



**UNIVERSIDADE DE UBERABA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E EXTENSÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA
MESTRADO PROFISSIONAL**

JOÃO VITOR ANDRADE BERNARDES

**CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO DE *Bacillus amyloliquefaciens*
CEPA BIB 0129**

UBERABA, MG

2024

**CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO DE *Bacillus amyloliquefaciens*
CEPA BIB 0129**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química – do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química - Mestrado Profissional da Universidade de Uberaba (PPGEQ-MP/UNIUBE).

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos Agroindustriais.

Orientador: Prof^ª Dr^ª Ana Cláudia Chesca

Coorientador: Prof^ª Dr^ª Gislaine Fernandes

UBERABA, MG

2024

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

B456c Bernardes, João Vitor Andrade.
Cinética de fermentação de *Bacillus amyloliquefaciens* cepa BIB 0129 / João Vitor Andrade Bernardes. – Uberaba, 2024.
57 f. : il., color.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Pós-Graduação Profissional em Engenharia Química. Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos Agroindustriais.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Cláudia Chesca.

Coorientadora: Profa. Dra. Gislaine Fernandes.

1. Ácidos orgânicos. 2. Fermentação. 3. Biotecnologia agrícola. I. Chesca, Ana Cláudia. II. Fernandes, Gislaine. III. Universidade de Uberaba. Programa de Pós-Graduação Profissional em Engenharia Química. IV. Título.

CDD 547.2

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, pela benção do conhecimento.

A minha família, em especial aos meus pais, por todo o apoio dado desde o início do curso, por sempre me incentivarem a estudar e que junto comigo também tiveram sua parcela de esforço e sacrifício para que este trabalho fosse concluído. Esta vitória é Nossa!

E a mim mesmo pelo esforço e dedicação em cada momento da execução desta pesquisa.

JOÃO VÍTOR ANDRADE BERNARDES

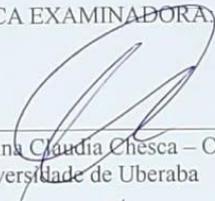
CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO DE *Bacillus amyloliquefaciens* CEPA BIB 0129

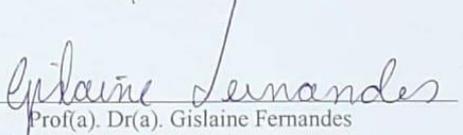
Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química - Mestrado Profissional da Universidade de Uberaba (PPGEQ-MP/UNIUBE).

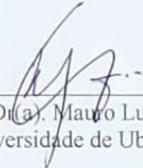
Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos Agroindustriais

Aprovado em: 05/06/2024

BANCA EXAMINADORA


Prof(a). Dr(a). Ana Cláudia Chesca – Orientadora
Universidade de Uberaba


Prof(a). Dr(a). Gislaine Fernandes
Instituto Federal do Triângulo Mineiro


Prof(a). Dr(a). Mauro Luiz Begnini
Universidade de Uberaba

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade da vida e por sempre se fazer presente me dando forças para vencer as dificuldades encontradas.

Aos meus pais Sandra e João Batista por serem os meus maiores incentivadores e por sempre me motivarem a correr atrás dos meus sonhos e objetivos.

A minha irmã Ana Flávia e a minha irmã de coração Josiane pelo auxílio, compreensão e carinho. Obrigado por estarem presentes em mais esse capítulo da minha vida!

A minha orientadora Ana Claudia Chesca por toda a confiança, incentivo e apoio ao longo de toda a pós-graduação.

A minha coorientadora Gislaine Fernandes e toda a equipe de técnicos do IFTM, pela troca de conhecimentos neste período.

A toda a equipe da *Biota Innovations*, por todo o apoio durante a execução do experimento, em especial a Isabel Paz e Alexandre Guimarães pela confiança e por tão prontamente terem aceitado a execução desta pesquisa dentro da empresa.

Aos meus amigos, pelas risadas e momentos de alegria e por sempre estarem ao meu lado fazendo com que esta caminhada fosse menos árdua e mais gratificante.

A todo o corpo docente da UNIUBE, pelos conhecimentos gerados ao longo da pós-graduação.

À CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG pelo suporte dado ao desenvolvimento dessa dissertação (Processos: MPR-01119-16; APQ-01221-23).

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente para a conclusão desta dissertação.

*“Se você quiser alguém em quem confiar
Confie em si mesmo
Quem acredita sempre alcança”*

Flávio Venturini e Renato Russo

RESUMO

Os microrganismos vêm sendo amplamente utilizados para formulações de bioinsumos, principalmente bactérias do gênero *Bacillus*. Entre elas podemos citar a espécie *Bacillus amyloliquefaciens*, bactéria que possui ampla utilização na biotecnologia e agricultura devido a sua capacidade de solubilizar fosfato, fixar nitrogênio e induzir a resistência sistêmica em plantas. Em fermentações em escala industrial é de suma importância o conhecimento do microrganismo, desde os seus aspectos morfológicos, até o seu comportamento, como o tempo de cultivo, velocidades de crescimento, taxas de conversão de substrato e produto, como também sua resposta aos diferentes meios de cultivo. Este trabalho teve como objetivo realizar o estudo de cinética de fermentação de *Bacillus amyloliquefaciens* cepa BIB 0129, determinando as velocidades específicas de crescimento, consumo de substratos e tempo de geração, utilizando-se duas concentrações de substratos para comparar a resposta do microrganismo às alterações do meio de cultura. Utilizando-se a concentração de 8,4 g/L de sacarose e extrato de levedura no meio de cultura foram obtidas as seguintes velocidades específicas para crescimento celular, consumo de nitrogênio e consumo de sacarose respectivamente: $\mu_x=0,2527 \text{ h}^{-1}$, $\mu_s=0,0124 \text{ h}^{-1}$ e $\mu_s=0,0332 \text{ h}^{-1}$. O tempo de geração para a concentração menor dos substratos foi de 3,14 horas. Ao final das 48 horas de fermentação a concentração final de microrganismos foi de $1,10 \times 10^9$ UFC/mL. Quando a concentração de substratos foi aumentada para 18 g/L as velocidades específicas de crescimento celular, consumo de nitrogênio e consumo de sacarose foram respectivamente: $\mu_x=0,5312 \text{ h}^{-1}$, $\mu_s=0,0093 \text{ h}^{-1}$ e $\mu_s=0,4091 \text{ h}^{-1}$. Para a concentração maior de substratos o tempo de geração de *B. amyloliquefaciens* foi de 1,30 horas e a concentração celular obtida foi de $2,32 \times 10^9$ UFC/mL após 48 horas. As análises do sobrenadante pelo método HPLC mostraram uma possível produção de ácido láctico, ácido acético e ácido propiônico.

Palavras-chave: Ácidos orgânicos, *Bacillus*; Cinética de fermentação; Velocidades específicas.

