluindo aquelas associadas a nutrição, agricultura e saúde (SINGH; KUMAR, 2017). Suas aplicações são reconhecidas no mundo todo (BHOWMIK; PATIL, 2018) e elas se destacam por oferecer mecanismos mais eficientes para produzir bens e serviços a humanidade com produções de baixo custo, menos impacto ambiental e desenvolvimento econômico de forma sustentável (BLAMEY, 2015; VITORINO; BESSA, 2017).

Os microrganismos podem exibir uma grande variedade de capacidades metabólicas de particular interesse para o desenvolvimento da biotecnologia, e devido a isso, eles representam importantes fontes biológicas utilizadas para diversas finalidades industriais (VITORINO; BESSA, 2017). Com os avanços científicos nos campos da biologia molecular e da engenharia genética os mesmos passaram a ser projetados para a superprodução de alimentos fermentados tradicionais (REZAC et al., 2018), medicamentos (FAUSTINO et al., 2016), polímeros industriais (ATES, 2015), biocombustíveis (MAJIDIAN; TABATABAEI; ZEINOLABEDINI, 2017), pesticidas (ABD-ELGAWAD; ASKARY, 2018), fertilizantes (STAMENKOVIĆ et al., 2018) e várias outras tecnologias de bioprocessos. Essas aplicações são consideradas de suma importância para as indústrias, uma vez que, utilizam de materiais biológicos economicamente mais acessíveis e abundantes, e que de modo geral, apresentam contribuições com o meio ambiente por não produzirem resíduos tóxicos (ID; ID; DOEBELI, 2019; VITORINO; BESSA, 2017).

Diferentes espécies microbianas já foram relatadas como potenciais meio de produção biotecnológicas em larga escala industrial. Um dos grandes exemplares altamente explorados dentro das indústrias alimentícias, farmacêutica e agricultura são algumas espécies do gênero *Bacillus*.

## **2.2 *Bacillus spp***

O gênero *Bacillus* contempla espécies de bactérias gram-positivas aeróbicas ou anaeróbicas facultativas (CIHAN et al., 2012). Seus representantes possuem células em formato de bastonetes que produzem endósporos capazes de resistir as condições ambientais extremas como calor, radiação e tratamentos químicos (SONI et al., 2016). As células de *Bacillus* podem ocorrer isoladamente, em pares, ou em cadeias (que podem ser de grande comprimento) e como filamentos (VOS; LEDEGANCKSTRAAT; B-, 2015). Suas espécies são amplamente distribuídas na natureza e incluem bactérias termofílicas, psicofílicas, acidofílicas, alcalofílicas e halofílicas que utilizam uma ampla gama de fontes de carbono para crescer heterotrófica ou autotroficamente (CIHAN et al. 2012). Com exceção de algumas espécies como *B. anthracis* e *B. thuringiensis*, a maioria dos membros pertencente aa este gênero tem pouco ou nenhum potencial patogênico e raramente estão associados a doenças em humanos ou outros animais (VOS; LEDEGANCKSTRAAT; B-, 2015).

*Bacillus* é um dos gêneros microbianos mais populares na biotecnologia industrial (SINGH; KUMAR, 2017). Estes microrganismos são considerados promissores candidatos a ser explorados em inovações associadas a produção de energia sustentável, polímeros ecologicamente corretos à base de combustível não fóssil e moléculas bioativas para uso terapêutico (KUMAR et al., 2013). Alguns de seus representantes são úteis para a produção de espécies transgênicas e ao apresentarem interações com espécies vegetais nas condições de endofíticos ou rizobactérias podem atuar em promoção de crescimento e indução de resistência sistêmica em plantas. Além disso, diferentes microrganismos possuem papel essencial para o desenvolvimento das plantas ao atuarem na regulação do metabolismo intracelular de fitohormônios processos de solubilização de fosfato do solo, fixação de nitrogênio e produção de sideróforos (HASHEM et al., 2019). Entre as principais cepas bacterianas que realizam esses mecanismos encontram-se *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus clausii*, *Brevibacillus brevis*, *Bacillus megareium* e *Bacillus thuringiensis* (BUNK et al., 2010; FAN et al., 2017; SINGH; PATEL; KALIA, 2009).

*B. subtilis* (LEE et al., 2017) se destacam como produtoras de compostos bioativos como bacteriocinas (JOSEPH, 2013), lipopeptídeos (JHA; JOSHI; GEETHA, 2016), antibióticos (MALANICHEVA et al., 2014) e enzimas (WU et al., 2019) com

potencial farmacológico (RADHAKRISHNAN; HASHEM; ABD ALLAH, 2017; SHAFI; TIAN; JI, 2017). Outras espécies como *B. amyloliquefaciens* e *B. thuringiensis* também podem ser úteis por produzirem metabólitos secundários com atividades antifúngicas (DJENANE et al., 2017; LEE, 2011), antibacterianas (DAAS et al., 2018; KURATA et al., 2019), entre outras aplicações (SHAFI; TIAN; JI, 2017).

Espécies de *Bacillus* podem apresentar inclusões de natureza protéica chamadas de corpos paraesporais ou cristais de proteínas cujas morfologias variam. As proteínas endotoxinas Cry e Cyt são atualmente as mais conhecidas biomoléculas de origem microbiana nesse gênero e que possuem aplicação biotecnológica voltada para a agricultura (VITORINO; BESSA, 2017). Essas proteínas são sintetizadas pela bactéria do solo *B. thuringiensis* e têm uma ação entomopatogênica específica contra pragas de milho, algodão, batata, arroz, soja entre muitas outras culturas (SARWAR et al., 2017; XIAO; WU, 2019).

Recentemente, pesquisas tem apontado o potencial de *Bt* para além do seu efeito inseticida (JOUZANI, 2017). Diversos metabólitos produzidos por estas bactérias já foram testados e oferecem condições para atuar no biocontrole de fitopatógenos, produção de plantas transgênicas resistentes a estresses bióticos e abióticos, promoção de crescimento em plantas e atividades específicas que podem contribuir com o desenvolvimento industrial em áreas como medicina e meio ambiente (FERNÁNDEZ-CHAPA; RAMÍREZ-VILLALOBOS; GALÁN-WONG, [s.d.]).

### **2.3 *Bacillus thuringiensis***

*Bt* é um bastonete gram-positivo pertencente à família *Bacillaceae*, que abrange a maioria das espécies formadoras de esporos (DAAS et al., 2018). Por mais de seis décadas tornou-se amplamente conhecida devido a sua capacidade de controlar uma grande variedade de insetos importantes para a agricultura e a saúde pública (FERNÁNDEZ-CHAPA; RAMÍREZ-VILLALOBOS; GALÁN-WONG, [s.d.]; BRAVO et al., 2011; MOAZAMIAN et al., 2018; PALMA et al., 2014). Cepas de desta bactéria já foram isoladas de várias regiões do mundo, sobrevivendo em uma ampla gama de ecossistemas, incluindo solo, água, ar, superfície e interior de diversas plantas, insetos mortos (ARGÔLO-FILHO et al., 2014), fezes de animais (incluindo mamíferos insetívoros) e em tecidos humanos com necrose grave (PALMA et al., 2014). A

principal característica das cepas é a presença de uma diversidade de cristais de proteínas intracelulares e outras proteotoxinas secretadas em sobrenadantes da cultura, a maioria delas com alta especificidade entomocida para o controle biológico de pragas de lepidópteros, dípteros e coleópteros, importantes para várias culturas de interesse econômico (ex. BRAVO et al., 2011; GOMES et al., 2011; LOGUERCIO et al., 2001, 2002; PALMA et al., 2014).

Atualmente, foram caracterizadas cerca de 78 famílias de genes *Cry* (CRICKMORE et al. 2018), a maioria codificando os cristais de proteína inseticida parasporal, com 770 genes diferentes, três famílias *Cyt* com 38 genes (NAIR et al., 2018), e cerca de 138 genes *Vip* (JOUZANI, 2017), sendo as últimas duas classes correspondendo às proteotoxinas secretadas nos sobrenadantes.

Nas últimas décadas, com o desenvolvimento das ciências ômicas, os estudos do genoma em vários isolados e cepas de *Bt* tem apresentado, outras potencialidades e funcionalidades para esta espécie bacteriana, com novas ideias para a sua utilização (JOUZANI, 2017; PALMA et al., 2014), de modo que o espectro de suas aplicações aumentou e não está mais limitado à sua função tradicional de bioinseticida (SAUKA, 2017). Alguns genes e toxinas recém descobertos estão sendo avaliados e podem ter novas propriedades biológicas, sugerindo uma natureza pluripotencial de *Bt* com diferentes especificidades (FERNÁNDEZ-CHAPA; RAMÍREZ-VILLALOBOS; GALÁN-WONG, 2019; JOUZANI, 2017; ZHENG et al., 2018).

A tecnologias de sequenciamento de última geração (NGS) entre outras ferramentas ampliaram os conhecimentos sobre várias informações atreladas a biologia de *Bt*. O número estimado até o momento sobre genes que já foram estudados em diferentes cepas aproxima-se de 5.343-7.227, e o número de plasmídeos varia entre 1 e 13 (JOUZANI, 2017). Esses dados possibilitam uma maior exploração de propriedades específicas de *Bt*, e neste sentido, acredita-se que novos genes de toxinas possam ser encontrados e identificados em diferentes cepas com potencial de realizar atividades bioativas bem como outras funcionalidades que possam ser utilizadas para diferentes aplicações biotecnológicas.

As proteínas parasporinas são uma das toxinas de *Bt* recém investigadas quanto a sua propriedade farmacológica. Elas são um grupo heterogêneo de proteínas *Cry* produzidas por cepas de *Bt* que apresentam atividade citotóxica para grupos de diferentes tecidos humanos (ABOUL-SOUD et al. 2019). Alguns dessas proteínas

como Cry31A, Cry41A, Cry45A, Cry46A, Cry63A e Cry64A já foram utilizadas em experimentos *in vitro* contra diferentes células cancerígenas e estas biomoléculas foram promissoras em atividade anticâncer quando tratadas na presença de proteases (PALMA et al., 2014; PERIYASAMY et al., 2016). A Parasporin-2Aa1 é um dos exemplos de toxinas de *Bt* já identificadas e utilizadas em atividade anticâncer especificamente contra células cancerígenas do endométrio, do fígado, do colo do útero, da mama e da próstata (BRASSEUR et al., 2015).

As proteínas Cry também já foram estudadas quanto ao seu potencial para o controle biológico de espécies de nematoides. Entre os peptídeos de *Bt* documentados até o momento sobre essas características encontram-se Cry5, Cry6, Cry12, Cry13, Cry14, Cry21, e Cry55 que podem ser explorados para o controle biológico de diferentes espécies de nematódeos incluindo aquelas consideradas pragas agrícolas (JOUZANI, 2017).

Algumas cepas de *Bt* podem ser encontradas na natureza como endofíticos e rizobactérias atuando em diferentes benefícios para as plantas ao permitir a produção de sideróforos, solubilização de fosfato, fixação de nitrogênio, síntese de fitohormônio, etc (EGAMBERDIEVA et al., 2017; JIANG et al., 2015). Através desses mecanismos, cepas de *Bt* podem servir como agente potencializador de promoção de crescimento, desenvolvimento e resistência das plantas em ambientes com vários tipos de estresses bióticos ou abióticos (BABU; KIM; OH, 2013; CUI et al., 2016; EGAMBERDIEVA et al., 2017; KHAN; BANO, 2018; SCHWINGHAMER et al., 2015; VAZ et al., 2018).

Diferentes cepas de *Bt* também são capazes de sintetizar toxinas com propriedades bactericidas ou bacteriostáticas. As toxinas Cyt1Aa, Cry4Ba e Cry11Aa de *B. thuringiensis subsp Israelensis* são exemplos de algumas delas que podem ser eficientes no combate de outras espécies bacterianas como *E. coli* (PALMA et al., 2014). Outras como toxinas Cry1A, Cry1A, Cry3Aa e Cry1D produzidas por subespécies de *Bt* também possuem relatos de efeitos antimicrobianos especificamente contra bactérias aeróbias e anaeróbias (FARIAS et al., 2014; YUDINA et al., 2007). Lipopeptídeos, bacteriocinas e polissacarídeos também fazem parte do conjunto de biomoléculas de *Bt* que se mostraram eficazes como antibacterianos (PLÁCIDO et al., 2017). Além disso, algumas moléculas sintetizadas por *Bt* podem apresentar sinergia com as proteínas Cry, Cyt e Vip para atuar no

biocontrole de uma variedade de alvos, incluindo fitopatógenos de natureza fúngica ou bacteriana (DJENANE et al., 2017). As toxinas Cry como Cry5, Cry6, Cry13, Cry14, Cry14, Cry21 e Cry55 também já foram analisadas e apresentam efeito tóxico contra espécies de nematódeos tais como *Meloidogyne hapla* (ZHANG et al., 2012).

Devido a aspectos relacionados aos custos de registro de bioprodutos, demandas de mercado e serviços públicos (ex. BERG et al., 2013; CHOJNACKA; ACCESS, 2015), pode ser considerado vantajoso que um produto biotecnológico seja multifuncional; isto é especialmente verdade sob a perspectiva de uma transição necessária da sociedade para um mundo de bioeconomia (BUGGE; HANSEN; KLITKOU, 2016; VALLI; RUSSO; BOLZANI, 2018), em que as funcionalidades alternativas de *Bt* têm um alto potencial de agregar valor aos bioprodutos derivados dessa bactéria (ASHRAF; BANO; ALI, 2019; EGAMBERDIEVA et al., 2017; JOUZANI, 2017). Neste sentido, para analisar o conhecimento que vem sendo gerado pela comunidade científica com relação as potencialidades de *Bt* em aplicações biotecnológicas não-inseticidas, pode-se utilizar ferramentas de pesquisa tais como Revisão Sistemática (RS).

## **2.4 Revisão Sistemática**

A RS consiste em uma metodologia científica específica que vai um passo além da revisão geral simples. Ela é um método que permite aos cientistas obterem resultados empíricos já publicados que (i) respondem a perguntas científicas e (ii) podem ser quantificados (KITCHENHAM, 2004). Por meio dessa metodologia, é possível estabelecer um levantamento sistematizado do estado da arte de um determinado tema, seguindo um planejamento criterioso e passível de ser executado de forma reproduzível (MIAN et al., 2007). A RS tem o papel de preencher lacunas, prover sínteses abrangentes, confiáveis e imparciais de uma pesquisa sobre um tema específico, integrando, em um único relatório discutido, grandes volumes de estudos individuais, proporcionando evidências empíricas para a tomada de decisões e também auxiliando a identificar novos campos de pesquisas (GANESHKUMAR; GOPALAKRISHNAN, 2013). Elas são metódicas e explícitas, consistem em um processo de pesquisa que (i) segue uma sequência de etapas metodologicamente bem definidas, (ii) possuem um protocolo de estudo previamente planejado e (iii) são

passíveis de reprodução/repetição por outrem (KITCHENHAM; BRERETON, 2013; MIAN et al., 2007). Trata-se, pois, de uma metodologia de investigação híbrida, de base empírica, mas com dados publicados e disponíveis na literatura.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

A revisão sistemática foi conduzida em quatro etapas: buscas preliminares, planejamento, execução das buscas e constituição da base local de pesquisa, e sumarização dos dados e resultados. Essas etapas foram realizadas com base no modelo de protocolo de busca bibliográfica oferecido por (KITCHENHAM, 2004).

Para recuperar publicações diversas (incluindo revisões, artigos, comunicações curtas etc.) e considerando que *Bt* se trata de um microrganismo com muitos estudos a seu respeito, foi realizada uma busca piloto em três bases de dados previamente selecionadas: *Web of Science* ([www.webofknowledge.com](http://www.webofknowledge.com)), *PubMed* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) e *Scopus* ([www.scopus.com](http://www.scopus.com)). Como critério inicial de seleção, considerou-se apenas os trabalhos escritos em inglês sobre atividades não-inseticidas de *Bt* estudadas até dezembro de 2018, sem restrição para faixa de tempo. Para a execução desta etapa, onze *strings* de busca (combinações de palavras-chaves, símbolos e buscadores booleanos específicos para cada base de dados) foram formuladas. As *strings* foram formadas pelos termos comuns *Bacillus thuringiensis* ou *B. thuringiensis* combinados diferentemente com as seguintes palavras-chaves: 'antimicrobial', 'bacteriostatic OR antibacterial', 'anticancer OR cell killing OR cell death', 'bioremediation OR phytoremediation', 'biofungicide OR fungicide', 'growth promotion', 'tolerance to biotic OR abiotic stress', 'bionematicide OR nematocide', 'bio bactericide OR bactericide' e 'induction of resistance' (Tabela 1).

**Tabela 1:** Pesquisa piloto com palavras-chave, número de artigos recuperados e bancos de dados utilizados.

| Keywords <sup>1</sup>                       | Database <sup>2</sup> |                |        |
|---------------------------------------------|-----------------------|----------------|--------|
|                                             | Pub Med               | Web of Science | Scopus |
| 1. antimicrobial                            | 323                   | 362            | 4976   |
| 2. bacteriostatic OR antibacterial          | 215                   | 244            | 3769   |
| 3. anticancer OR cell killing OR cell death | 157                   | 337            | 1768   |
| 4. bioremediation OR phytoremediation       | 71                    | 80             | 1374   |
| 5. biofungicide OR fungicide                | 27                    | 56             | 945    |
| 6. bioactive" OR "bioactive compounds       | 8                     | 48             | 577    |
| 7. growth promotion                         | 10                    | 34             | 584    |
| 8. tolerance to biotic OR abiotic stress    | 31                    | 10             | 284    |
| 9. bionematicide OR nematocide              | 37                    | 91             | 144    |
| 10. bio bactericide OR bactericide          | 24                    | 17             | 114    |

|                             |            |             |              |
|-----------------------------|------------|-------------|--------------|
| 11. induction of resistance | 1          | 4           | 66           |
| <b>Total</b>                | <b>904</b> | <b>1283</b> | <b>14601</b> |

<sup>1</sup> Palavras-chave que foram combinadas com os termos *Bacillus thuringiensis* ou *B. thuringiensis* para formar diferentes cadeias de pesquisa. As cadeias de pesquisa que contêm as palavras-chave foram ajustadas para o padrão de pesquisa específico para cada banco de dados.

<sup>2</sup> Bancos de dados usados e número de artigos recuperados em cada sequência de pesquisa.

Com base nesta busca inicial aplicada ao texto inteiro dos artigos, foram recuperadas 16.788 publicações; porém, uma amostragem aleatória de leitura de títulos e *abstracts* revelou que a cada 50 artigos revisados, apenas um apresentava conteúdos com abordagens direcionadas para a atividade não-inseticida de *Bt*. Diante disso, definiu-se uma segunda busca bibliográfica com base em uma estratégia aprimorada que permitisse retornar artigos específicos para atividades não-inseticidas de *Bt*. Tais estratégias foram incluídas na fase de planejamento e estão descritas detalhadamente em no protocolo de elaborado para esta revisão (Tabela 2).

**Tabela 2:** Protocolo para busca sistemática de literatura e recuperação de dados.

|                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Título:</b>             | Mais do que apenas um matador de insetos: as atividades não inseticidas de <i>Bacillus thuringiensis</i> com potencial biotecnológico                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>Autores:</b>            | Naiane Oliveira Santos<br>Lorena Brito Pimentel Rodrigues dos Santos<br>Jacqueline Viana Fernandes<br>Ronilma Fernandes Alves<br>Juan Carlos Jaimes Martinez<br>Valter Cruz Magalhães<br>Leandro Loguercio                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <b>Descrição:</b>          | <i>Bacillus thuringiensis</i> ( <i>Bt</i> ) é amplamente abordado na literatura pelo seu eficiente efeito no controle biológico de insetos pragas. No entanto, recentemente, pesquisadores têm apontado que esse microrganismo pode ter outras potenciais aplicações ainda pouco exploradas. Nesse sentido, esta revisão será relevante por levantar o que existe de atividades biotecnológicas alternativas atribuídas ao <i>Bt</i> para além do seu uso bioinseticidas. |
| <b>Objetivos:</b>          | Analisar o estado da arte sobre atividades de <i>Bacillus thuringiensis</i> para além do seu efeito inseticida.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| <b>Questão da pesquisa</b> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Pergunta                   | Quais são as aplicações biotecnológicas não inseticidas de <i>Bacillus thuringiensis</i> e quais os níveis gerais de utilização das mesmas?                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |

|                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|---------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| População                       | Isolados e estirpes de <i>Bacillus thuringiensis</i> que foram estudadas a respeito das atividades alternativas não-inseticidas                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Intervenção                     | Possíveis/potenciais aplicações biotecnológicas não-inseticidas de <i>Bacillus thuringiensis</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Controle                        | Revisões já disponíveis                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Resultados esperados            | Estudos primários com experimentos empíricos que testam aplicações de <i>Bt</i> em diversas biotecnologias.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Estudos primários               | Estudos primários na forma de artigo científico                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>Identificação de Estudos</b> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Palavras-chaves                 | antibacterial<br>14nticancer<br>antimicrobial<br>bactericide<br>bacteriostatic<br>bio bactericide<br>bioactive<br>bioactive compounds<br>biofungicide<br>bionematicide<br>bioremediation<br>cell death<br>cell killing<br>fungicide<br>growth promotion<br>induction of resistance<br>nematicide<br>phytoremediation<br>tolerance abiotic stress<br>tolerance to biotic                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| String de Busca                 | 1. ABS (“ <i>Bacillus thuringiensis</i> ” OR “ <i>B. thuringiensis</i> ” AND “antimicrobial”)<br>2. ABS (“ <i>Bacillus thuringiensis</i> ” OR “ <i>B. thuringiensis</i> ” AND “bacteriostatic” OR “antibacterial”)<br>3. ABS (“ <i>Bacillus thuringiensis</i> ” OR “ <i>B. thuringiensis</i> ” AND “14nticancer” OR “cell killing” OR “cell death”)<br>4. ABS (“ <i>Bacillus thuringiensis</i> ” OR “ <i>B. thuringiensis</i> ” AND “bioremediation” OR “phytoremediation”)<br>5. ABS (“ <i>Bacillus thuringiensis</i> ” OR “ <i>B. thuringiensis</i> ” AND “biofungicide” OR “fungicide”)<br>6. ABS (“ <i>Bacillus thuringiensis</i> ” OR “ <i>B. thuringiensis</i> ” AND “bioactive” OR “bioactive compounds”)<br>7. ABS (“ <i>Bacillus thuringiensis</i> ” OR “ <i>B. thuringiensis</i> ” AND “growth promotion”) |

|                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                   | <p>8. ABS (“<i>Bacillus thuringiensis</i>” OR “<i>B. thuringiensis</i>” AND “tolerance to biotic” OR “abiotic stress”)</p> <p>9. ABS (“<i>Bacillus thuringiensis</i>” OR “<i>B. thuringiensis</i>” AND “bionematicide” OR “nematicide”)</p> <p>10. ABS (“<i>Bacillus thuringiensis</i>” OR “<i>B. thuringiensis</i>” AND “bio bactericide” OR “bactericide”)</p> <p>11. ABS (“<i>Bacillus thuringiensis</i>” OR “<i>B. thuringiensis</i>” AND “induction of resistance”)</p>                                                                  |
| Critérios:                        | Serão realizadas buscas automáticas nas bases bibliográficas (Web of Science, Scopus, PubMed) selecionadas. Utilizando-se as strings adaptadas a cada base de dados. Os dados serão importados no formato BIBTEX.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Idiomas dos estudos               | Inglês                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Fontes                            | Web of Science<br>Pub Med<br>Scopus                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Tipos de estudos                  | Artigos de dados<br>Artigos de pesquisa<br>Comunicação curta                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Seleção inicial de estudos        | Com base no título, resumo e palavras chaves.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Seleção Final de estudos          | Seleção final será feita com base nos critérios de inclusão e exclusão                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Critérios de inclusão e exclusão: | <p><i>Inclusão:</i><br/>Escrito em inglês<br/>Estudos primários/artigos<br/>Artigos que discorrem sobre atividades não-inseticidas atribuídas a <i>Bt</i></p> <p><i>Exclusão:</i><br/>Artigos de revisão<br/>Não esteja alinhado com o objeto de estudo<br/>Artigos com foco em atividades inseticidas de <i>Bt</i><br/>Artigos sem acesso</p>                                                                                                                                                                                                |
| Estratégias de extração de dados  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Métodos utilizados: Nome ou descrição</li> <li>• Resumos dos principais resultados</li> <li>• Qual foi a utilização de <i>Bacillus thuringiensis</i></li> <li>• Principais tópicos abordados na discussão</li> <li>• Origem das cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> para o experimento</li> <li>• Localização da pesquisa (em qual país)</li> <li>• No caso de controle biológico (contra qual organismos)</li> <li>• Qual ano que foi realizada a pesquisa</li> <li>• Palavras-chaves</li> </ul> |

|                            |                                                                       |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| Sumarização dos resultados | Os dados coletados serão demonstrados em tabelas, figuras e gráficos. |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------|

Ao analisar o número de artigos retornados entre as três bases de dados utilizada durante a pesquisa piloto, foi possível perceber que a proporcionalidade dos artigos recuperados entre as três bases bibliográficas foi semelhante (Tabela 1), assim, optou-se por reduzir a fonte de literatura para a nova busca somente para a base *Scopus*, uma vez que esta apresentou maior número de publicações retornadas, sendo um banco de dados caracterizado por artigos revisados por pares (Ballew, 2009). Para recuperar as publicações de nosso interesse, utilizamos os mesmos critérios estabelecidos na busca piloto, com exceção de que os termos e as palavras chaves presentes nas *strings* fossem encontrados apenas dentro dos títulos e resumos dos artigos. Esta decisão partiu da premissa de que as palavras chaves sendo encontradas somente nessas duas seções permitiria abranger maiores números de publicações diretamente as atividades não-inseticidas de *Bt*.

Após a etapa de execução aplicando os critérios acima indicados, 590 publicações foram obtidas, as quais foram importadas em formato 'bibitex' para o software StArt (Estado da Arte através da Revisão Sistemática) v. 3.3 Beta 03, desenvolvido pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), disponível para download ([http://lapes.dc.ufscar.br/tools/start\\_tool](http://lapes.dc.ufscar.br/tools/start_tool)). Após a organização dos estudos de acordo com o software, iniciamos o processamento dos artigos obtidos, excluindo 77 trabalhos que vieram duplicados (repetidos entre *strings* diferentes). A seguir, realizou-se a seleção inicial dos estudos aplicando os critérios de inclusão e exclusão (Tabela 2) com base na leitura dos resumos. Foram excluídos todos os trabalhos que realizaram pesquisas com foco em atividades inseticidas de *Bt* e publicações que não estavam alinhadas com o objetivo deste estudo, i.e., sem investigação de qualquer atividade alternativa (não-inseticida) de *Bt*. Os artigos que atenderam os critérios de inclusão abordaram atividades não-inseticidas de *Bt* e foram publicados em língua inglesa. Nesta fase, 125 trabalhos tratavam de estudos sobre atividade inseticida e 227 publicações não abordaram assuntos relacionados ao tema desta pesquisa.

Assim, dos 590 trabalhos recuperados na etapa anterior, 161 passaram para a seleção final dos estudos. Nesta etapa houve a identificação do tipo de publicação para aplicar um dos critérios de exclusão, i.e., eliminação de revisões, capítulos de

livros e outros artigos que não puderam ser acessados na íntegra. Um total de 128 artigos revisados com base na leitura completa do texto foram utilizados para as análises dessa revisão sistemática. Com a finalidade de verificar o padrão de recuperação de publicações com base no protocolo estabelecido, distribuiu-se os estudos nas três categorias (artigos rejeitados, duplicados e aceitos), verificando-se as respectivas proporções para cada string de busca utilizada. Após a etapa de execução aplicando os critérios acima indicados, 590 publicações foram obtidas, as quais foram importadas em formato 'bibitex' para o software *StArt* (Estado da Arte através da Revisão Sistemática) v. 3.3 Beta 03, desenvolvido pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), disponível para *download* ([http://lapes.dc.ufscar.br/tools/start\\_tool](http://lapes.dc.ufscar.br/tools/start_tool)). Após a organização dos estudos de acordo com o software, iniciamos o processamento dos artigos obtidos, excluindo 77 trabalhos que vieram duplicados (repetidos entre *strings* diferentes). A seguir, realizou-se a seleção inicial dos estudos aplicando os critérios de inclusão e exclusão (Tabela 2) com base na leitura dos resumos. Foram excluídos todos os trabalhos que realizaram pesquisas com foco em atividades inseticidas de *Bt* e publicações que não estavam alinhadas com o objetivo deste estudo, i.e., sem investigação de qualquer atividade alternativa (não-inseticida) de *Bt*. Os artigos que atenderam os critérios de inclusão abordaram atividades não-inseticidas de *Bt* e foram publicados em língua inglesa. Nesta fase, 125 trabalhos tratavam de estudos sobre atividade inseticida e 227 publicações não abordaram assuntos relacionados ao tema desta pesquisa.

Assim, dos 590 trabalhos recuperados na etapa anterior, 161 passaram para a seleção final dos estudos, com extração de dados concomitante. Nesta etapa houve a identificação do tipo de publicação para aplicar um dos critérios de exclusão, i.e., eliminação de revisões, capítulos de livros e outros artigos que não puderam ser acessados na íntegra. Um total de 128 artigos revisados por pares com base na leitura completa do texto foram utilizados para as análises dessa revisão sistemática. Com a finalidade de verificar o padrão de recuperação de publicações com base no protocolo estabelecido, distribuiu-se os estudos nas três categorias (artigos rejeitados, duplicados e aceitos), verificando-se as respectivas proporções para cada string de busca utilizada.