ABSTRACT

Microorganisms have been widely used for formulations of bioproducts, including bacteria of *Bacillus* genus. Among them we can mention the specie *Bacillus amyloliquefaciens*, a bacterium that is widely used in biotechnology and agriculture due to its ability to solubilize phosphate, fix nitrate and induce systemic resistance in plants. In industrial-scale fermentations, knowledge of the microorganism is extremely important, from its morphological aspects to its behavior, such as cultivation time, growth speeds, substrate and product conversion rates, as well as its response to different media of cultivation. This work aimed to study the fermentation kinetics of *Bacillus amyloliquefaciens* strain BIB 0129, determining the specific growth rates, substrate consumption and generation time, using two substrate concentrations to compare the microorganism's response to changes in the culture medium. Using a concentration of 8.4g/L of sucrose and yeast extract in the culture medium, the following specific speeds for cell growth and nitrogen consumption and sucrose consumption were obtained, respectively: $\mu_x=0,2527 \text{ h}^{-1}$, $\mu_s=0,0124\text{h}^{-1}$ and $\mu_s=0,0332 \text{ h}^{-1}$. The generation time for the lowest concentration of substrates was 3,14 hours. At the end of 48 hours of fermentation, the final concentration of microorganisms was $1,10 \times 10^9$ CFU/mL. When the substrate concentration was increased, the specific cell growth rates, nitrogen consumption and sucrose consumption were respectively: $\mu_x=0.5312 \text{ h}^{-1}$, $\mu_s=0.0093 \text{ h}^{-1}$ and $\mu_s=0.4091 \text{ h}^{-1}$. For a concentration of 18 g/L of substrates, the generation time of *B. amyloliquefasciens* was 1.30 hours and the cell concentration obtained was $2,32 \times 10^9$ CFU/mL. Analyzes of the supernatant by the HPLC method showed a possible production of lactic acid, acetic acid and propionic acid.

Keywords: Organic acids; *Bacillus*; Fermentation kinetics; Specific speeds.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Crescimento no número de registros de produtos biológicos no Brasil.
- Figura 2** - Árvore filogenética baseada na sequência do nucleotídeo *rpoB* (subunidade β da RNA polimerase), das espécies bacterianas dentro do complexo de espécies *B. subtilis*.
- Figura 3** - Modos de ação *B. amyloliquefaciens*.
- Figura 4** - Lâmina de *Bacillus amyloliquefaciens* BIB0129, com coloração de gram. Aumento de 400x.
- Figura 5** - Endósporos de *B. amyloliquefaciens* BIB0129 com coloração Wirtz-Conklin. Aumento de 1000x.
- Figura 6** - Representação gráfica das fases de crescimento microbiano.
- Figura 7** - Sequência de diluições e plaqueamentos na diluição seriada.
- Figura 8**: Funcionamento espectrofotômetro e leitura da densidade óptica (DO).
- Figura 9**: Esquema metabolismo do nitrogênio.
- Figura 10**: Rotas para o catabolismo da sacarose.
- Figura 11**: Suspensão.
- Figura 12**: Incubadora com agitação orbital Nova Técnica NT 714[®].
- Figura 13**: Fermentações em agitação.
- Figura 14**: Esquema experimental.
- Figura 15**: Alíquota centrifugada.
- Figura 16**: Esquema de retirada das amostras e análises do experimento.
- Figura 17**: Espectrofotômetro Kasvi[®].
- Figura 18**: Sequência de tubos para realização da técnica de diluição seriada.
- Figura 19**: Destilador de nitrogênio Tecnal TE-0363[®].
- Figura 20**: A) Erlenmeyers com borato de amônio ao final da destilação. B) Erlenmeyers após a titulação com HCl.
- Figura 21**: HPLC Shimadzu modelo LC-20A[®].
- Figura 22**: A) Placa de *B. amyloliquefaciens* em estágio inicial (12 horas) (meio LB). B) Colônias de *B. amyloliquefaciens* em estágio inicial de crescimento (12 horas) (meio LB).
- Figura 23**: A) Placa de *B. amyloliquefaciens* em estágio avançado (24 horas) (meio LB). B) Colônias de *B. amyloliquefaciens* em estágio avançado de crescimento (24 horas) (meio LB).

Figura 24: A) *B. amyloliquefaciens* em meio diferencial HiCrome™ *Bacillus* Agar® sem a presença de contaminações. B) Placa de *B. amyloliquefaciens* em meio diferencial HiCrome™ *Bacillus* Agar® com contaminações.

Figura 25: Curva de crescimento tempo (h) x UFC.mL⁻¹ (concentração de 8,4 g/L dos substratos).

Figura 26: Curva de crescimento tempo (h) X DO₆₀₀ (concentração de 8,4 g/L dos substratos).

Figura 27: Curva de crescimento tempo (h) x UFC.mL⁻¹ (concentração de 18 g/L dos substratos).

Figura 28: Curva de crescimento tempo (h) X DO₆₀₀ (concentração de 18 g/L dos substratos).

Figura 29: Cinética de crescimento fase log para a concentração de 8,4 g/L dos substratos.

Figura 30: Cinética de crescimento fase log para a concentração de 18 g/L dos substratos.

Figura 31: Porcentual (%) de Nitrogênio na amostra para concentração de 8,4 g/L dos substratos nos diferentes tempos de cultivo.

Figura 32: Porcentual (%) de Nitrogênio na amostra para concentração de 18 g/L dos substratos nos diferentes tempos de cultivo.

Figura 33: Cinética do consumo de Nitrogênio – Concentração de 8,4 g/L dos substratos.

Figura 34: Cinética do consumo de Nitrogênio – Concentração de 18 g/L dos substratos.

Figura 35: Consumo de açúcares (g/L) em função do tempo (h) para a concentração de 8,4 g/L dos substratos. O triângulo representa a sacarose, o quadrado a glicose e o círculo a frutose.

Figura 36: Consumo de açúcares (g/L) em função do tempo (h) para a concentração de 18g/L dos substratos. O triângulo representa a sacarose, o quadrado a glicose e o círculo a frutose.

Figura 37: Cromatograma da 14ª hora de fermentação, para a concentração de 8,4 g/L dos substratos.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Horários de coletas de amostras da parte 1.

Tabela 2: Horários de coletas de amostras da parte 2.

Tabela 3: Médias de DO_{600} e UFC/mL em função do tempo (h) (concentração de 8,4 g/L dos substratos).

Tabela 4: Médias de DO_{600} e UFC/mL em função do tempo (h) (concentração de 18 g/L dos substratos).

Tabela 5: Valores de cinética de crescimento de *B. amyloliquefasciens* BIB029 (h^{-1}).

Tabela 6: Porcentual (%) e concentração (g/L) de Nitrogênio na amostra para concentração de 8,4 g/L dos substratos nos diferentes tempos de cultivo.

Tabela 7: Porcentual (%) e concentração (g/L) de Nitrogênio na amostra para concentração de 18 g/L dos substratos nos diferentes tempos de cultivo.

Tabela 8: Valores de cinética de consumo de nitrogênio (h^{-1})

Tabela 9: Concentração em g/L de sacarose, glicose e frutose - Concentração de 8,4 g/L dos substratos.

Tabela 10: Concentração em g/L de sacarose, glicose e frutose - Concentração de 18 g/L dos substratos.

Tabela 11: Velocidades específicas de consumo dos substratos (μ_s) (h^{-1}).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônia por mL
OGBa	Grupo Operacional <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
AIA	Ácido indol acético
Abs	Absorbância
DO	Densidade óptica
μ_x	Velocidade específica de concentração celular
μ_s	Velocidade específica de consumo de substrato
μ_p	Velocidade específica de formação do produto
d_x	Derivada da concentração celular
d_t	Derivada do tempo
t_g	Tempo de geração
ln	Logaritmo natural
MPB	Meio de Produção de Bactérias
LBA	Luria Bertani Agar
DO ₆₀₀	Densidade óptica a 600nm
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>B. velezensis</i>	<i>Bacillus velezensis</i>
<i>B. megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
Pi	Fosfato inorgânico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 Controle Biológico no Brasil	2
2.2 Grupo operacional <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (OGBa)	3
2.3 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> - aplicações biotecnológicas	4
2.4 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa BIB 0129	6
2.5 Fases de crescimento microbiano	7
2.6 Quantificação de microrganismos	8
2.6.1 Método direto- diluição seriada.....	9
2.6.2 Método indireto- Turbidimetria.....	10
2.7 Nitrogênio na nutrição bacteriana	11
2.8 Fontes de carbono na nutrição bacteriana	12
2.9 Cinética de processos fermentativos	13
2.10 Velocidade específica de transformação	13
2.11 Tempo de geração	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Condições experimentais	15
3.2 Meios de cultura	15
3.3 Inoculação da fermentação	15
3.4 Leitura da absorbância	20
3.5 Quantificação de microrganismos	20
3.6 Plaqueamento em meio diferencial	22
3.7 Repetições	22
3.8 Análise de Nitrogênio	23
3.9 Análise de sacarose	25
3.10 Determinação da curva de crescimento e de consumo de substratos	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 Morfologia das colônias de <i>B. amyloliquefaciens</i>	27
4.2 Curva de crescimento	29
4.3 Cinética de crescimento	35
4.4 Cinética do consumo de nitrogênio	37
4.5 Cinética consumo de carboidratos	43
5. CONCLUSÃO	49

6. REFERÊNCIAS	50
APÊNDICES	56

1. INTRODUÇÃO

O mercado de insumos biológicos vem crescendo ano a ano no Brasil, estimando-se que até 2030 o mercado atinja um faturamento próximo a R\$ 17 bilhões (BORSARI, 2023). Os microrganismos desempenham um papel fundamental dentro do controle biológico, especialmente bactérias do gênero *Bacillus*.

Bacillus amyloliquefaciens é uma bactéria Gram positiva, formadora de endósporos, que possui ampla ação dentro do controle biológico, sendo utilizada como promotora de crescimento, solubilizadora de fosfato, fixadora de nitrogênio e indutora de resistência.

Nas fermentações em escala industrial é de suma importância o conhecimento profundo do microrganismo, desde os seus aspectos morfológicos, seu comportamento nas fermentações, tempo de cultivo, velocidades de crescimento, taxas de conversão de substrato e produto, como também sua resposta aos diferentes meios de cultivo e *shelf-life* do produto formulado. Apesar da grande relevância que esse tipo de tecnologia apresenta para a agricultura, onde agrega eficácia e sustentabilidade ambiental, ainda são escassos estudos e profissionais com conhecimento técnico para atuar na área de bioprocessos, o que aumenta a relevância do trabalho aqui apresentado.

Em ambientes industriais, a agilidade nas análises e a viabilização técnico-econômica dos insumos e matérias primas são características que influenciam fortemente na escolha de métodos e padrões operacionais.

Formulações a base de *Bacillus*, devem passar por uma intensa análise de qualidade, de modo a garantir a pureza, segurança e estabilidade do produto final. Sendo assim, o método mais eficaz para determinar a concentração do ativo ao final da fermentação, e na formulação é a partir da quantificação direta através da diluição seriada, que embora seja um método bastante eficiente, demanda de grandes quantidades de material laboratorial e apresenta resultados em torno de 24 horas após a realização do processo.

O presente trabalho tem como objetivo, estudar a cinética de crescimento e consumo de substratos de *Bacillus amyloliquefaciens* cepa BIB 0129 em duas concentrações diferentes de sacarose e extrato de levedura, assim como validar um modelo de análise de qualidade que traga agilidade na determinação da concentração de microrganismos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Controle Biológico no Brasil

Nos dias atuais observa-se uma busca cada vez maior pela redução do uso de defensivos químicos, que agridem o meio ambiente e provocam grande desequilíbrio ecológico. Segundo Barros (2010) a utilização intensiva de agrotóxicos e fertilizantes, aliado ao desenvolvimento genético de sementes, contribuiu para a “Revolução Verde”, um amplo programa para elevar a produção agrícola no mundo. No entanto, com o decorrer dos anos, o uso indiscriminado de agrotóxicos converteu suas vantagens iniciais, que eram combater certas doenças e pragas que prejudicavam as culturas, em malefícios ao meio ambiente. No mês de julho de 2023 foi registrada a morte de mais de 100 milhões de abelhas no estado do Mato Grosso devido a aplicação incorreta de inseticida aplicado por via aérea, que contaminou ao todo mais de 600 caixas de abelhas e suas colmeias (RODRIGO, 2023).

Casos de poluição de água e dos alimentos também são relatados. De acordo com Merten e Minella (2002), a contaminação do solo e da água pode ser acentuada em áreas manejadas em sistema de preparo convencional, ou seja, em situações em que os solos são submetidos a preparos intensivos e manejados sem a presença de resíduos orgânicos na superfície. Nestas condições, o solo fica mais suscetível à degradação de sua estrutura e, conseqüentemente, à erosão e ao escoamento superficial.

Nesse contexto, o controle biológico vem ganhando espaço na agricultura dita regenerativa, como uma alternativa ao uso constante de defensivos de base química. O controle biológico é uma importante estratégia que, através da utilização de inimigos naturais (parasitoides, predadores e microrganismos), impede que os insetos-praga atinjam níveis capazes de causar dano econômico, tendo como principais vantagens, não deixar resíduo no ambiente, ser atóxico para o homem e ser específico (OLIVEIRA; ÁVILA, 2010).

De acordo com dados divulgados pela ANVISA (2023), o ano de 2022 foi finalizado com um total de 157 registros de produtos biológicos, um aumento de 70% se comparado a 2021, que terminou o ano com 92 registros, conforme pode ser observado na Figura 1.

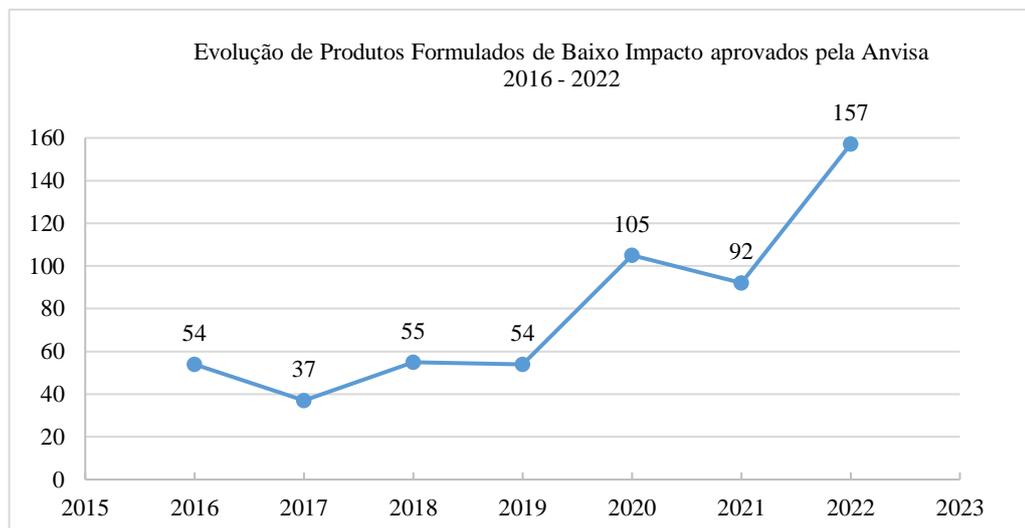


Figura 1: Crescimento no número de registros de produtos biológicos no Brasil.
Fonte: ANVISA (2023)

O ano de 2023, foi finalizado com um total de 365 agrotóxicos registrados no Mapa, sendo que 90 são considerados produtos de baixo impacto, ou seja, produtos fitossanitários de origem biológica (TÁVORA, 2024).