### 3.1 Compilação e análise de dados

A sumarização dos dados se deu com base em informações coletadas das seções Materiais e Métodos, Resultados e Discussão de todos os artigos revisados, incluindo descrição das atividades de *Bt*, origem das cepas, país de condução das pesquisas, anos de publicação e palavras chaves encontradas. Na categoria de artigos aceitos estão todos os artigos de pesquisas sobre atividades de *Bt* não-inseticidas que puderam ser acessados integralmente.

A partir de todos os artigos aceitos, foram extraídos dados quantitativos e qualitativos a fim de observar os padrões de comportamento das pesquisas referentes a tipos de atividades alternativas de *Bt* investigadas, anos de publicações e países onde foram conduzidas as pesquisas. Além disso, foram também registrados, a partir do banco de dados desta revisão sistemática, os métodos empregados em cada pesquisa, tipos de medidas de efeito (ME) avaliadas, números de cepas de *Bt* testadas, alvos e organismos intermediadores utilizados (quando em caso de atividades de *Bt* promovidas com a utilização de plantas). Também foram observadas as condições de condução de cada experimento (*in vitro*, *in vivo* e *in situ*) e o número de artigos aceitos para cada tipo de atividade encontrada.

#### 4. RESULTADOS

A busca preliminar recuperou um conjunto de trabalhos que abrangeu maior parte de pesquisas sobre atividades inseticidas de *Bt*, que não correspondiam ao foco desta revisão. As três bases de dados *Scopus*, *Web of Science* e *PubMed* mostraram padrões semelhantes de distribuição de publicações por *string* entre si (14601, 1283 e 904 trabalhos, respectivamente); porém, a base *Scopus* apresentou 87% do total de publicações recuperáveis (Tabela 1). Assim, para refinar a busca bibliográfica, optou-se por realizar esta etapa somente na base de dados *Scopus*, partindo do critério de que as *strings* estabelecidas estivessem presentes nos resumos. Com esta nova estratégia, foi possível recuperar 590 publicações.

Os resultados da aplicação do protocolo de pesquisa bibliográfica foram analisados em termos da relação entre as *strings* de busca e o número de artigos retornados/aceitos. Foi observado que 21.7 % dos trabalhos recuperados na busca corresponderam aos artigos finais selecionados para compor a base de dados literários desta revisão. Os resultados desta revisão sistemática mostraram um maior percentual de publicações obtidas a partir das palavras-chaves presentes nas strings 1 ('antimicrobial') e 2 ('bacteriostatic', 'antibacterial') (Tabela 3), as quais representam 62.5% do total de publicações recuperadas. Quanto aos artigos aceitos, a proporção destas duas strings reduziu-se para 47.7%. A *string* 3, referindo-se a 'anticancer', 'cell killing', 'cell death', foi a terceira com maior número de publicações recuperadas (12.2%) enquanto a segunda com maior número de artigos aceitos foi a *string* 4, que se refere a 'bioremediation', 'phytoremediation' (23,4%). Importante observar que ~84% dos trabalhos aceitos em nosso banco de dados para a *string* 4 foram publicados nos últimos 5 anos. Dentro do protocolo de pesquisa sistemática estabelecido neste estudo, a *string* 11 ('induction of resistance') não permitiu o retorno de nenhuma publicação a respeito.

**Tabela 3:** Análise inicial e seleção dos estudos.

| Palavras-chaves <sup>1</sup>                | Recuperados <sup>2</sup> | Duplicados <sup>3</sup> | Rejeitados <sup>4</sup> | Aceitos <sup>5</sup> |
|---------------------------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------|
| 1. antimicrobial                            | 187                      | 2                       | 147                     | 40                   |
| 2. bacteriostatic OR antibacterial          | 182                      | 52                      | 161                     | 21                   |
| 3. anticancer OR cell killing OR cell death | 72                       | 3                       | 53                      | 19                   |

|                                          |     |    |     |     |
|------------------------------------------|-----|----|-----|-----|
| 4. bioremediation OR phytoremediation    | 40  | 1  | 10  | 30  |
| 5. biofungicide OR fungicide             | 40  | 1  | 36  | 4   |
| 6. bioactive" OR "bioactive compounds    | 34  | 11 | 33  | 1   |
| 7. growth promotion                      | 13  | 1  | 8   | 5   |
| 8. tolerance to biotic OR abiotic stress | 10  | 2  | 7   | 3   |
| 9. bionematicide OR nematocide           | 10  | 3  | 6   | 4   |
| 10. bio bactericide OR bactericide       | 2   | 1  | 1   | 1   |
| 11. induction of resistance              | 0   | 0  | 0   | 0   |
| Total                                    | 590 | 77 | 462 | 128 |

<sup>1</sup> Palavras-chave que foram combinadas com os termos 'Bacillus thuringiensis' ou 'B. thuringiensis' para formar diferentes cadeias de pesquisa.

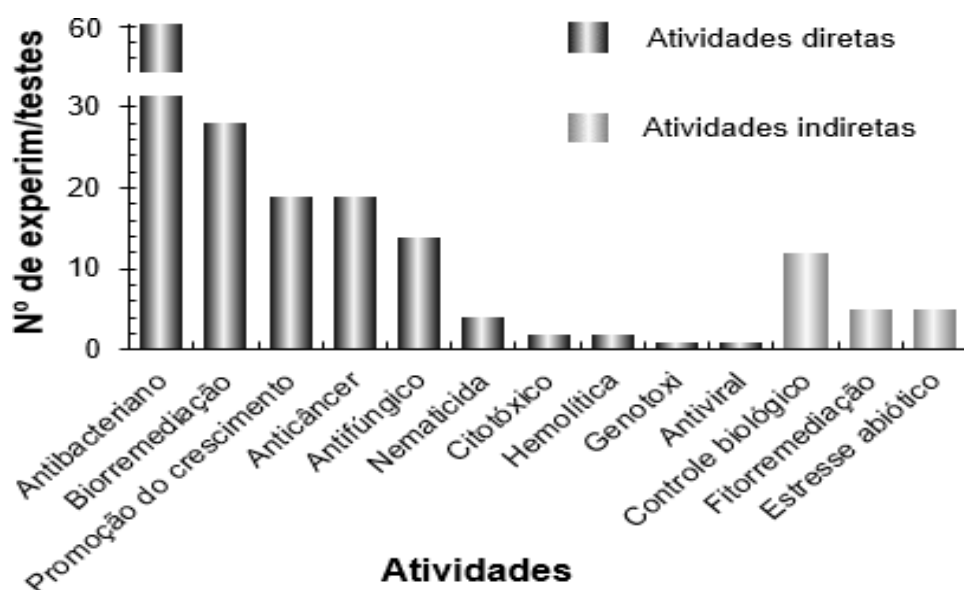
<sup>2</sup> Número de publicações recuperadas por cada sequência de pesquisa no banco de dados Scopus.

<sup>3</sup> Número de postagens repetidas que foram encontradas em cada sequência de pesquisa.

<sup>4</sup> Número de publicações rejeitadas por não atenderem ao tema proposto nesta revisão.

<sup>5</sup> Número de artigos aceitos para a Revisão Sistemática.

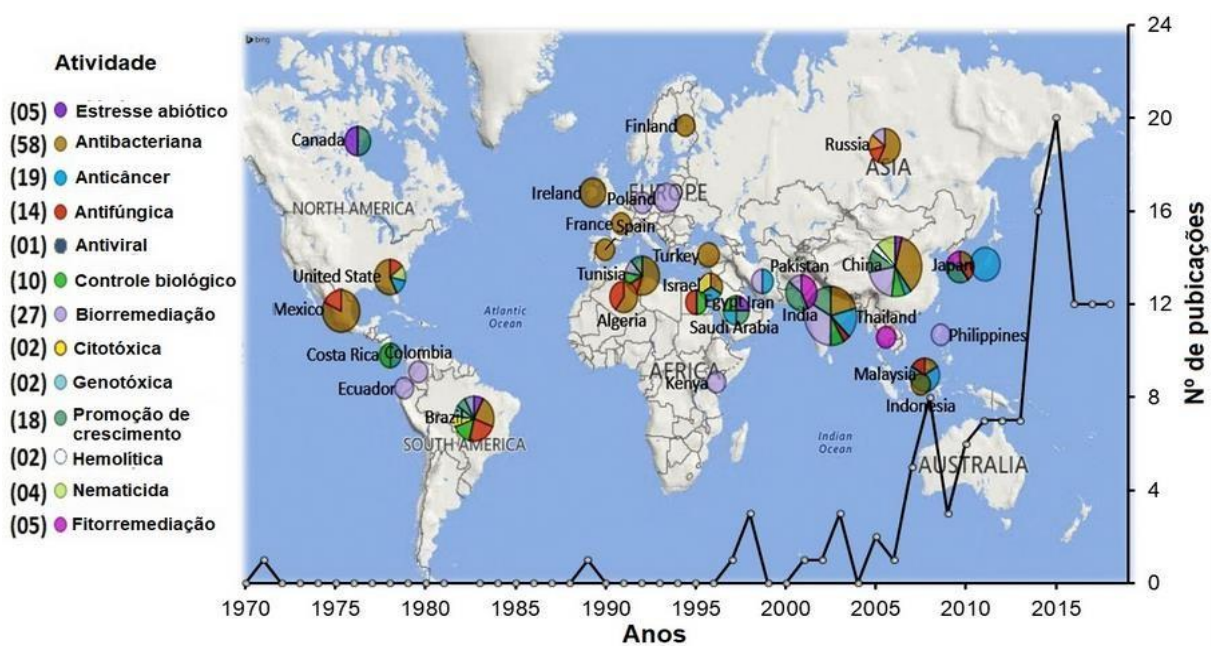
A análise dos conteúdos dos artigos incluídos para esta revisão registrou 13 diferentes atividades não-inseticidas de *Bt* com potencial aplicação biotecnológica (Fig. 1), perfazendo um total de 169 testes/experimentos. Considerando sua natureza, estas atividades foram classificadas em duas grandes categorias: *diretas* e *indiretas*. As atividades *diretas* correspondem aquelas em que *Bt* exerceu seu efeito sobre determinado alvo sem a necessidade de um terceiro organismo componente no sistema interativo. Atividades *indiretas* referem-se a atividades de *Bt* geralmente promovidas por meio de um terceiro organismo no sistema, em alguns casos utilizando plantas. Do total de experimentos/testes encontrados, 87% equivaleram a atividades diretas e 13% a atividades indiretas (Fig. 1). Estas atividades estão relacionadas a três grandes áreas de conhecimento, assim distribuídas: 59.7% para saúde, 21.3% para agricultura e 19% para meio ambiente. Dentre as atividades diretas analisadas, 66.8% dos experimentos para as ações não-inseticidas corresponderam a atividades inibitórias contra vários tipos de alvos (células de câncer, bactérias e fungos patogênicos, vírus, nematóides etc.). O percentual de artigos em que se estudou mais de uma atividade não-inseticida de *Bt*, dentre os 128 que compõem o banco de dados final desta pesquisa, foi de 32%. Das atividades encontradas, verificou-se os menores números de estudos (experimentos) publicados sobre as seguintes atividades de *Bt*: citotóxica, hemolítica (2 cada), genotóxica e antiviral (1 cada) (Fig. 1).



**Figura 1.** Atividades não inseticidas de *Bt* que foram encontradas no escopo de artigos aceitos. O eixo vertical corresponde ao número de experimentos/testes identificados nos artigos revisados pela atividade estudada. As atividades *diretas* correspondem à ação de *Bt* em outras células sem a presença de um terceiro organismo no sistema. A atividade *indireta* reflete os efeitos da *Bt* geralmente em sistemas interativos tritróficos (por exemplo, *Bt*-planta-patógeno).

Uma análise da evolução temporal e da distribuição espacial das pesquisas revisadas neste estudo também foi realizado, buscando investigar possíveis padrões relevantes de pesquisa global nesse tema (Fig. 2). No período dos primeiros 30 anos da faixa de tempo encontrada para as publicações aceitas (1971 a 2000), apenas 6 pesquisas (4.7%) sobre atividades de *Bt* não-inseticidas foram publicadas, equivalendo a 0.2 artigos/ano. A partir do novo milênio, houve um aumento relevante no número dessas publicações, subindo a média anual para 6.8 artigos/ano (aumento de 34 vezes a média do período anterior). A distribuição geográfica global de experimentos/testes de *Bt* não-inseticida no período investigado (Fig. 2) indicaram que as pesquisas foram conduzidas em 32 países pertencentes a todos os continentes, exceto Oceania e Antártida. Registrou-se 95 experimentos/testes na Ásia, 39 na América, 17 na África e 12 na Europa, num total de 163; dos 169 testes identificados, apenas seis (em quatro artigos) não puderam ter atribuídos a localidade (país e/ou continente) em que os estudos foram conduzidos. A Ásia foi o continente de maior representatividade em pesquisas e número de experimentos encontrados para as diferentes atividades não-inseticidas, correspondendo a 55.9% do total. As atividades não-inseticidas de *Bt* mais representadas neste continente foram as atividades antibacteriana (24 experimentos) e bio-/fitorremediação (23). Dentre os países

asiáticos, a China e a Índia apresentaram o maior número de pesquisas (49 testes), correspondendo a 30.1% do total de experimentos identificados. Para a China, a atividade mais frequentemente encontrada foi a antibacteriana (9 experimentos), e para a Índia, a biorremediação (8 testes). Os estudos sobre atividades anticâncer também predominaram em instituições de países asiáticos, com maior frequência no Japão (6 experimentos; 33.3%). Do total de 32 países identificados em nossa revisão, de acordo com Banco Mundial (<https://datahelpdesk.worldbank.org/knowledgebase/articles/906519>), 26.6% das pesquisas com atividades não-inseticidas de *Bt* foram conduzidas em instituições de países considerados como de renda média-baixa, 44.9% em países de renda média-alta, e 28,5% em países com renda considerada alta. Destas atividades, as mais pesquisadas foram antimicrobianas (42 experimentos para antibacteriana e 12 para antifúngica), bio-/fitorremediação (25), promoção de crescimento de plantas (13), e anticâncer (10).



**Figura 2.** Tendências de publicação sobre atividades não-inseticidas de *Bt*. Número de artigos por ano de publicações. Distribuição global das atividades estudadas; Mapa de atividades mostrando os locais onde os estudos foram realizados e o número de atividades não inseticidas de *Bt* que foram realizadas. Um total de 169 experimentos de teste identificados aparecem entre parênteses, de acordo com suas atividades. Para o mapa, o número total de experimentos considerados foi de 163, pois não foi possível identificar o país de atuação em seis experimentos (i.e., 4 de 128 artigos revisados).

Para o escopo deste trabalho, buscou-se entender a maneira como as pesquisas com atividades não-inseticidas de *Bt* vem sendo realizadas. Para isso, procedemos uma investigação detalhada, com coleta de dados e de informações sobre avaliações quantitativas para variáveis experimentais, as quais foram aqui consideradas como ‘medidas de efeito’ (ME) para as diferentes atividades de *Bt*. Os métodos experimentais em cada um dos artigos selecionados foram analisados para uma compilação desses dados quantitativos. Além das MEs, anotou-se o número e tipos de cepas de *Bt*, o número e tipos de células-alvo, e as condições experimentais predominantes (Tabelas 4 e 5). Das 13 atividades indicadas na Fig. 1, nove tiveram MEs avaliadas para caracterizar as atividades alternativas com potencial biotecnológico de *Bt*, sendo que em média foram utilizadas 38.3 cepas por atividade, nos diversos estudos realizados (Tabelas 4 e 5). Dentro do conjunto de atividades que apresentaram dados quantitativos (ME), seis corresponderam a atividades não-inseticidas diretas de *Bt* (quatro com células-alvo, e dois com outro tipo de ação direta – Tabela 4). É importante ressaltar que alguns artigos analisados apresentaram estudos com mais de uma atividade não-inseticida de *Bt* (Tabelas 4 e 5, números entre parêntesis), de modo que o somatório global de ‘artigos por atividade’ foi maior do que os 128 artigos publicados selecionados nesta revisão. Deste modo, o número de artigos por atividade contendo os estudos com ações diretas de *Bt* representaram 86.3% do total de artigos por atividade com análises quantitativas (161).

**Tabela 4.** Resumo das atividades *diretas*<sup>1</sup> não inseticidas de *Bt*, com efeitos de medição, encontrados em artigos aceitos que compõem o banco de dados deste estudo.

| Atividades <sup>2</sup>             | ME <sup>3</sup>  | Nº Estudos <sup>4</sup> | Nº Cepas <i>Bt</i> <sup>5</sup> | Nº Alvos <sup>6</sup> | Condições experimentais <sup>7</sup> |             |             |
|-------------------------------------|------------------|-------------------------|---------------------------------|-----------------------|--------------------------------------|-------------|-------------|
|                                     |                  |                         |                                 |                       | <i>Vitro</i>                         | <i>Vivo</i> | <i>Situ</i> |
| Antibacteriana<br>(56) <sup>8</sup> | IC50%            | 1                       | 1                               | 1                     | 1                                    | 0           | 0           |
|                                     | MIC              | 17                      | 21                              | 176                   | 17                                   | 0           | 0           |
|                                     | Zona de inibição | 42                      | 130                             | 636                   | 41                                   | 1           | 0           |
|                                     | <b>Total</b>     | <b>60</b>               | <b>152</b>                      | <b>813</b>            | <b>59</b>                            | <b>1</b>    | <b>0</b>    |
| Anticâncer<br>(19)                  | Viabilidade      | 16                      | 24                              | 59                    | 15                                   | 1           | 0           |
|                                     | IC 50%           | 1                       | 1                               | 4                     | 1                                    | 0           | 0           |
|                                     | Peso             | 2                       | 3                               | 5                     | 2                                    | 0           | 0           |
|                                     | Dose letal       | 1                       | 1                               | 1                     | 1                                    | 0           | 0           |
|                                     | <b>Total</b>     | <b>20</b>               | <b>29</b>                       | <b>69</b>             | <b>19</b>                            | <b>1</b>    | <b>0</b>    |
| Antifúngica                         | Zona de inibição | 8                       | 22                              | 32                    | 8                                    | 0           | 0           |
|                                     | MIC              | 3                       | 3                               | 25                    | 3                                    | 0           | 0           |

|                    |                         |           |           |           |           |          |          |
|--------------------|-------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|
| (14)               | Promoção de crescimento | 2         | 12        | 7         | 2         | 0        | 0        |
|                    | Inibição de germinação  | 1         | 1         | 1         | 1         | 1        | 0        |
|                    | <b>Total</b>            | <b>14</b> | <b>38</b> | <b>65</b> | <b>14</b> | <b>1</b> | <b>0</b> |
| Nematicida<br>(04) | Sobrevivência           | 1         | 1         | 1         | 1         | 0        | 0        |
|                    | MIC                     | 2         | 2         | 3         | 1         | 1        | 0        |
|                    | Morte                   | 2         | 2         | 2         | 2         | 0        | 0        |
|                    | Massa                   | 1         | 1         | 2         | 3         | 0        | 0        |
|                    | <b>Total</b>            | <b>6</b>  | <b>6</b>  | <b>8</b>  | <b>7</b>  | <b>1</b> | <b>0</b> |

#### Outras atividades

|                                 |                        |            |            |             |            |           |          |
|---------------------------------|------------------------|------------|------------|-------------|------------|-----------|----------|
| Bioremediação<br>(27)           | Concentração degradada | 14         | 14         | 14          | 13         | 1         | 0        |
|                                 | Concentração reduzida  | 20         | 20         | 20          | 17         | 2         | 1        |
|                                 | MIC                    | 5          | 5          | 9           | 5          | 0         | 0        |
|                                 | População microbiana   | 2          | 2          | 3           | 2          | 0         | 0        |
|                                 | <b>Total</b>           | <b>41</b>  | <b>41</b>  | <b>46</b>   | <b>37</b>  | <b>3</b>  | <b>1</b> |
| Promoção de crescimento<br>(19) | Biomassa Prod          | 18         | 18         | 18          | 8          | 18        | 1        |
|                                 | Medidas lineares       | 11         | 11         | 11          | 5          | 11        | 0        |
|                                 | Composição química     | 5          | 5          | 5           | 3          | 5         | 0        |
|                                 | Photosíntese           | 2          | 2          | 2           | 1          | 2         | 0        |
|                                 | Fisiologia             | 1          | 1          | 1           | 1          | 1         | 0        |
|                                 | <b>Total</b>           | <b>37</b>  | <b>37</b>  | <b>37</b>   | <b>18</b>  | <b>37</b> | <b>1</b> |
| <b>Grand total</b>              |                        | <b>178</b> | <b>303</b> | <b>1038</b> | <b>154</b> | <b>44</b> | <b>2</b> |

<sup>1</sup> As atividades não inseticidas 'diretas' no escopo deste estudo representam todos os tipos de efeitos da *Bt* que são avaliados como resultado de uma ação direta sobre determinados alvos, sem qualquer intermediação por um terceiro tipo de organismo (consulte a Tabela 3).

<sup>2</sup> Atividades encontradas em nossos artigos aceitos que compuseram o banco de dados do estudo;

<sup>3</sup> Medidas dos efeitos (EM) analisados nos vários estudos, agrupados por cada categoria de atividade. 'MIC': concentração inibitória mínima, IC50%: concentração inibidora média, dose letal (anticâncer); , cada EM indica uma coleção de variáveis encontradas em todos os estudos correspondentes (consulte Métodos), mas não necessariamente presentes simultaneamente em todos eles.

<sup>4</sup> A coluna número de estudos indica o número total de variáveis de resposta (medidas de efeitos, EM) que foram avaliadas nos artigos das quatro bases de dados em que foram encontradas;

<sup>5</sup> Número total de cepas de *Bt* testadas em todos os estudos encontrados para essa medida de efeito entre os artigos;

<sup>6</sup> Número total de alvos biológicos em todos os estudos encontrados para essa medida de efeito;

<sup>7</sup> Esta coluna indica os três tipos de condições experimentais nas quais os dados dos estudos primários foram coletados. 'Vitro': variáveis / estudos realizados em condições controladas de laboratório, com efeito mínimo de variáveis desconhecidas que adicionam erro experimental (por exemplo, culturas de células in vitro, atividades enzimáticas, etc.); 'Vivo': corresponde a testes e técnicas aplicadas aos organismos modelo (por exemplo, camundongos, plantas etc.); 'Situ': avaliações e experimentos realizados no local / local em que um determinado problema prático precisava ser tratado (por exemplo, locais de mineração, terras agrícolas, áreas poluídas etc.)

<sup>8</sup> Número de artigos revisados por atividade. O total de atividades com medidas de efeito registradas nas tabelas 2 e 3 (162) é superior ao número de artigos revisados (128), porque alguns dos artigos apresentaram pesquisa com mais de uma atividade daqueles considerados neste estudo. O número

total gerado para cada coluna corresponde aos valores encontrados em cada estudo (EM), portanto, não correspondem ao total de artigos revisados. Alguns artigos apresentaram mais de uma forma de medida de efeito. Assim, o número de cepas e alvos pode ser repetido quando o mesmo artigo utilizou mais de um estudo.

**Tabela 5.** Resumo das atividades *indiretas*<sup>1</sup> não inseticidas de *Bt* encontradas nos artigos aceitos no banco de dados deste estudo.

| Atividades                       | ME                     | Nº de estudos | Nº de cepas | Nº de estresses <sup>2</sup> | Nº Plantas <sup>3</sup> | Condições experimentais |           |          |
|----------------------------------|------------------------|---------------|-------------|------------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------|----------|
|                                  |                        |               |             |                              |                         | Vitro                   | Vivo      | Situ     |
| Controle Biológico (plants) (12) | Redução da doença      | 6             | 6           | 11                           | 6                       | 3                       | 6         | 1        |
|                                  | Incidência/Severidade  | 5             | 5           | 5                            | 5                       | 1                       | 5         | 0        |
|                                  | ovos (nemat)           | 3             | 4           | 5                            | 4                       | 0                       | 2         | 1        |
|                                  | População de patógenos | 3             | 4           | 6                            | 4                       | 0                       | 3         | 0        |
|                                  | Produção da planta     | 2             | 2           | 4                            | 2                       | 0                       | 2         | 0        |
| <b>Total</b>                     |                        | <b>19</b>     | <b>21</b>   | <b>31</b>                    | <b>21</b>               | <b>4</b>                | <b>18</b> | <b>2</b> |
| Estresse abiótico (5)            | Biomassa/Produção      | 4             | 4           | 4                            | 4                       | 1                       | 4         | 1        |
|                                  | Composição química     | 3             | 3           | 3                            | 3                       | 1                       | 3         | 1        |
|                                  | Medidas lineares       | 2             | 2           | 2                            | 2                       | 0                       | 2         | 1        |
|                                  | Fisiologia             | 3             | 3           | 3                            | 3                       | 1                       | 3         | 1        |
|                                  | Fotossíntese           | 2             | 2           | 2                            | 2                       | 1                       | 2         | 0        |
| <b>Total</b>                     |                        | <b>14</b>     | <b>14</b>   | <b>14</b>                    | <b>14</b>               | <b>4</b>                | <b>14</b> | <b>4</b> |
| Fito-remediação (5)              | Biomassa               | 4             | 2           | 3                            | 2                       | 2                       | 2         | 0        |
|                                  | Concentração acumulada | 2             | 2           | 2                            | 2                       | 1                       | 2         | 0        |
|                                  | Concentração removida  | 2             | 2           | 2                            | 2                       | 1                       | 2         | 0        |
|                                  | Fotossíntese           | 1             | 1           | 1                            | 1                       | 1                       | 1         | 0        |
|                                  | <b>Total</b>           | <b>9</b>      | <b>7</b>    | <b>8</b>                     | <b>7</b>                | <b>5</b>                | <b>7</b>  | <b>0</b> |
| <b>Grand total</b>               |                        | <b>42</b>     | <b>42</b>   | <b>53</b>                    | <b>42</b>               | <b>13</b>               | <b>39</b> | <b>6</b> |

<sup>1</sup> As atividades não inseticidas 'indiretas' no escopo deste estudo representam todos os tipos de efeitos da *Bt* que são avaliados como resultado de uma ação direta sobre determinados alvos, sem qualquer intermediação por um terceiro tipo de organismo (também veja a Tabela 2).

<sup>2</sup> Número de diferentes estresses testados em espécies vegetais;

<sup>3</sup> Número de espécies de plantas usadas em cada estudo.

Destas ações diretas, as atividades antibacteriana e de biorremediação apresentaram maior número de artigos aceitos por atividade (51.5%), com maiores números de estudos identificados (60 e 41, respectivamente; Tabela 4). Quanto às condições experimentais utilizadas, 77% de todos os estudos sobre atividades diretas encontradas correspondem a experimentos realizados *in vitro*, 22% a experimentos *in*

*vivo* e somente 1% *in situ*. Considerando atividades antimicrobianas, foram identificados 4.3x mais estudos com ações antibacterianas em relação às antifúngicas, com destaque para as proporções de cepas de *Bt* e de alvos investigados (Tabela 4): de um total de 303 cepas testadas para as seis atividades diretas, metade referiu-se somente à atividade antibacteriana, com esta contendo 80% das cepas de *Bt* estudadas como antimicrobianas; dos alvos microbianos testados, a vasta maioria (92.6%) é de bactérias. Para estes estudos, houve uma predominância de testes baseados em ‘zona de inibição’, sendo 70% para atividade antibacteriana e 57% para antifúngica (Tabela 4).

Com relação às atividades não-inseticidas indiretas, 67.2% dos estudos foram realizados *in vivo*, 22.4% *in vitro* e 10.3% conduzidos *in situ* (Tabela 5). Do total de estudos com atividades indiretas, o maior percentual (54.5%) correspondeu a experimentos de controle biológico *in vivo*, nos quais as MEs são obtidas a partir de interações tri-tróficas ‘*Bt*-planta-patógeno’. Controle biológico é a atividade indireta de *Bt* não-inseticida que apresentou maior número de estudos (45.2%) e cepas utilizadas (50%), sendo restrito a plantas como terceiro componente da interação (Tabela 5). Por fim, observou-se que para as atividades indiretas houve uma relação de 1:1 entre o número de cepas de *Bt* e o número de estudos realizados, enquanto para as atividades diretas, essa relação é afetada (Tabelas 4 e 5).

## 5. DISCUSSÃO

*Bacillus thuringiensis* (*Bt*) é amplamente discutido na literatura por seu efeito eficiente no controle biológico de insetos-praga. Nas últimas décadas, no entanto, os pesquisadores apontaram que esse microrganismo possui outras aplicações em potencial ainda subutilizadas (JOUZANI, 2017). Neste estudo foi conduzida uma revisão sistemática (RS) sobre aplicações biotecnológicas não-inseticidas de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) a partir de um conjunto de artigos retornados, utilizando a base de dados *Scopus*. Do total de 590 artigos recuperados nesta busca apenas o conteúdo de 128 foram incluídos neste estudo por apresentar experimentos/testes com foco em atividades não-inseticidas de *Bt*, e, portanto, de acordo com o escopo desta RS.