Os produtos formulados com bactérias do gênero *Bacillus*, são os mais utilizados no controle de doenças de plantas no Brasil. Atualmente, as espécies utilizadas nos produtos comerciais registrados no Mapa à base de *Bacillus* são: *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus velezensis* (BETTIOL et al., 2022).

2.2 Grupo operacional *Bacillus amyloliquefaciens* (OGBa)

Em 1943, um cientista japonês, Juichiro Fukumoto isolou pela primeira vez do solo a bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* (FUKUMOTO, 1943), recebendo esse nome devido a sua capacidade de produzir a enzima α -amilase (PRIEST et al, 1987). Taxonomicamente, o grupo operacional *Bacillus amyloliquefaciens* (OGBa) pertence ao complexo de espécies do grupo *B. subtilis*, família *Bacillaceae*, classe Bacilli, filo Firmicutes (BERKELEY et al, 1984; FRITZE, 2004).

Por muitos anos a especiação de espécies do OGBa dentro de espécies do grupo *Bacillus subtilis* levou a resultados variados e errôneos, pois são espécies difíceis de serem distinguidas usando parâmetros taxonômicos clássicos: características morfológicas e fisiológicas, composição da parede celular, sequência do gene 16S do

RNA, conteúdo guanina-citosina (C+G), FAME (fatty acid methyl esters), e hibridização DNA-DNA (DDH) (AUCH et al, 2010).

O status taxonômico dos membros do OGBa foi resolvido com base no genoma e gene derivado. O grupo atualmente é formado por quatro espécies: *B. amyloliquefaciens*, *B. siamensis*, *B. velezensis* e *B. nakamurai*, espécies encontradas em diversos ambientes como o solo, plantas e ambientes aquáticos (FAN et al., 2017; NGALIMAT; SABRI, 2020), conforme apresentado na Figura 2.

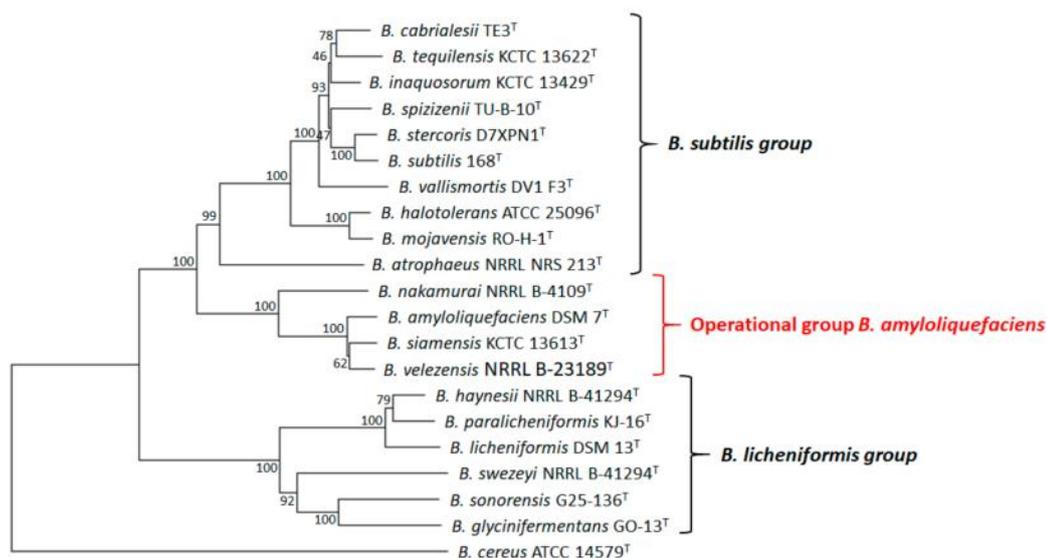


Figura 2: Árvore filogenética baseada na sequência do nucleotídeo *rpoB* (subunidade β da RNA polimerase), das espécies bacterianas dentro do complexo de espécies *B. subtilis*.

Fonte: NGALIMAT *et al* (2021)

2.3 *Bacillus amyloliquefaciens* - aplicações biotecnológicas

B. amyloliquefaciens é uma bactéria amplamente utilizada no setor da agricultura, incluindo o controle biológico por ser um microrganismo promotor de crescimento, indutor de resistência e ser ambientalmente seguro (KASHYAP et al, 2019).

No setor da agricultura e biotecnologia, as cepas pertencentes ao OGBa são utilizadas como agentes de biocontrole devido a sua capacidade de promover uma melhora na saúde e crescimento das plantas (CHOWDHURY, 2015). Essa melhora se deve tanto a mecanismos diretos quanto indiretos. Conforme Ngalimat *et al* (2021) mecanismos diretos estão relacionados com a fixação de nitrogênio, solubilização de

fosfato, produção de sideróforos e fitohormônios (ácido indol acético- AIA) e produção de enzimas como 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC deaminase).

Os microrganismos são essenciais no ciclo do fósforo no solo e desempenham um importante papel na disponibilidade de fosfato inorgânico (Pi) para as plantas, uma vez que a biomassa microbiana pode promover a solubilização do Pi que se encontra mineralizado ou adsorvido, levando ao aumento de captação do nutriente pela planta (CARDOSO; ESTRADA-BONILLA, 2019).

Mecanismos indiretos são atribuídos a produção de componentes antimicrobianos em resposta a estresses bióticos (KUMAR, 2020). *B. amyloliquefaciens* é um microrganismo produtor de componentes antimicrobianos, como o ácido cianídrico (HCN) e lipopeptídeos cíclicos, como a surfactina utilizada para inibir o crescimento de patógenos (CHOWDHURY et al 2015; LI et al 2014). A interação de microrganismos com as raízes das plantas aumenta a resistência das plantas contra patógenos como outras bactérias, fungos e vírus. Esse fenômeno é denominado como resistência sistêmica induzida (FAN et al 2018; DUNLAP et al 2019).

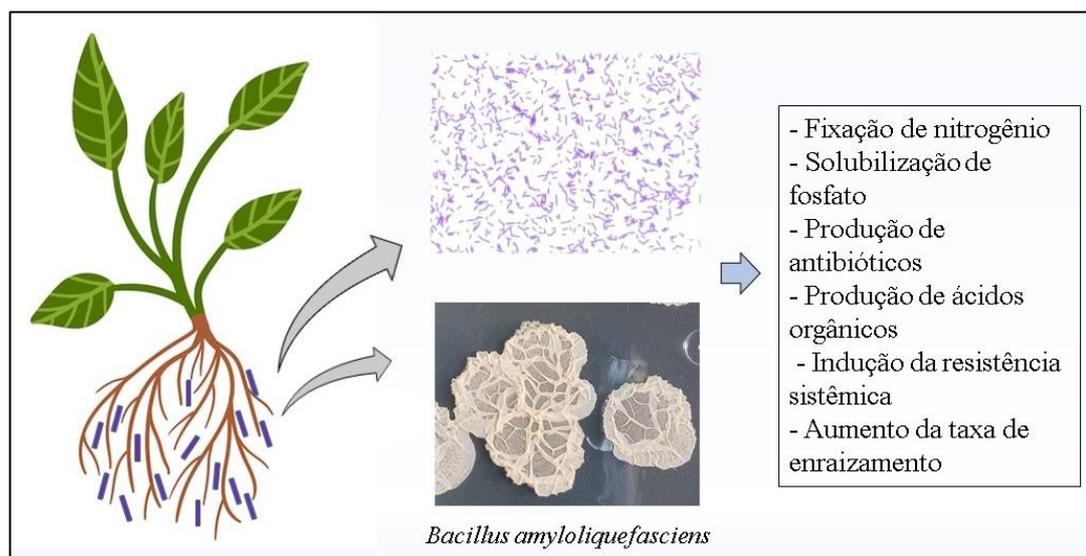


Figura 3: Modos de ação *B. amyloliquefaciens*.