Quando comparada com o uso do texto completo para recuperar publicações (busca piloto), a estratégia utilizada de considerar a presença das palavras-chave/*strings* de busca somente nos resumos foi mais efetiva (Tabela 1 e 3). Apesar do número de publicações ter caído para ~3.5% do total inicial da primeira busca, foi possível contemplar um número razoável de artigos com ênfase em atividades biotecnológicas não-inseticidas de *Bt*. Isto indicou claramente que as buscas dos trabalhos a partir dos textos dos resumos e títulos tendem a ser mais eficientes e específicas. Esta vantagem em se restringir as buscas aos resumos muito provavelmente está relacionada ao fato de que a presença das palavras-chaves no corpo do texto das publicações não permite restringir o escopo dos estudos primários aos interesses da pesquisa. Quanto às publicações recuperadas na busca piloto, a proporção razoavelmente similar entre as bases de dados e as *strings* de busca (Tabela 1) sugere adequada representatividade da base *Scopus* em relação às demais. Os resultados também sugerem uma maior amplitude da base bibliográfica *Scopus* em relação ao tema desta pesquisa, uma vez que foi possível recuperar um número suficiente de estudos para compor a base amostral desta revisão.

Considerando o protocolo de pesquisa bibliográfica final estabelecido neste trabalho, a proporção encontrada de artigos recuperados e aceitos (Tabela 2) indicou boa compatibilidade entre as *strings* de busca e os critérios de inclusão e exclusão. Isto sugere que a estratégia de pesquisa foi eficiente, não enviesada e coerente com os objetivos propostos. A maioria dos artigos recuperados e aceitos apresentou o foco de suas pesquisas em atividades antimicrobianas, anticâncer, de morte celular e de

remediação de poluentes (Tabela 3). As predominâncias de estudos sobre esses temas sugerem serem estes alguns dos maiores problemas de saúde pública do mundo (GUDIOL; CARRATALA, 2014; MEER; STATES; STEWART, 2013; TAM, 2019), os quais demandam constante preocupação da comunidade científica, e para os quais *Bt* tem sido visto como alternativa interessante. Em diversos países, as doenças infecciosas, a resistência microbiana e o desenvolvimento de células cancerígenas estão entre os problemas de saúde pública de maior prevalência na sociedade humana (BRAY; FERLAY; SOERJOMATARAM, 2018; DVM et al., 2017; PRESTINACI; PEZZOTTI; PANTOSTI, 2015). Nos últimos 30 anos, pelo menos 30 novas doenças infecciosas surgiram para ameaçar a saúde de milhões de pessoas, e a incidência e mortalidade por câncer continuam crescendo (BRAY; FERLAY; SOERJOMATARAM, 2018; MANCHANDA et al., 2018). Diante deste cenário, entende-se a contínua necessidade de estudos que possam desenvolver mecanismos alternativos e eficientes para o controle dessas patologias. Neste estudo, encontrou-se 58 artigos de pesquisa empírica com *Bt* com foco em atividades antibacterianas, o que demonstra o interesse dos pesquisadores em investigar e explorar novas fontes bioativas que possam complementar ou substituir antimicrobianos convencionais. Interessante notar que os estudos sobre bioatividades (extratos e compostos) produzidos por *Bt* (ex. Zwittermicin A, Thuricin CD e Lantibioticos, entre outros com atividade antimicrobiana; REA et al., 2011; WEN et al., 2008; XIN et al., 2016) talvez tenham incentivado a expansão do seu uso para outras áreas, tais como o (bio)controle de vários patógenos de animais e plantas.

Dentre os temas investigados com maior percentual de retorno/aceite de publicações neste estudo, vale ressaltar os 30 artigos encontrados sobre bio-/fitorremediação (Tabela 3). Estes estudos primários investigaram a capacidade de *Bt* em remediar uma gama de poluentes, incluindo resíduos químicos, compostos orgânicos, metais pesados e combustíveis fósseis que estão entre as principais fontes de poluição encontradas em todo o planeta (MUEDI, 2018). O interesse da comunidade científica neste tema vem aparentemente crescendo de modo rápido, dado que as publicações específicas obtidas com essa *string* se acumularam em anos mais recentes (ver Resultados). Pode-se cogitar que os níveis atuais de degradação ambiental e dos serviços ecossistêmicos, com a percepção de que a manutenção desses serviços é essencial direta e indiretamente para a saúde e bem-estar humanos

(ex. PEDUZZI, 2019; ZARI; MAINGUY, 2019), podem ajudar a explicar este crescente interesse em bioatividades voltadas para despoluição e recuperação de áreas degradadas.

As atividades alternativas com potencial biotecnológico de *Bt* estudadas neste trabalho estão inseridas em três grandes áreas do conhecimento, cuja pesquisa científica enfrenta enormes desafios associados à necessidade de se integrar qualidade de vida, desenvolvimento econômico e sustentabilidade ambiental. Tais desafios (ex. processos de urbanização, industrialização, mineração, agricultura, pecuária, trânsito de espécies exóticas, poluição, mudança da matriz energética, entre outros) estão entre os principais fatores responsáveis pela perda de recursos naturais, alterações climáticas, extinção em massa de espécies, e rearranjos na biodiversidade do planeta (ELLIS et al., 2011; OPOKU, 2019; PEDUZZI, 2019; ZARI; MAINGUY, 2019). Neste contexto, os conhecimentos disponíveis sobre características e atividades do genoma de *Bt* sugerem a exploração deste microrganismo em diversas atividades voltadas para a medicina, saúde, agricultura e meio ambiente (BERG et al. 2013; FERNÁNDEZ-CHAPA; RAMÍREZ-VILLALOBOS; GALÁN-WONG, 2019). Os resultados encontrados neste estudo sobre atividades inibitórias de *Bt* contra variados alvos relevantes (ANDREEVA et al., 2014; DAAS et al., 2018; RAMAMOORTHY et al., 2018), bem como efeitos benéficos em sistemas tri-tróficos (CUI et al., 2017; JIANG et al., 2018; VAZ et al., 2018) ressaltam as grandes possibilidades do seu uso para além do seu efeito inseticida. Durante várias décadas, o estudo e caracterização de cepas desta bactéria focou na sua vertente de utilização como agente de controle biológico de insetos-praga (ex. GOMES et al., 2011; LOGUERCIO et al., 2001; OSMAN; SALEM; GHATTAS, 1988; PALMA et al., 2014 veja mais abaixo), deixando a ecologia e evolução de *Bt* abertas a debates: patógeno de insetos (RUAN et al., 2015), patógeno ambiental multi-hospedeiro (LOGUERCIO; ARGOLLO-FILHO, 2015), ou ambos (HENDRIKSEN, [s.d.]). As diversas e variadas atividades encontradas para *Bt* (JOUZANI, 2017; este estudo), muito como reflexo de sua constituição pangenômica (FANG et al., 2011), ressaltam a versatilidade fisiológica dessa bactéria, o que pode explicar assim seu grande potencial bioeconômico além da atividade inseticida. Apesar das atividades citotóxicas, hemolíticas, genotóxicas e antiviral de isolados de *Bt* terem sido encontradas em muito baixa frequência no conjunto de

artigos revisados (Fig. 1), acreditamos que as pesquisas sobre essas atividades ainda estão em fases iniciais de geração de conhecimento e exploração de potencialidades.

Até a década de 1970, já havia transcorrido 32 anos de estudos sobre *Bt* inseticida, sendo que vários produtos derivados destas bactérias (ex. Sporeine, Thuricide and DiPel; MILNER, 1994; SANAHUJA et al., 2011) já eram disponíveis no mercado, com ampla utilização na agricultura (TEAKLE, 1994). Mesmo assim, o foco dos estudos científicos continuava sendo sobre toxinas de *Bt* como inseticidas para o controle de pragas de interesse agrônomo, ainda que já houvesse indicativos do potencial para atividades alternativas, como antifúngica (PAIK et al., 1997), biorremediadora (WAGNER-DOBLER et al., 1992), antibacteriana (Cherif. 2003), promotora de crescimento em plantas (SAUKA, 2017), entre outras funcionalidades. O desenvolvimento das técnicas de genética e biologia molecular neste período estava em estágios iniciais (WOODGETT; LOUGHLIN, 2016). Desta forma, as informações sobre os genomas de *Bt* eram limitadas, o que provavelmente dificultou uma maior ênfase das pesquisas nessas atividades alternativas não-inseticidas de *Bt*.

Avanços mais recentes das tecnologias 'ômicas' (genômica, transcriptômica, proteômica, metabolômica, etc) aprofundaram a percepção da diversidade e riqueza biológica dos genomas das espécies de *Bacillus* e também entre diferentes subespécies e estirpes de *Bt* (BERG et al., 2013). Esse avanço não somente permitiu o estudo de possíveis polifuncionalidades das proteínas Cry como também a descoberta de novos genes com novas atividades bioativas específicas para o controle de uma variedade de organismos, incluindo bactérias, fungos, vírus, nematódeos, protozoários, ácaros, além de células cancerígenas (JOUZANI, 2017).

A maior parte das pesquisas encontradas com foco em *Bt* não-inseticidas parecem estar atreladas a atividades de interesse em saúde pública, ainda que estudos em agricultura não possam ser negligenciados (Fig. 1, Tabela 4 e 5). Essas atividades foram estudadas em países cuja localização geográfica, densidade populacional e desenvolvimento econômicos são fatores que apontam para condições gerais de saúde dessas nações que requerem atenção da pesquisa científica em vários de seus aspectos. A Ásia, América Latina e África são continentes com altas prevalências de doenças tropicais infecciosas (HOTEZ, 2014). Em geral, suas regiões são atingidas por doenças negligenciadas que afetam populações com condição socioeconômica vulnerável, que vivem em áreas distantes do alcance dos serviços de

saúde (BOUTAYEB, 2007; HOTEZ; AKSOY, 2011). A alta quantidade de pesquisas realizadas na Ásia, principalmente sobre atividades antibacteriana e bio-/fitorremediação, pode ser explicada por alguns fatores. Por exemplo, problemas de saúde pública associados a condições de infraestrutura em desenvolvimento, bem como terapias antimicrobianas e desfechos clínicos inapropriados foram sugeridos como alguns desses fatores que podem determinar foco de pesquisa nas atividades antimicrobianas de *Bt* (KANG; SONG, 2013). Já as pesquisas por atividades de bio/fitorremediação provavelmente teriam situações preocupantes de degradação e contaminação de solos pelas diversas ações antropogênicas, como agricultura (GONZÁLEZ et al., 2018) industrialização e mineração (LI et al., 2014) como motivações para a pesquisa. Devido muito provavelmente a sua superpopulação, a China tem apresentado uso muito intenso de agentes antimicrobianos convencionais, o que tem levado à prevalência de patógenos multirresistentes; microrganismos como *Staphylococcus aureus* resistente a metilina é uma realidade e está entre os problemas de saúde pública mais preocupantes neste país (CUI et al., 2017; ver mais abaixo). A existência de estudos sobre atividade anticâncer de *Bt* encontrados em países do continente Asiático também foi frequente, com destaque para instituições pertencentes ao Japão. Isto pode estar associado a grande preocupação com os dados clínicos observados anualmente sobre a crescente taxa de mortalidade de pacientes ocorridas principalmente por câncer, há mais de 30 anos (NAGAO; TSUGANE, 2016). Acredita-se que o fator preponderante para esta elevada taxa de pacientes com câncer no Japão pode estar associada aos efeitos provocados pela exposição à radiação das bombas nucleares da II Guerra Mundial (UTADA et al., 2019). Mudanças no estilo de vida, com incremento de fatores de riscos como tabagismo, bebidas alcóolicas e infecções diversas, também podem ter contribuído para este fenômeno (INOUE et al., 2012).

As possibilidades de ampla utilização de *Bt* em diversas atividades e finalidades biotecnológicas têm levado a pesquisas relevantes do ponto de vista quali- e quantitativo, as quais não se restringem apenas aos benefícios para a agricultura como agente de biocontrole de insetos-praga pela gama de atividades inseticidas. O maior volume de estudos sobre atividades diretas de *Bt*, com ênfase marcante para alvos bacterianos (Tabela 4) pode ser atribuída a constante necessidade em se descobrir novos agentes/atividades antimicrobianas, a partir de fontes alternativas

(BRAY; FERLAY; SOERJOMATARAM, 2018; PARRA-SALDIVAR; CENTELLA; AR, 2017); isto se deve principalmente aos problemas de saúde causados por infecções microbianas hospitalares que podem ser provocadas por cepas patogênicas multi- ou pan-resistentes aos antibióticos convencionais (CUI et al., 2017; DEMAÏN; SANCHEZ, 2009; VINCENT; DENIS, 2008). Estas condições de relevância e repercussão mundial também ajudam a explicar o maior volume de cepas de *Bt* e alvos testados para esta atividade direta (Tabela 4). Como consequência, e pela natureza deste tipo de estudo prospectivo, maiores quantidades de cepas e alvos requerem avaliações simultâneas, em condições similares, para a seleção de isolados mais promissores (ex. GOMES et al., 2011; LOGUERCIO et al., 2002). Assim sendo, experimentos de confronto de dupla cultura tendem a ser aplicados inicialmente, o que justifica não apenas a grande predominância de condições *in vitro* para os estudos investigados, mas também a tendência para maior presença de avaliações baseadas na zona de inibição (Tabela 4).

Algumas regiões degradadas apresentam condições desfavoráveis para a agricultura (SHARMA et al., 2015). Essas regiões exigem ações de recuperação de suas áreas, o que surge como fator estimulante às pesquisas por atividades alternativas específicas de *Bt*, tais como bio-/fitorremediação (veja acima). De modo similar, o estabelecimento de plantas industriais nos moldes do último século tendem a produzir poluentes e contaminantes que se acumulam tanto em solo quanto em cursos d'água e ambientes aquáticos (AHMAD et al., 2012). Assim, o uso de microrganismos e plantas para diminuir esses problemas tem sido uma das estratégias mais eficazes e promissoras dos pontos de vista econômico e de impactos ambientais (MOJIRI et al., 2013). Como um importante membro do gênero *Bacillus*, *Bt* demonstra capacidade de colonizar diferentes hospedeiros e ambientes (ARGÔLO-FILHO et al., 2014), atuar como endófito e/ou rizobactéria (ASHRAF; BANO; ALI, 2019; BABU; KIM; OH, 2013), produzir fitohormônios (EGAMBERDIEVA et al., 2017) e compostos bioativos (PEREZ et al., 2017; RAMAMOORTHY et al., 2018). Assim, uma outra atividade alternativa de *Bt* de característica indireta que vem, nas últimas décadas, aumentando sua importância para agricultura com sustentabilidade (KISHORE, 2006; REVIEW et al., 2016) são os chamados 'efeitos benéficos' (KISHORE, 2006; VEJAN et al., 2016), com destaque para promoção de crescimento em plantas (BHATTACHARYYA; JHA, 2012; QI et al., 2016). Os resultados de nossa

busca (Tabelas 4 e 5) demonstraram a existência de linhas de investigação nessa direção, com possibilidades claras de ampliar o leque de opções biotecnológicas para esta bactéria, inclusive com mais de uma atividade presente na mesma cepa (ex. ASHRAF; BANO; ALI, 2019; EGAMBERDIEVA et al., 2017; JOUZANI, 2017). Ainda se considerando as atividades indiretas, verificou-se uma maior frequência de experimentos *in vivo* nessa categoria, uma vez que se trata de atividades que envolvem a participação de um terceiro organismo (plantas, em sua maioria) como membro de um sistema tri-trófico (Tabela 5).

A partir dos dados obtidos nesta pesquisa pudemos observar que os compostos e bioprodutos que podem ser formulados a partir desta bactéria certamente contribuirão para ampliar as opções e estratégias de produção agrícola sustentável, com segurança ambiental e condições mais acessíveis de distribuição e comercialização. Por exemplo, os compostos bioativos que podem ser sintetizados por diferentes cepas de *Bt* demonstraram potencialidades para a produção de medicamentos alternativos para o combate a uma gama de patógenos multirresistentes (ROY et al., 2013). *Bt* também tem apresentado potencialidade para utilização em áreas degradadas e contaminadas, participando de sistemas de limpeza e restauração ambiental. Nosso planeta caminha na direção de uma bioeconomia (BUGGE; HANSEN; KLITKOU, 2016; VALLI; RUSSO; BOLZANI, 2018) que permita mitigar um sem-número de processos degradadores da biodiversidade e dos serviços ecossistêmicos (PEDUZZI, 2019; ZARI; MAINGUY, 2019). Também há questões ainda não plenamente resolvidas relacionadas ao sistema de registro de bioprodutos e à abrangência de suas aplicabilidades (ex. BHATTACHARYYA; JHA, 2012; CHOJNACKA; ACCESS, 2015). Neste contexto, pode-se considerar vantajoso para um produto biotecnológico ser multifuncional, característica esta que está claramente presente no mundo de *Bt* (ASHRAF; BANO; ALI, 2019; EGAMBERDIEVA et al., 2017; JOUZANI, 2017), cujas diversas atividades biológicas para além de sua clássica atividade entomopatogênica têm alto potencial de agregação de valor aos bioprodutos já existentes e potenciais derivados desta bactéria.

## 6. CONCLUSÕES

A literatura científica disponível online em três bancos de dados, a partir de palavras-chaves especificamente estabelecidas, permitiu recuperar número representativo de artigos científicos publicados que abordam atividades e funções não-inseticidas de *Bt* com potencial biotecnológico.

Esta revisão sistemática permitiu a identificação de 13 atividades não-inseticidas de *Bt* com potencial biotecnológico, sendo 10 consideradas como sendo de efeito direto e 3 como sendo de efeito indireto, esta última com a necessidade de uma relação tri-trófica entre os elementos do sistema de interação.

Os sistemas biológicos envolvidos que foram identificados nesta revisão relacionam-se com efeitos de *Bt* de naturezas antibacteriana, anticâncer, antifúngica, antiviral, nematocida, citotóxica, genotóxica, antiviral, de promoção de crescimento de plantas, de controle biológico de fitopatógenos, de aumento de tolerância de plantas a estresses abióticos, de biorremediação e de fitorremediação.

Dentre as 13 atividades não-inseticidas de *Bt* registradas nessa revisão observa-se que oito delas tem potencial de aplicação na área da saúde, três podem ser aplicadas em agricultura e duas oferecem potencial para melhorias voltadas para o meio ambiente.

O conteúdo observado nos artigos selecionados possibilitou a construção de um banco de dados com uma variedade de informações, cujas variáveis de análise incluem cepas de *Bt* testadas, espécies de plantas, microrganismos-alvo, condições experimentais *in vivo*, *in vitro* e *in situ*, e diversas outras específicas, características dos métodos de estudo mais apropriados para as 13 atividades não-inseticidas encontradas.

Os sistemas utilizados nos experimentos, e as informações temporais e geográficas (anos de publicação e países-sede das instituições de pesquisas) em que foram realizados os estudos indicaram espaço para mais investigações em áreas de saúde humana e veterinária, relacionadas às atividades citotóxica, hemolítica, genotóxica e antiviral, pois corresponderam a somente 8.4% dos estudos analisados.

## 7. REFERÊNCIAS

- AGRICULTURE, S. Next-Generation Bio-Products Sowing the Seeds of Success for Sustainable Agriculture. p. 648–656, 2013.
- AHMAD, F. et al. Biosensors and Bioelectronics Biofunctionalization of nanoparticle assisted mass spectrometry as biosensors for rapid detection of plant associated bacteria. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 35, n. 1, p. 235–242, 2012.
- ALI, S.; PARK, S.; KIM, W. The Pragmatic Introduction and Expression of Microbial Transgenes in Plants. v. 28, n. 12, p. 1955–1970, 2018.
- ANDREEVA, I. S. et al. Insecticidal, antimicrobial, and antiviral activity of *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* strains isolated from atmospheric aerosols in the South of Western Siberia. **Atmospheric and Oceanic Optics**, v. 27, n. 6, p. 479–486, 2014.
- BUNK et a. *Bacillus megaterium* and other bacilli: industrial applications: n. 41, 2010.
- ARGÔLO-FILHO, R. C. et al. Requirement of simultaneous assessment of crystal- and supernatant-related entomotoxic activities of *Bacillus thuringiensis* strains for biocontrol-product development. **Toxins**, v. 6, n. 5, p. 1598–1614, 2014.
- ARORA, N. K. Bioremediation: a green approach for restoration of polluted ecosystems. **Environmental Sustainability**, v. 1, n. 4, p. 305–307, 2018.
- ASHRAF, A.; BANO, A.; ALI, S. A. Characterisation of plant growth-promoting rhizobacteria from rhizosphere soil of heat-stressed and unstressed wheat and their use as bio-inoculant. v. 21, p. 762–769, 2019.
- ATES, O. Systems Biology of Microbial exopolysaccharides Production. v. 3, n. December, p. 1–16, 2015.
- BABU, A. G.; KIM, J. D.; OH, B. T. Enhancement of heavy metal phytoremediation by *Alnus firma* with endophytic *Bacillus thuringiensis* GDB-1. **Journal of Hazardous Materials**, v. 250–251, p. 477–483, 2013.
- BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria ( PGPR ): emergence in agriculture. p. 1327–1350, 2012.
- BOUTAYEB, A. International Journal for Equity in Developing countries and neglected diseases : challenges and. v. 4, p. 4–7, 2007.
- BRASSEUR, K. et al. Parasporin-2 from a new *Bacillus thuringiensis* 4r2 strain induces caspases activation and apoptosis in human cancer cells. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–22, 2015.
- BRAVO, A. et al. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 7, p. 423–431, 2011.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. p. 394–424, 2018.

BUGGE, M. M.; HANSEN, T.; KLITKOU, A. What Is the Bioeconomy? A Review of the Literature. 2016.

CELLS, C. Specific Cytotoxic Effects of Parasporal Crystal Proteins Isolated from Native Saudi Arabian *Bacillus thuringiensis* Strains against Cervical. [s.d.].

CHOJNACKA, K.; ACCESS, O. Innovative bio-products for agriculture. p. 932–937, 2015.

CUI, D. et al. Use of and microbial resistance to antibiotics in China: a path to reducing antimicrobial resistance. 2017.

CUI, J.-K. et al. Efficacy Evaluation of Seed-Coating Compounds Against Cereal Cyst Nematodes and Root Lesion Nematodes on Wheat. **Plant Disease**, v. 101, n. 3, p. 428–433, 2016.

DAAS, M. S. et al. Insights into the draft genome sequence of bioactives-producing *Bacillus thuringiensis* DNG9 isolated from Algerian soil-oil slough. p. 1–10, 2018.

DEMAIN, A. L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. n. January, p. 5–16, 2009.

DJENANE, Z. et al. Assessment of the antimicrobial activity and the entomocidal potential of *Bacillus thuringiensis* isolates from Algeria. **Toxins**, v. 9, n. 4, 2017.

DVM, J. F. L. et al. The consequences of human actions on risks for infectious diseases: a review. v. 8686, n. May, 2017.

ECOSYSTEMS, A.; ELSEVIER, E.; MILNER, J. History of *Bacillus thuringiensis*. v. 49, p. 9–13, 1994.

EGAMBERDIEVA, D. et al. Endophytic bacteria improve plant growth, symbiotic performance of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and induce suppression of root rot caused by *Fusarium solani* under salt stress. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. SEP, p. 1–13, 2017.

EHLING-SCHULZ, M.; LERECLUS, D.; KOEHLER, T. M. The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with Pathogenic Potential. p. 1–35, 2019.

ELLIS, C. J. et al. Archaeobotanical evidence for a massive loss of epiphyte species richness during industrialization in southern England Archaeobotanical evidence for a massive loss of epiphyte species richness during industrialization in southern England. n. April, 2011.

EREQAT, S. I. et al. Isolation and characterization of phenol degrading bacterium strain *Bacillus thuringiensis* J20 from olive waste in Palestine. **Journal of**

**Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, v. 53, n. 1, p. 39–45, 2018.

EZEONU, C. S. et al. Biotechnological Tools for Environmental Sustainability: Prospects and Challenges for Environments in Nigeria — A Standard Review. v. 2012, 2012.

F, P. G.; GONZÁLEZ, N. T. Phytoremediation of soils contaminated with heavy metals. v. 2, n. 4, p. 362–376, 2018.

FAN, B. et al. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* Form an “ Operational Group *B. amyloliquefaciens* ” within the *B. subtilis* Species Complex. v. 8, n. January, p. 1–15, 2017.

FANG, Y. et al. A pangenomic study of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 38, n. 12, p. 567–576, 2011.

FARIAS, D. F. et al. Evaluation of cytotoxic and antimicrobial effects of two *Bt* cry proteins on a GMO safety perspective. **BioMed Research International**, v. 2014, n. July, 2014.

FAUSTINO, A. et al. Biotechnology and Industry Microbiology Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 51–63, 2016.

FERNÁNDEZ-CHAPA, D.; RAMÍREZ-VILLALOBOS, J.; GALÁN-WONG, L. Toxic Potential of *Bacillus thuringiensis*: An Overview. p. 1–22, [s.d.].

GANESHKUMAR, P.; GOPALAKRISHNAN, S. Systematic reviews and meta-analysis: Understanding the best evidence in primary healthcare. **Journal of Family Medicine and Primary Care**, v. 2, n. 1, p. 9, 2013.

GOMES, R. A. et al. Growth variation among *Bacillus thuringiensis* strains can affect screening procedures for supernatant-secreted toxins against insect pests. n. April, p. 1184–1192, 2011.

GUDIOL, C.; CARRATALA, J. Antibiotic resistance in cancer patients. v. 12, n. 8, p. 1003–1016, 2014.

HASHEM, A. et al. Saudi Journal of Biological Sciences *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 6, p. 1291–1297, 2019.

HELGASON, E. et al. One Species on the Basis of Genetic Evidence. v. 66, n. 6, p. 2627–2630, 2000.

HENDRIKSEN, N. B. The Two Lives of *Bacillus thuringiensis*: Response to Ruan et al. and Loguercio and Argôlo-Filho. **Trends in Microbiology**, v. xx, p. 11–12, [s.d.].

HOTEZ, P. J. Ten Global “ Hotspots ” for the Neglected Tropical Diseases. v. 8, n. 5,

p. 3–6, 2014.

HOTEZ, P. J.; AKSOY, S. An Interfaith Dialogue on the Neglected Tropical Diseases. v. 5, n. 12, p. 1–3, 2011.

INOUE, M. et al. Attributable causes of cancer in Japan in 2005 — systematic assessment to estimate current burden of cancer attributable to known preventable risk factors in Japan. n. November 2011, p. 1362–1369, 2012.

JASIM, B. et al. Effect of endophytic *Bacillus* sp. from selected medicinal plants on growth promotion and diosgenin production in *Trigonella foenum-graecum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 122, n. 3, p. 565–572, 2015.

JHA, S. S.; JOSHI, S. J.; GEETHA, S. J. Lipopeptide production by *Bacillus subtilis* R1 and its possible applications. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1–10, 2016.

JIANG, J. et al. Combined remediation of Cd-phenanthrene co-contaminated soil by *Pleurotus cornucopiae* and *Bacillus thuringiensis* FQ1 and the antioxidant responses in *Pleurotus cornucopiae*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 120, p. 386–393, 2015.

JIANG, Y. et al. Comparison of transgenic *Bt* rice and their non-*Bt* counterpart in yield and physiological response to drought stress. **Field Crops Research**, v. 217, n. August 2017, p. 45–52, 2018.

JOSEPH, B. From *Bacillus subtilis* as a novel drug against diabetic foot ulcer bacterial pathogens B acteriocin. v. 3, n. 12, p. 942–946, 2013.

JOUZANI, G. S. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. 2017.

KANG, C.; SONG, J. Antimicrobial Resistance in Asia: Current Epidemiology and Clinical Implications. v. 45, n. 1, p. 22–31, 2013.

KHAN, N.; BANO, A. Effects of exogenously applied salicylic acid and putrescine alone and in combination with rhizobacteria on the phytoremediation of heavy metals and chickpea growth in sandy soil. **International Journal of Phytoremediation**, v. 20, n. 5, p. 405–414, 2018.

KISHORE, G. K. Plant growth-promoting rhizobacteria. n. Table 1, p. 195–230, 2006.  
KITCHENHAM, B. Procedures for Performing Systematic Reviews. [s.d.].

KITCHENHAM, B.; BRERETON, P. A systematic review of systematic review process research in software engineering. **Information and Software Technology**, v. 55, n. 12, p. 2049–2075, 2013.

KUMAR, P. et al. Extending the limits of *Bacillus* for novel biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1543–1561, 2013.

KURATA, A. et al. Characterization and heterologous expression of an antimicrobial

peptide from *Bacillus amyloliquefaciens* CMW1. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 33, n. 1, p. 886–893, 2019.

LEE, R. **The outlook for population growth** *Science*, 2011.

LEE, T. et al. Characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* DA12 Showing Potent Antifungal Activity against Mycotoxigenic *Fusarium* Species. v. 33, n. 5, p. 499–507, 2017.

LI, Z. et al. Science of the Total Environment A review of soil heavy metal pollution from mines in China: Pollution and health risk assessment. **Science of the Total Environment**, v. 468–469, p. 843–853, 2014.

LOGUERCIO, L. L. et al. Association of PCR and feeding bioassays as a large-scale method to screen tropical *Bacillus thuringiensis* isolates for a cry constitution with higher insecticidal effect against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera : Noctuidae ) larvae. p. 362–367, 2001.