Fonte: Autor (2024)

2.4 *Bacillus amyloliquefaciens* cepa BIB 0129

B. amyloliquefaciens cepa BIB 0129, anteriormente chamada de EUCB 10 é uma bactéria endofítica, isolada de um híbrido de eucalipto no município de Guaíba no Rio Grande do Sul. Ensaios *in vivo* com a cepa mostraram seu potencial solubilizador de fosfato, fixação de nitrogênio atmosférico e produção de AIA (PAZ et al, 2012). Testes realizados com *Eucalyptus urograndis* mostram que plantas inoculadas com a cepa apresentaram um aumento significativo na taxa de enraizamento (96,2%) (PAZ et al, 2012). Em outros ensaios, BIB 0129 inibiu o crescimento dos fungos patogênicos *Botrytis cinerea* e *Calonectria gracilis* em plantas de eucalipto e reduziu a incidência e severidade de doenças causadas por patógenos (PAZ et al, 2018).

Morfológicamente, a bactéria é um bastonete gram-positivo (Figura 4) e formador de endósporos (Figura 5). Industrialmente, fermentações de BIB 0129 visam ao final a produção de endósporos, que possibilitam uma maior estabilidade do produto formulado e maior *shelf life*.

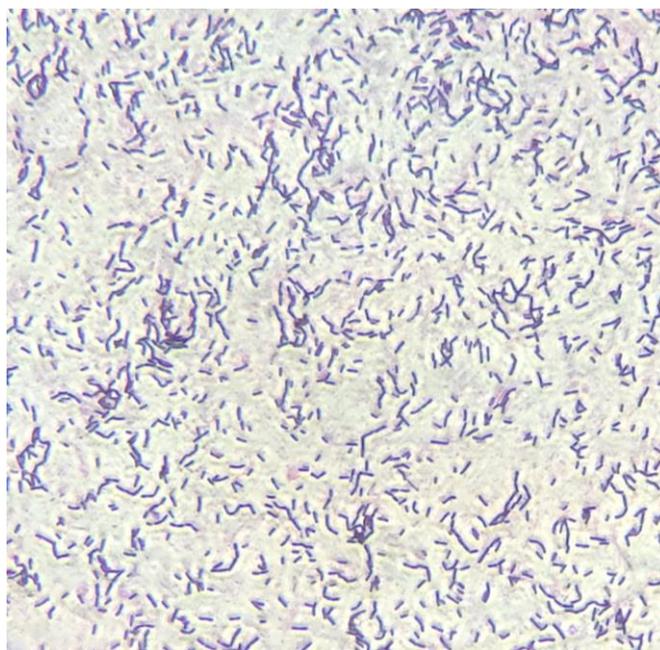


Figura 4: Lâmina de *B. amyloliquefaciens* BIB0129, com coloração de gram. Aumento de 400x.

Fonte: Autor (2024)

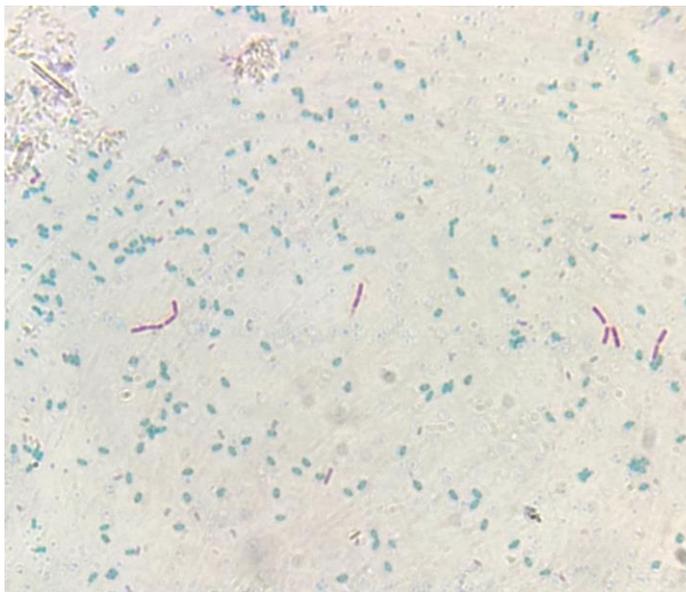


Figura 5: Endósporos de *B. amyloliquefaciens* BIB0129 com coloração Wirtz-Conklin. Aumento de 1000x.
Fonte: Autor (2024)

2.5 Fases de crescimento microbiano

Em meios líquidos, fermentações bacterianas apresentam um crescimento linear ao longo do tempo devido a sua característica de divisão binária. Existem quatro fases de crescimento, que podem ser representadas graficamente em função do tempo (Figura 6): fase lag (1), log (2), estacionária (3) e de declínio ou morte (4).

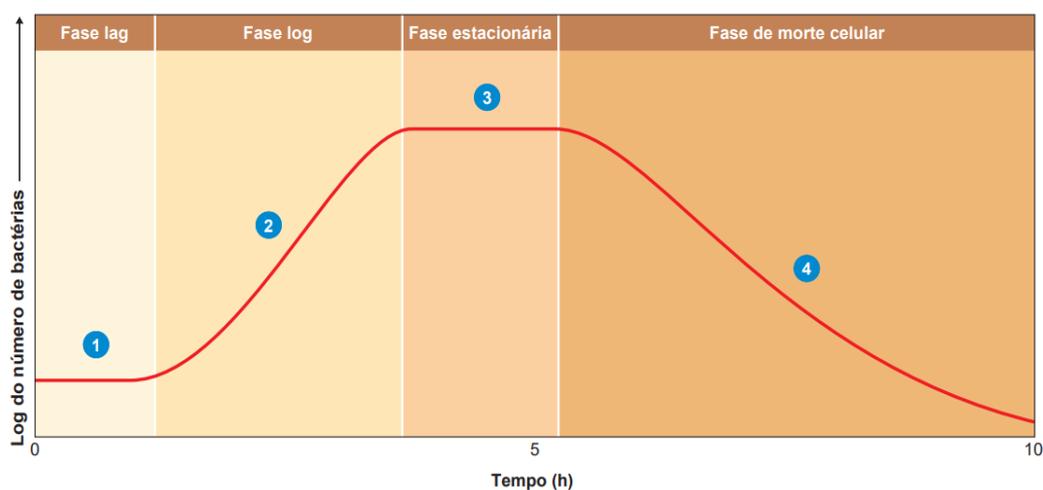


Figura 6: Representação gráfica das fases de crescimento microbiano.
Fonte: TORTORA (2012)

A fase lag é uma fase de adaptação do microrganismo ao meio de cultura. É uma fase em que não há crescimento significativo no número de células, porém há uma grande

atividade metabólica envolvendo principalmente a síntese de enzimas e de moléculas necessárias para a divisão celular (TORTORA, 2012). Em fermentações em escala piloto ou industrial é possível observar uma pequena variação na temperatura da fermentação, baixo consumo de oxigênio e pequenas oscilações no pH.