LOGUERCIO, L. L. et al. Combined analysis of supernatant-based feeding bioassays and PCR as a first-tier screening strategy for Vip -derived activities in *Bacillus thuringiensis* strains effective against tropical fall armyworm. p. 269–277, 2002.

LOGUERCIO, L. L.; ARGO, R. C. Anthropogenic action shapes the evolutionary ecology of *Bacillus thuringiensis*: response to Ruan et al. p. 1–2, 2015.

MAJIDIAN, P.; TABATABAEI, M.; ZEINOLABEDINI, M. Metabolic engineering of microorganisms for biofuel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 1, n. October, p. 1–23, 2017.

MALANICHEVA, I. A. et al. New Antibiotics Produced by *Bacillus subtilis* Strains. v. 83, n. 4, p. 352–356, 2014.

MANCHANDA, Y. et al. Controversies in the Management of Cutaneous Adverse Drug Reactions Systemic Corticosteroids in the Management of SJS / TEN : Is it Still. **Indian Journal of Dermatology**, v. 63, n. 2, p. 125–130, 2018.

MEER, J. W. M. VAN DER; STATES, U.; STEWART, W. H. The infectious disease challenges of our time. v. 1, n. March, p. 1–2, 2013.

MIAN, P. et al. A Systematic Review Process for Software Engineering. **Empirical Software Engineering**, v. 32, n. 3, p. 1–6, 2007.

MOAZAMIAN, E. et al. Anti-cancer Parasporin Toxins of New *Bacillus thuringiensis* Against Human Colon (HCT-116) and Blood (CCRF-CEM) Cancer Cell Lines. **Current Microbiology**, v. 75, n. 8, p. 1090–1098, 2018.

MOJIRI, A. et al. Full Length Research Paper Phytoremediation of Heavy Metals from Urban Waste Leachate by Southern Cattail. v. 1, n. 4, p. 63–70, 2013.

MUEDI, L. Environmental Contamination Environmental Contamination by Heavy

Heavy Metals Metals. 2018.

NAGAO, M.; TSUGANE, S. Cancer in Japan: Prevalence , prevention and the role of heterocyclic amines in human carcinogenesis. **Genes and Environment**, p. 1–8, 2016.

NAIR, K. et al. Diversity of *Bacillus thuringiensis* Strains From Qatar as Shown by Crystal Morphology ,  $\delta$  -Endotoxins and Cry Gene Content. n. December, 2018.

OPOKU, A. Biodiversity and the built environment: Implications for the Sustainable Development Goals ( SDGs ) Resources , Conservation & Recycling Biodiversity and the built environment: Implications for the Sustainable Development Goals ( SDGs ). **Resources, Conservation & Recycling**, v. 141, n. September, p. 1–7, 2019.

OSMAN, G. Y.; SALEM, F. M.; GHATTAS, A. Bio-efficacy of two bacterial insecticide strains of *Bacillus thuringiensis* as a biological control agent in comparison with a nematocide, nemacur, on certain parasitic nematoda. **Anzeiger für Schädlingskunde Pflanzenschutz Umweltschutz**, v. 61, n. 2, p. 35–37, 1988.

PAIK, H. D. et al. Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis subsp tochigiensis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 4, p. 294–298, 1997.

PALMA, L. et al. *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. n. December, 2014.

PARRA-SALDIVAR, R.; CENTELLA, M. H.; AR, A. Marine-derived bioactive compounds for value-added applications in bio- and non-bio sectors. p. 1–7, 2017.

PEDUZZI, P. The Disaster Risk , Global Change , and Sustainability Nexus. p. 1–21, 2019.

PÉREZ-GARCÍA, A.; ROMERO, D.; DE VICENTE, A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: Biotechnological applications of *Bacilli* in agriculture. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 187–193, 2011.

PEREZ, K. J. et al. *Bacillus* spp . Isolado de Puba como fonte de biossurfactantes e lipopeptídeos antimicrobianos Abstrato Introdução Materiais e métodos. 2017.

PERIYASAMY, A. et al. Screening and characterization of a non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* strain producing parasporal protein with selective toxicity against human colon cancer cell lines. **Annals of Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 1167–1178, 2016.

PLÁCIDO, A. et al. Antibacterial activity of novel peptide derived from Cry1Ab16 toxin and development of LbL films for foodborne pathogens control. **Materials Science and Engineering C**, v. 75, p. 503–509, 2017.

PRESTINACI, F.; PEZZOTTI, P.; PANTOSTI, A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. **Pathogens and Global Health**, p. 1–10, 2015.

QI, J. et al. Potential of Entomopathogenic *Bacillus thuringiensis* as Plant Growth

Promoting Rhizobacteria and Biological Control Agents for Tomato Fusarium Potential of Entomopathogenic *Bacillus thuringiensis* as Plant Growth Promoting Rhizobacteria and Biological Cont. n. June, 2016.

RADHAKRISHNAN, R.; HASHEM, A.; ABD ALLAH, E. F. *Bacillus*: A biological tool for crop improvement through bio-molecular changes in adverse environments. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. SEP, p. 1–14, 2017.

RAMAMOORTHY, S. et al. Structural characterization and anticancer activity of extracellular polysaccharides from ascidian symbiotic bacterium *Bacillus thuringiensis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 190, p. 113–120, 2018.

REA, M. C. et al. Effect of broad- and narrow-spectrum antimicrobials on *Clostridium difficile* and microbial diversity in a model of the distal colon. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. Supplement\_1, p. 4639–4644, 2011.

REVIEW, A. S. A. et al. Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in. p. 1–17, 2016.

REZAC, S. et al. Fermented Foods as a Dietary Source of Live Organisms. v. 9, n. August, 2018.

ROY, A. et al. Purification , biochemical characterization and self-assembled structure of a fengycin-like antifungal peptide from *Bacillus thuringiensis* strain SM1. v. 4, n. November, p. 1–6, 2013.

RUAN, L. et al. Are nematodes a missing link in the confounded ecology of the entomopathogen *Bacillus thuringiensis*? **Trends in Microbiology**, p. 1–6, 2015.

SANAHUJA, G. et al. *Bacillus thuringiensis*: A century of research, development and commercial applications. **Plant Biotechnology Journal**, v. 9, n. 3, p. 283–300, 2011.

SARWAR, N. et al. Chemosphere Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals : Modifications and future perspectives. **Chemosphere**, v. 171, p. 710–721, 2017.

SAUKA, D. H. *Bacillus thuringiensis*: ¿ nuevas aplicaciones para un viejo conocido? *Bacillus thuringiensis*: New applications for an old acquaintance? **Revista Argentina de Microbiología**, v. 49, n. 2, p. 123–124, 2017.

SCHWINGHAMER, T. et al. The Plant Growth Regulator Lipo-chitooligosaccharide (LCO) Enhances the Germination of Canola (*Brassica napus* [L.]). **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 34, n. 1, p. 183–195, 2015.

SHAFI, J.; TIAN, H.; JI, M. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens : a review. v. 2818, n. March, 2017.

SHARMA, A. et al. Deciphering Diversity of Salt-Tolerant *Bacilli* from Saline Soils of Eastern Indo-gangetic Plains of India. **Geomicrobiology Journal**, v. 32, n. 2, p. 170–180, 2015.

SINGH, M.; PATEL, S. K. S.; KALIA, V. C. *Bacillus subtilis* as potential producer for polyhydroxyalkanoates. v. 11, p. 1–11, 2009.

SINGH, S.; KUMAR, B. Potential application spectrum of microbial proteases for clean and green industrial production. **Energy, Ecology and Environment**, 2017.

SONI, A. et al. *Bacillus* Spores in the Food Industry : A Review on Resistance and Response to Novel Inactivation Technologies. v. 15, p. 1139–1148, 2016.

TAM, A. Bigger and Better ? Representativeness of the Influenza A Surveillance Using One Consolidated Clinical Microbiology Laboratory Data Set as Compared to the Belgian Sentinel Network of Laboratories. v. 7, n. June, p. 1–8, 2019.

TEAKLE, R. E. Present use of , and problems with , *Bacillus thuringiensis* in. v. 49, p. 39–44, 1994.

UTADA, M. et al. Radiation Risks of Uterine Cancer in Atomic Bomb Survivors : 1958 – 2009. v. 2, p. 2–7, 2019.

VALLI, M.; RUSSO, H. M.; BOLZANI, V. S. The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. v. 90, p. 763–778, 2018.

VAZ, K. S. et al. Plant-associated bacteria mitigate drought stress in soybean. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 14, p. 13676–13686, 2018.

VINCENT, S.; DENIS, B. Review article *Bacillus thuringiensis*: applications in agriculture and insect resistance management . A review. v. 28, p. 11–20, 2008.

VITORINO, L. C.; BESSA, L. A. Technological Microbiology : Development and Applications. v. 8, n. May, p. 1–23, 2017.

VOS, P. DE; LEDEGANCKSTRAAT, K. L.; B-, G. **Cohn 1872, 174**. [s.l: s.n.].

WAGNER-DOBLER, I. et al. Evaluation of aquatic sediment microcosms and their use in assessing possible effects of introduced microorganisms on ecosystem parameters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 4, p. 1249–1258, 1992.

WEN, X. et al. Purification and Detection of Zwittermicin A from *Bacillus Thuringiensis*. 2008.

WOODGETT, J.; LOUGHLIN, D. T. Enabling the Next 25 Years of Cell Biology. **Trends in Cell Biology**, v. xx, p. 2–4, 2016.

WU, R. et al. Cost-effective fibrinolytic enzyme production by *Bacillus subtilis* WR350 using medium supplemented with corn steep powder and sucrose. n. January, p. 1–10, 2019.

XIAO, Y.; WU, K. Recent progress on the interaction between insects and *Bacillus thuringiensis* crops. 2019.

XIN, B. et al. Thusin, a novel two-component lantibiotic with potent antimicrobial activity against several Gram-positive pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JUL, p. 1–12, 2016.

YUDINA, T. G. et al. Antimicrobial activity of different proteins and their fragments from *Bacillus thuringiensis* parasporal crystals against clostridia and archaea. **Anaerobe**, v. 13, n. 1, p. 6–13, 2007.

ZARI, M. P.; MAINGUY, G. Ecosystem Services Analysis in Response to Biodiversity Loss Caused by the Built Environment. v. 7, n. May, 2019.

ZHANG, F. et al. In Vitro Uptake of 140 kDa *Bacillus thuringiensis* Nematicidal Crystal Proteins by the Second Stage Juvenile of *Meloidogyne hapla*. v. 7, n. 6, 2012.

ZHANG, L. et al. Interaction of *pseudostellaria heterophylla* with quorum sensing and quorum quenching bacteria mediated by root exudates in a consecutive monoculture system. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 12, p. 2159–2170, 2016.

ZHENG, D. et al. *Bacillus thuringiensis* produces the lipopeptide thumolycin to antagonize microbes and nematodes. **Microbiological Research**, v. 215, p. 22–28, 2018.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

**Tabela SM1** Banco de dados geral dos 128 artigos aceitos/selecionados para esta revisão sistemática.

| <b>Autores</b>                | <b>Link de acesso</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|-------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Abderrahmani et al. 2011      | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21751008">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21751008</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Abe et al. 2017               | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27863961">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27863961</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Aceves-Diez et al. 2015       | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25910975">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25910975</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Adewale et al. 2015           | <a href="https://www.researchgate.net/publication/282651721_Antimicrobial_and_enzymatic_activities_of_endophytic_bacteria_isolated_from_Mentha_spicata_MINT/download">https://www.researchgate.net/publication/282651721_Antimicrobial_and_enzymatic_activities_of_endophytic_bacteria_isolated_from_Mentha_spicata_MINT/download</a>                                                                                     |
| Adriano et al. 2018           | <a href="https://www.degruyter.com/downloadpdf/j/eces.2018.25.issue-3/eces-2018-0032/eces-2018-0032.pdf">https://www.degruyter.com/downloadpdf/j/eces.2018.25.issue-3/eces-2018-0032/eces-2018-0032.pdf</a>                                                                                                                                                                                                               |
| Agüero-Chapin et al. 2011     | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20563611">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20563611</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Alharbi et al. 2014           | <a href="https://www.researchgate.net/publication/282074949_Impact_of_Some_Bacillus_sppInducer_Resistant_Chemicals_and_Cows_s_kim_milk_on_Management_of_Pepper_Powdery_Mildew_Disease_In_Saudi_Arabia/download">https://www.researchgate.net/publication/282074949_Impact_of_Some_Bacillus_sppInducer_Resistant_Chemicals_and_Cows_s_kim_milk_on_Management_of_Pepper_Powdery_Mildew_Disease_In_Saudi_Arabia/download</a> |
| Amano et al. 2005             | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16306686">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16306686</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Andreeva et al. 2014          | <a href="https://link.springer.com/article/10.1134/S1024856014060025">https://link.springer.com/article/10.1134/S1024856014060025</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Anil et al. 2012              | <a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501311000577">https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501311000577</a>                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Babu et al. 2013              | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23500429">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23500429</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Barboza-Corona et al. 2007    | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17031616">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17031616</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Barboza-Corona et al. 2009    | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19359107">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19359107</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Bibiana et al. 2014           | <a href="https://www.semanticscholar.org/paper/Screening-and-Evaluation-of-Marine-Bacteriocins-Bibiana-Nithyanand/0c93936eac8b0fc7180401d34771199599a3a184">https://www.semanticscholar.org/paper/Screening-and-Evaluation-of-Marine-Bacteriocins-Bibiana-Nithyanand/0c93936eac8b0fc7180401d34771199599a3a184</a>                                                                                                         |
| Brasseur et al. 2015          | <a href="https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0135106">https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0135106</a>                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Brillard et al. 2007          | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17555563">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17555563</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Cahan et al. 2008             | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18957605">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18957605</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Castañeda-Ramírez et al. 2011 | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21333148">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21333148</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Chan et al. 2012              | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22591286">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22591286</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Chehimi et al. 2007           | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17496978">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17496978</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Chen et al. 2015              | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25740758">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25740758</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Cherif et al. 2001            | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11298934">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11298934</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Cherif et al. 2003            | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14633027">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14633027</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Cherif et al. 2008            | <a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501306001297">https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501306001297</a>                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Chubicka et al. 2018          | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29872027">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29872027</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Cohen et al. 2007             | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17626007">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17626007</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Cui et al. 2017               | <a href="https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-06-16-0862-RE">https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-06-16-0862-RE</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Daas et al. 2018              | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6186030/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6186030/</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

|                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Dash et al. 2014                 | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24114385">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24114385</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Dash et al. 2014                 | <a href="https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10889868.2014.899555">https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10889868.2014.899555</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Dash et al. 2015                 | <a href="https://www.researchgate.net/publication/277339024_Bioremediation_of_inorganic_mercury_through_volatilization_and_biosorption_by_transgenic_Bacillus_cereus_BW-03pPW-05">https://www.researchgate.net/publication/277339024_Bioremediation_of_inorganic_mercury_through_volatilization_and_biosorption_by_transgenic_Bacillus_cereus_BW-03pPW-05</a>                                                                                                                                                                     |
| Dave et al. 2009                 | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18590958">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18590958</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| De la Fuente-Salcido et al. 2008 | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18654760">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18654760</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| De la Fuente-Salcido et al. 2012 | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3415160/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3415160/</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Djenane et al. 2017              | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5408213/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5408213/</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Egamberdieva et al. 2017         | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29033922">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29033922</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| El-Hag et al. 2011               | <a href="https://idosi.org/wjms/6(1)11/2.pdf">https://idosi.org/wjms/6(1)11/2.pdf</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Ereqat et al. 2018               | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28981398">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28981398</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Esnard et al. 1998               | <a href="https://link.springer.com/article/10.1023/A:1008638419552">https://link.springer.com/article/10.1023/A:1008638419552</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Farias et al. 2014               | <a href="https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/810490/">https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/810490/</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Favret et al. 1989               | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2723445">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2723445</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Galitskaya et al. 2014           | <a href="http://dspace.kpfu.ru/xmlui/bitstream/handle/net/139962/SCOPUS18184952-2014-30-11-SID84896259008-a1.pdf;jsessionid=28C97299EADBEB09425107A5F7C1A526?sequence=-1">http://dspace.kpfu.ru/xmlui/bitstream/handle/net/139962/SCOPUS18184952-2014-30-11-SID84896259008-a1.pdf;jsessionid=28C97299EADBEB09425107A5F7C1A526?sequence=-1</a>                                                                                                                                                                                     |
| Górny et al. 2019                | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30368144">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30368144</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Gutiérrez-Chávez et al. 2016     | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26022411">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26022411</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Hao et al. 2015                  | <a href="https://www.researchgate.net/publication/264546887_Extraction_of_Antibiotic_Zwittermicin_A_from_Bacillus_thuringiensis_by_Macroporous_Resin_and_Silica_Gel_Column_Chromatography">https://www.researchgate.net/publication/264546887_Extraction_of_Antibiotic_Zwittermicin_A_from_Bacillus_thuringiensis_by_Macroporous_Resin_and_Silica_Gel_Column_Chromatography</a>                                                                                                                                                   |
| Hu et al. 2013                   | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23835175">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23835175</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| HUANG et al. 2014                | <a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1002016014600515">https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1002016014600515</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Huang et al. 2016                | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5071883/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5071883/</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Ichikawa et al. 2008             | <a href="https://www.researchgate.net/publication/249887696_Failure_to_phenotypically_discriminate_between_non-insecticidal_Bacillus_thuringiensis_strains_with_antitumor_parasporins_PS2_PS3_and_PS4_and_Bacillus_thuringiensis_strains_that_produce_insecticidal">https://www.researchgate.net/publication/249887696_Failure_to_phenotypically_discriminate_between_non-insecticidal_Bacillus_thuringiensis_strains_with_antitumor_parasporins_PS2_PS3_and_PS4_and_Bacillus_thuringiensis_strains_that_produce_insecticidal</a> |
| Jasim et al. 2015                | <a href="https://link.springer.com/article/10.1007/s11240-015-0788-1">https://link.springer.com/article/10.1007/s11240-015-0788-1</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Jiang et al. 2015                | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26117363">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26117363</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Jiang et al. 2018                | <a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378429017313874">https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378429017313874</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Jorfi et al. 2017                | <a href="https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15320383.2017.1255875?journalCode=bssc20">https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15320383.2017.1255875?journalCode=bssc20</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Jung et al. 2008                 | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19047829">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19047829</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Kamounn et al. 2011              | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21487734">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21487734</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Kent et al. 2012                 | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22642665">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22642665</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Khan et al. 2017                 | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27739873">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27739873</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Khan et al. 2018                 | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28933563">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28933563</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Krishnan et al. 2010             | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2996362/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2996362/</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Kumar et al. 2015                | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25782590">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25782590</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |

|                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Kumar et al. 2016           | <a href="https://link.springer.com/article/10.1007/s11368-016-1398-1">https://link.springer.com/article/10.1007/s11368-016-1398-1</a>                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Kweon et al. 2012           | <a href="https://www.researchgate.net/publication/263622326_Isolation_characterization_and_evaluation_of_Bacillus_thuringiensis_isolated_from_cow_milk">https://www.researchgate.net/publication/263622326_Isolation_characterization_and_evaluation_of_Bacillus_thuringiensis_isolated_from_cow_milk</a>                                                                                                     |
| Li et al. 2015              | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25939805">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25939805</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Lucon et al. 2010           | <a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219410000542">https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219410000542</a>                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Luo et al. 2011             | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3165285/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3165285/</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Maddela et al. 2017         | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27928937">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27928937</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Mandal et al. 2013          | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23618775">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23618775</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Marchlewicz et al. 2016     | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4880631/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4880631/</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Marchlewicz et al. 2017     | <a href="http://www.czasopisma.pan.pl/dlibra/publication/117864/edition/102499/content/dynamics-of-ibuprofen-biodegradation-by-bacillus-sp-b1-2015b-ariel-marchlewicz-urszula-guzik-danuta-wojcieszynska">http://www.czasopisma.pan.pl/dlibra/publication/117864/edition/102499/content/dynamics-of-ibuprofen-biodegradation-by-bacillus-sp-b1-2015b-ariel-marchlewicz-urszula-guzik-danuta-wojcieszynska</a> |
| Marchlewicz et al. 2017     | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28116629">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28116629</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Martins et al. 2018         | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29502259">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29502259</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Masheva et al. 2016         | <a href="https://www.researchgate.net/publication/297715946_Use_of_microbioagents_to_reduce_soil_pathogens_and_root-knot_nematodes_in_greenhouse-grown_tomatoes">https://www.researchgate.net/publication/297715946_Use_of_microbioagents_to_reduce_soil_pathogens_and_root-knot_nematodes_in_greenhouse-grown_tomatoes</a>                                                                                   |
| Mathur et al. 2014          | <a href="https://aac.asm.org/content/58/6/3421">https://aac.asm.org/content/58/6/3421</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Mishra et al. 2009          | <a href="https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09064710802040558">https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09064710802040558</a>                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Mishra et al. 2012          | <a href="https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11274-011-0865-5">https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11274-011-0865-5</a>                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Mnif et al. 2015            | <a href="https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-015-4488-5">https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-015-4488-5</a>                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Moazamian et al. 2018       | <a href="https://www.researchgate.net/publication/324704917_Anti-cancer_Parasporin_Toxins_of_New_Bacillus_thuringiensis_Against_Human_Colon_HCT-116_and_Blood_CCRF-CEM_Cancer_Cell_Lines">https://www.researchgate.net/publication/324704917_Anti-cancer_Parasporin_Toxins_of_New_Bacillus_thuringiensis_Against_Human_Colon_HCT-116_and_Blood_CCRF-CEM_Cancer_Cell_Lines</a>                                 |
| Mora et al. 2015            | <a href="https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0127738">https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0127738</a>                                                                                                                                                                                                                                             |
| Nadarajah et al. 2008       | <a href="http://www.tm.mahidol.ac.th/seameo/2008_39_2/08-4186.pdf">http://www.tm.mahidol.ac.th/seameo/2008_39_2/08-4186.pdf</a>                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| NAGAMATSU et al. 2010       | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20208360">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20208360</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Namba et al. 2003           | <a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416503001028">https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416503001028</a>                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Nayak et al. 2016           | <a href="https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/ra/c5ra21281b#!divAbstract">https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/ra/c5ra21281b#!divAbstract</a>                                                                                                                                                                                                                                   |
| Onunga et al. 2015          | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25844859">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25844859</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Ortiz-Rodríguez et al. 2010 | <a href="https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1472-765X.2010.02876.x">https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1472-765X.2010.02876.x</a>                                                                                                                                                                                                                                             |
| Osman et al. 1998           | <a href="https://link.springer.com/article/10.1007/BF01905720">https://link.springer.com/article/10.1007/BF01905720</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Pacheco-Cano et al. 2014    | <a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501314000585">https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501314000585</a>                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Paik et al. 1997            | <a href="https://link.springer.com/article/10.1038/sj.jim.2900462">https://link.springer.com/article/10.1038/sj.jim.2900462</a>                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Perez et al. 2017           | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5281586/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5281586/</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Periyasamy et al. 2016      | <a href="https://link.springer.com/article/10.1007/s13213-016-1204-8">https://link.springer.com/article/10.1007/s13213-016-1204-8</a>                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Plácido et al. 2017         | <a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493116316046">https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493116316046</a>                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Prudent et al. 2015         | <a href="https://link.springer.com/article/10.1007/s13593-014-0256-z">https://link.springer.com/article/10.1007/s13593-014-0256-z</a>                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Ramamoorthy et al. 2018     | <a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861718302054">https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861718302054</a>                                                                                                                                                                                                                                                         |

|                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Rea et al. 2010           | <a href="https://www.researchgate.net/publication/43534906_From_the_Cover_Thuricin_CD_a_posttranslationally_modified_bacteriocin_with_a_narrow_spectrum_of_activity_against_Clostridium_difficile">https://www.researchgate.net/publication/43534906_From_the_Cover_Thuricin_CD_a_posttranslationally_modified_bacteriocin_with_a_narrow_spectrum_of_activity_against_Clostridium_difficile</a> |
| Rea et al. 2011           | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20616009">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20616009</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Rea et al. 2014           | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24287693">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24287693</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Revina et al. 2005        | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16091772">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16091772</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Rosenburg 1971            | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5111847">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5111847</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Roy et al. 2013           | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24312083">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24312083</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Sadfi et al. 2002         | <a href="https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1439-0434.2002.00811.x">https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1439-0434.2002.00811.x</a>                                                                                                                                                                                                                                 |
| SAITOH et al. 2006        | <a href="https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb/70/12/70_60352/_pdf/-char/em">https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb/70/12/70_60352/_pdf/-char/em</a>                                                                                                                                                                                                                                       |
| Sansinenea et al. 2016    | <a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040403916305238">https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040403916305238</a>                                                                                                                                                                                                                                           |
| Schwinghamer et al. 2015  | <a href="https://link.springer.com/article/10.1007/s00344-014-9456-7">https://link.springer.com/article/10.1007/s00344-014-9456-7</a>                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Shahzadi et al. 2013      | <a href="https://www.semanticscholar.org/paper/EFFECT-OF-BACTERIA-CONTAINING-ACC-DEAMINASE-ON-OF-Shahzadi-Khalid/1fb591b065a55b7504f2f1c64a941e21b59734ce">https://www.semanticscholar.org/paper/EFFECT-OF-BACTERIA-CONTAINING-ACC-DEAMINASE-ON-OF-Shahzadi-Khalid/1fb591b065a55b7504f2f1c64a941e21b59734ce</a>                                                                                 |
| Sharma et al. 2015        | <a href="https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01490451.2014.938205">https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01490451.2014.938205</a>                                                                                                                                                                                                                                               |
| Surhio t al. 2014         | <a href="https://pubs-rsc.org.ez85.periodicos.capes.gov.br/en/content/articlelanding/2014/RA/C4RA09465D#!divAbstract">https://pubs-rsc.org.ez85.periodicos.capes.gov.br/en/content/articlelanding/2014/RA/C4RA09465D#!divAbstract</a>                                                                                                                                                           |
| Suyamud et al. 2018       | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29627416">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29627416</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Ugras et al. 2013         | <a href="https://www.degruyter.com/document/doi/10.2478/s11756-013-0210-6/html">https://www.degruyter.com/document/doi/10.2478/s11756-013-0210-6/html</a>                                                                                                                                                                                                                                       |
| Ugras et al. 2013         | <a href="https://link.springer.com/article/10.2478/s11756-013-0210-6">https://link.springer.com/article/10.2478/s11756-013-0210-6</a>                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Verma et al. 2017         | <a href="https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/ra/c7ra05943d#!divAbstract">https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/ra/c7ra05943d#!divAbstract</a>                                                                                                                                                                                                                     |
| Vithiya et al. 2014       | <a href="https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84908216619&amp;partnerID=40&amp;md5=b1c83e8635e36e667ab0886c1de5bab2">https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84908216619&amp;partnerID=40&amp;md5=b1c83e8635e36e667ab0886c1de5bab2</a>                                                                                                                               |
| Wagner-Döbler et al. 1998 | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC106808/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC106808/</a>                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Wang et al. 2014          | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24798125">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24798125</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Wang et al. 2014          | <a href="https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0097121">https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0097121</a>                                                                                                                                                                                                                               |
| Wang et al. 2016          | <a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165616315334?via%3Dihub">https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165616315334?via%3Dihub</a>                                                                                                                                                                                                                     |
| Wang t al. 2014           | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24682301">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24682301</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Wen et al. 2008           | <a href="https://pdfs.semanticscholar.org/0df8/c69d8ed6f3cc5c2ecc0f065635666e8ebd5e.pdf?_ga=2.171800288.1718862591.1556294177-43323694.1555267233">https://pdfs.semanticscholar.org/0df8/c69d8ed6f3cc5c2ecc0f065635666e8ebd5e.pdf?_ga=2.171800288.1718862591.1556294177-43323694.1555267233</a>                                                                                                 |
| Wong et al. 2010          | <a href="https://jeccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-9966-29-86">https://jeccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-9966-29-86</a>                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Wu et al. 2008            | <a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964408002247?via%3Dihub">https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964408002247?via%3Dihub</a>                                                                                                                                                                                                                     |
| Wu et al. 2015            | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24243520">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24243520</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Xin et al. 2015           | <a href="https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.01115/full">https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.01115/full</a>                                                                                                                                                                                                                                             |
| Xin et al. 2016           | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27486447">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27486447</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Yu et al. 2015            | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25556591">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25556591</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Yudina et al. 2003        | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12674346">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12674346</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                         |

|                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Yudina et al. 2007   | <a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1075996406000758">https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1075996406000758</a>                                                                                                                                                                     |
| Yuniarti et al. 2015 | <a href="https://www.researchgate.net/publication/289916221_In_vitro_assessments_of_bacillus_as_a_potential_probiotic_in_shrimp_culture_of_east_java_Indonesia">https://www.researchgate.net/publication/289916221_In_vitro_assessments_of_bacillus_as_a_potential_probiotic_in_shrimp_culture_of_east_java_Indonesia</a> |
| Zhang et al. 2016    | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4721865/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4721865/</a>                                                                                                                                                                                                 |
| Zhang et al. 2016    | <a href="http://www.jmb.or.kr/journal/view.html?doi=10.4014/jmb.1607.07073">http://www.jmb.or.kr/journal/view.html?doi=10.4014/jmb.1607.07073</a>                                                                                                                                                                         |
| Zheng et al. 2018    | <a href="https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944-5013(17)31229-6">https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944-5013(17)31229-6</a>                                                                                                                                                                       |