A fase log é a fase em que ocorre um aumento exponencial no número de células, devido ao fato das bactérias se reproduzirem por divisão binária. A reprodução celular é mais ativa nesse período e o tempo de geração atinge um valor constante, e por isso a representação logarítmica da fase log gera uma linha reta (TORTORA, 2012). É a fase em que ocorre a maior taxa de conversão de substrato em produto, como também maior oscilação nos valores de pH, aumento da temperatura, incidência de espuma e queda nos valores de oxigênio dissolvido no meio de cultura. Nesta fase o meio de cultura deixa de possuir um aspecto translúcido e se torna mais turvo, devido ao crescimento microbiano.

Na fase estacionária observa-se um equilíbrio do número de células formadas e de células mortas, fazendo com que a população microbiana se mantenha constante nesta etapa. Esgotamento de nutrientes, acúmulo de resíduos e mudanças de pH danosas à célula são as principais causas da redução na taxa de crescimento. O início da fase estacionária coincide com o início da esporulação (SERRANO et al, 2001). Os endósporos são formados quando os nutrientes essenciais do meio de cultura se esgotam, e consistem em uma estrutura metabolicamente dormente e altamente resistente a diversos estresses ambientais (DRIKS, 2002), como falta de nutrientes, extremos de temperatura e pH e agentes químicos. A esporulação é um processo complexo e que requer da célula grande quantidade de energia e várias horas para ser completado (GONZÁLEZ-PASTOR, 2011).

Em uma fermentação quando o número de células mortas ultrapassa o número de células formadas, a população entra na fase de morte, ou seja, ocorre uma redução na população microbiana (TORTORA, 2012).

2.6 Quantificação de microrganismos

Segundo dados obtidos pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), dos 79 biofungicidas e bionematicidas à base de *Bacillus* registrados no Brasil até março de 2022, 44,3% dos produtos são à base de *B. amyloliquefaciens* (BETTIOL et al., 2022). Diante disso é de extrema importância uma correta análise de qualidade da fermentação.

Dentro dessas análises de qualidade uma importante etapa é a de quantificação do microrganismo. Existem métodos diretos e indiretos de quantificação de microrganismos.

2.6.1 Método direto- diluição seriada

Ao final de processos fermentativos podem ser obtidos cultivos com concentrações bacterianas na casa de 10^7 , 10^8 e 10^9 UFC/mL (unidades formadoras de colônia por mililitro) e por isso é necessário proceder a análise por meio da técnica de diluição seriada, em que a contagem tem por base amostras obtidas por uma série de diluições e que posteriormente um cálculo determina o valor total da população (TORTORA, 2012). Neste método, 1mL de amostra é transferido para um tubo de ensaio contendo 9mL de solução diluente (diluição 10^{-1}). Após homogeneização da amostra por agitação, 1 mL desta diluição é transferido para outros 9 mL de solução diluente formando a diluição 10^{-2} , e assim sucessivamente, conforme pode ser observado na Figura 7.

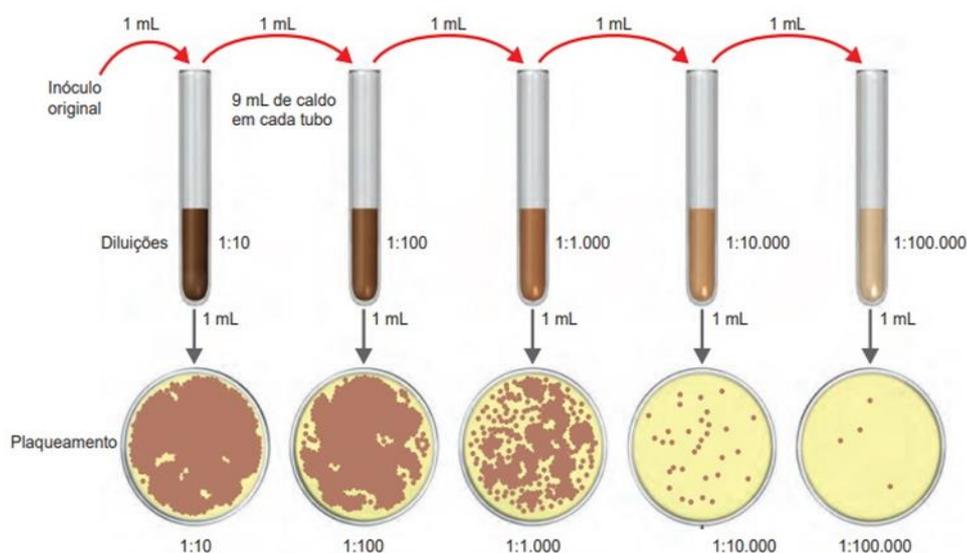


Figura 7: Sequência de diluições e plaqueamentos na diluição seriada.
Fonte: TORTORA (2012)

A contagem de colônias em placas obtidas a partir da diluição seriada possibilita uma análise qualitativa e quantitativa bastante precisa, pois permite a visualização de colônias de células contaminantes e a contagem do número de células viáveis. A desvantagem desse método está no tempo necessário para que as colônias visíveis sejam formadas, que fica em torno de 24 horas impossibilitando uma quantificação rápida de um produto (TORTORA, 2012). Outra desvantagem do método está no alto gasto de

materiais, como placas de Petri e meios de cultura. De acordo com o comunicado técnico 59 da Embrapa Meio Ambiente, Bettioli et al. (2022) recomendam o plaqueamento de cada diluição em 5 placas de Petri contendo meio de cultura, requerendo um grande gasto de material para que a análise seja realizada. Entretanto, a principal vantagem é que consegue-se verificar a viabilidade das células presentes no caldo fermentativo, assim como a presença de microrganismos contaminantes.

2.6.2 Método indireto- Turbidimetria

A quantidade de massa bacteriana também pode ser medida através da absorvância, que corresponde a luz absorvida pelo meio. Com progresso de um processo fermentativo, o meio de cultura, que no início se encontra translúcido tende a se tornar turvo a medida que as células se multiplicam (TORTORA, 2012). A turbidez do meio é medida através do espectrofotômetro. Quanto mais turvo o meio de cultivo, menos luz atingirá o detector do equipamento, que ao final fornece um valor de absorvância (abs) ou densidade óptica (DO), que corresponde a quantidade de luz absorvida pela amostra (TORTORA, 2012). O esquema de funcionamento do espectrofotômetro e leitura da densidade óptica (DO) está indicado na figura 8.

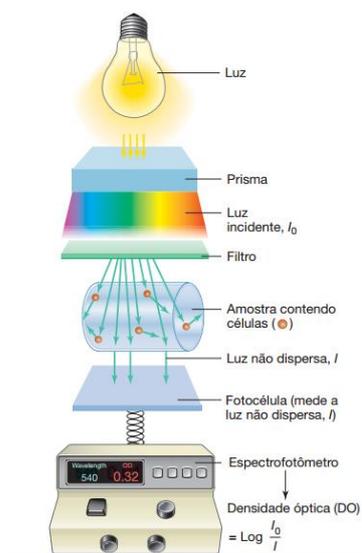


Figura 8: Funcionamento espectrofotômetro e leitura da densidade óptica (DO)
Fonte: MADIGAN et al (2016)

Por se tratar de um método quantitativo indireto, a leitura da absorvância de uma amostra não permite distinguir a contagem de microrganismos contaminantes, das células desejadas. Além disso, o tamanho e forma das partículas, índice de refração dos meios e

a viscosidade da amostra podem interferir na leitura da DO. Ao contrário do método direto, a leitura da turbidimetria permite a obtenção de um resultado instantâneo.

2.7 Nitrogênio na nutrição bacteriana

O nitrogênio é um nutriente essencial para as bactérias, participando da síntese de proteínas, nucleotídeos e metabólitos secundários (GOBERT et al., 2019).

O metabolismo do nitrogênio tende a ser um processo complexo de transformação biológica de nitrogênio inorgânico externo, como amônio, nitrito, nitrato ou ureia em nitrogênio orgânico, envolvendo uma complexa regulação (HE et al, 2023). O amônio é a fonte preferida de nitrogênio dos microrganismos (SUZUKI; KNAFF, 2005), embora os *Bacillus* possam utilizar o nitrito, nitrato ou ureia como fontes e incorporá-los em biomoléculas (NAKANO et al, 1998). De acordo com Wirén & Merrick (2004) a maioria das fontes de nitrogênio precisam ser convertidas em amônio antes de ser usado em vias de biossíntese.

Depois que o amônio é transportado para a célula é necessária a conversão do nitrogênio inorgânico em nitrogênio orgânico a partir da síntese de glutamato ou glutamina, conforme demonstrado na figura 9. Geralmente, glutamina e glutamato fornecem cerca de 20% e 80% de nitrogênio, respectivamente, para a síntese de biomassa e outros compostos de nitrogênio (OH et al, 2007), a bioconversão necessária e essa proporção de distribuição correta são completadas pelo ciclo GS-GOGAT (HE et al, 2023).

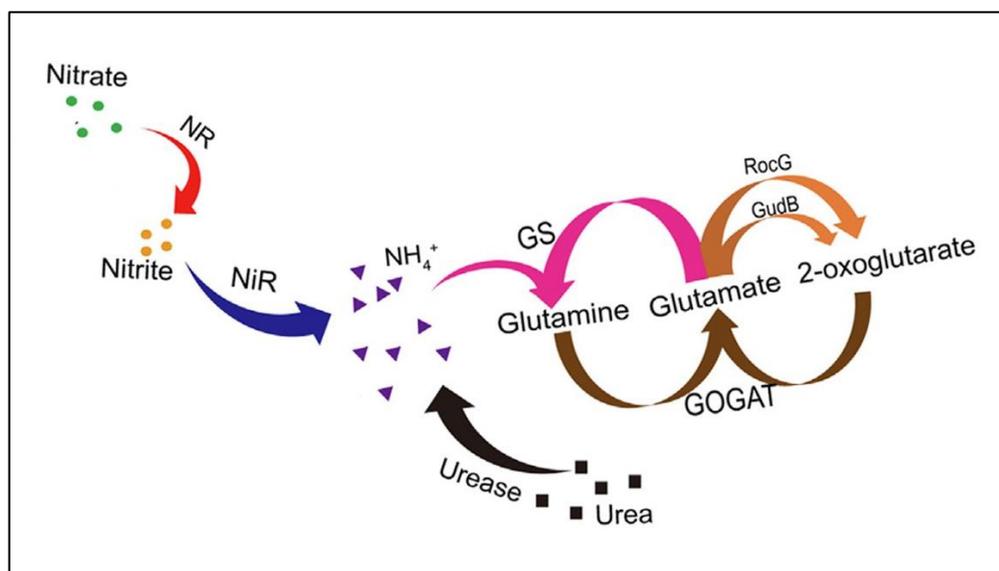


Figura 9: Esquema metabolismo do nitrogênio
Fonte: Adaptado de HE et al (2023)

Extratos de levedura são produtos derivados das leveduras, a partir da remoção da água e paredes celulares (insolúveis) e extração do conteúdo celular solúvel em água. O conteúdo celular das leveduras é composto por diferentes componentes, incluindo proteínas, aminoácidos, nucleotídeos, vitaminas do grupo B e minerais (TOMÉ, 2021). O extrato de levedura é utilizado amplamente como uma fonte barata de nitrogênio, uma vez que possui em sua composição vários aminoácidos, vitaminas, minerais e outros fatores de crescimento para os microrganismos (ALAM et al 1989).

2.8 Fontes de carbono na nutrição bacteriana

O solo possui uma variedade muito grande de fontes de carbono derivadas de fontes vegetais, animais e microbianas. Entre esses carboidratos a sacarose é o mais abundante encontrado na natureza, sendo um dissacarídeo formado pela união de uma molécula de glicose com uma molécula de frutose através de uma ligação glicosídica.

Espécies bacterianas produzem uma gama de enzimas para facilitar o processo de utilização dos carboidratos, algumas das quais são extracelulares e são secretadas para o meio a fim de quebrar os carboidratos maiores em unidades menores que podem ser absorvidas pela bactéria e metabolizadas (REID; ABRATT, 2005). A figura 10 mostra as diferentes rotas e mecanismos de transporte e catabolismo da sacarose.

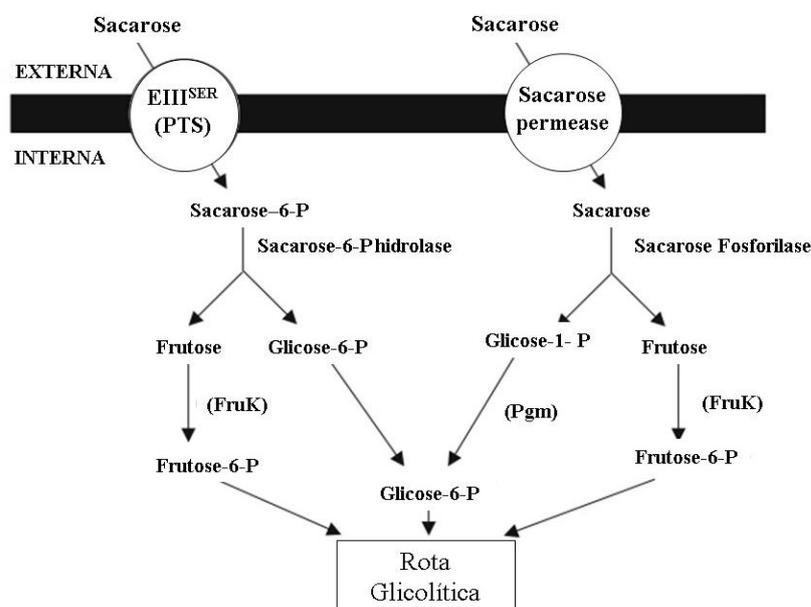


Figura 10: Rotas para o catabolismo da sacarose

Fonte: REID; ABRATT (2005)

O sistema fosfotransferase (PTS), realiza a fosforilação do substrato resultando na acumulação de sacarose-6-fosfato dentro da célula. Outra via, utiliza a enzima sacarose permease para levar o substrato sem modificações para o interior da célula (REID; ABRATT, 2005).

2.9 Cinética de processos fermentativos

O estudo cinético de um processo fermentativo consiste na análise da evolução dos valores de concentração de um ou mais componentes no sistema de cultivo, em função do tempo de fermentação. Podem ser analisados a concentração do microrganismo (X), produtos do metabolismo (P) e os nutrientes ou substratos (S) que compõem o meio de cultura (HISS, 2001).

O Conhecimento de dados da cinética da fermentação possibilita realizar a estimativa de produtividade das fermentações, ampliação para escalas industriais, comparação quantitativa entre diferentes condições de cultivo (pH, temperatura e concentração de substratos).

2.10 Velocidade específica de transformação

Ao se traçar um gráfico relacionando um parâmetro da fermentação com o tempo, as velocidades específicas de concentração celular (μ_x), consumo de substrato (μ_s) e formação do produto (μ_p) são traduzidas pelos valores das inclinações das tangentes às respectivas curvas, sendo o valor da inclinação obtido a partir da derivada do parâmetro (X, P ou S) em função do tempo (t).

De acordo com Junior e Oliveira (2020) devido ao fato de que a concentração microbiana X aumenta durante uma fermentação, aumentando conseqüentemente a concentração do complexo enzimático responsável pela transformação do substrato S no produto P, é mais lógico analisar os valores das velocidades instantâneas com relação a concentração microbiana, conforme as equações diferenciais ordinárias:

$$\mu_x = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt}$$

$$\mu_s = \frac{1}{X} \cdot \frac{dS}{dt}$$

$$\mu_P = \frac{1}{X} \cdot \frac{dP}{dt}$$

Integrando o modelo temos as seguintes equações:

$$\ln X = \mu_X \cdot t + \ln x_0 \quad (1)$$

$$\ln S = \mu_S \cdot t + \ln s_0 \quad (2)$$

$$\ln P = \mu_P \cdot t + \ln p_0 \quad (3)$$

Comparando-se com a equação de 1º grau, temos que:

$$y = \ln(X, S \text{ ou } P)$$

$$a = \mu_{(X, S \text{ ou } P)}$$

$$b = \ln(X_0, S_0, P_0)$$

2.11 Tempo de geração

Ao lado da velocidade específica μ_x , a fase exponencial também é caracterizada frequentemente pelo tempo de geração t_g , que é o intervalo de tempo necessário para dobrar o valor da concentração celular (HISS, 2001).

Considerando-se que na fase logarítmica de crescimento a velocidade específica (μ_x) é constante e máxima, conclui-se que a velocidade de crescimento é diretamente proporcional a concentração celular X, conforme a equação:

$$\frac{d_x}{d_t} = \mu_x \cdot x$$

Integrando a equação e considerando que as células se dividem por divisão binária temos que:

$$\mu_x = \frac{\ln 2}{t_g}$$

Ou seja:

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu_x} \quad (4)$$

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Condições experimentais

O experimento foi realizado no laboratório de microbiologia da empresa *Biota Innovations*, localizado na cidade de Uberaba-MG, entre os meses de julho e dezembro de 2023. As fermentações foram feitas em escala laboratorial em Erlenmeyers de 1L e 5L de capacidade, utilizando-se a bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* cepa BIB 0129.

No experimento, que foi composto por 3 repetições, foram utilizados dois tratamentos: o primeiro com a concentração de 8,4g/L de sacarose e extrato de levedura no meio de cultura e o segundo com concentração de 18g/L dos mesmos substratos. As concentrações dos substratos foram obtidas a partir de trabalhos de otimização do meio de cultura já realizados dentro da empresa. A sacarose foi obtida a partir da utilização de açúcar cristal.

3.2 Meios de cultura

Nos dois tratamentos foi utilizado o meio de cultura desenvolvido internamente na empresa denominado Meio de Produção de Bactérias (MPB) para condução da fermentação líquida. A composição completa do meio foi ocultada por questões de sigilo industrial.

Os plaqueamentos realizados para quantificação da população microbiana, foram feitos em meio LBA (Luria Bertani).

O meio diferencial HiCrome™ *Bacillus* Agar® foi utilizado para diferenciação de *B. amyloliquefaciens* com outras espécies microbianas, sendo útil para avaliação da presença de contaminantes nas fermentações.

3.3 Inoculação da fermentação

O experimento foi iniciado reativando-se a cepa original armazenada em Eppendorf pelo método Castellani com água destilada estéril. Esta etapa foi necessária para evitar que as fermentações fossem feitas com células que possam ter passado por algum tipo de mutação. Utilizou-se uma alça de inoculação estéril para transferir 10µL da solução do Eppendorf para placas de Petri contendo o meio de cultura LBA, as placas

foram colocadas na estufa BOD por 24 horas. Esta etapa constituiu a passagem ou geração 1 do microrganismo.

Passadas 24 horas, as placas de *B. amyloliquefaciens* foram avaliadas e a partir da passagem 1, foi feito o repique para novas placas com meio LBA (passagem 2). Foi utilizada a técnica de semeadura por esgotamento para que fossem obtidas colônias isoladas da bactéria. Após o repique as placas foram fechadas com papel filme, identificadas e colocadas na BOD (30°C, fotoperíodo de 12 horas) por 24 horas.

No dia seguinte as placas tiveram a sua pureza avaliada e a partir das placas puras foi feita a inoculação da suspensão. Para isso, foram selecionadas 16 colônias típicas de *B. amyloliquefaciens* e elas foram transferidas para um Erlenmeyer de 1L contendo 400mL de meio MPB, previamente esterilizado a 121°C por 20 minutos. Após inoculada, a suspensão foi identificada com o número da repetição, horário da inoculação e data (Figura 11), colocada em uma incubadora com agitação orbital da marca Nova técnica NT 714[®] (Figura 12), a 30°C e 150 rpm, por 24h.

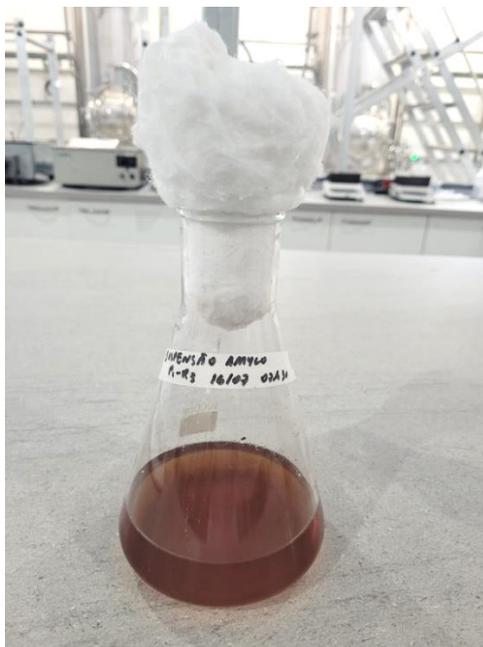


Figura 11: Suspensão
Fonte: Autor (2024)

Decorrido esse período, uma alíquota da suspensão foi observada no microscópio de contraste de fases para visualização de possíveis contaminações. Estando a suspensão sem a presença de células contaminantes, 200mL de seu volume foram transferidos para um Erlenmeyer de 5L contendo 1,8L de MPB, totalizando 2L após a inoculação (10% de

inóculo). O momento da inoculação do Erlenmeyer de 2L foi considerado o tempo zero da fermentação (t_0). O Erlenmeyer foi colocado em agitação no agitador orbital, a 30°C e 150 rpm (Figura 13). As etapas realizadas até o início da fermentação estão representadas na figura 14.



Figura 12: Incubadora com agitação orbital Nova Técnica NT 714®
Fonte: Autor (2024)



Figura 13: Fermentações em agitação.
Fonte: Autor (2024)

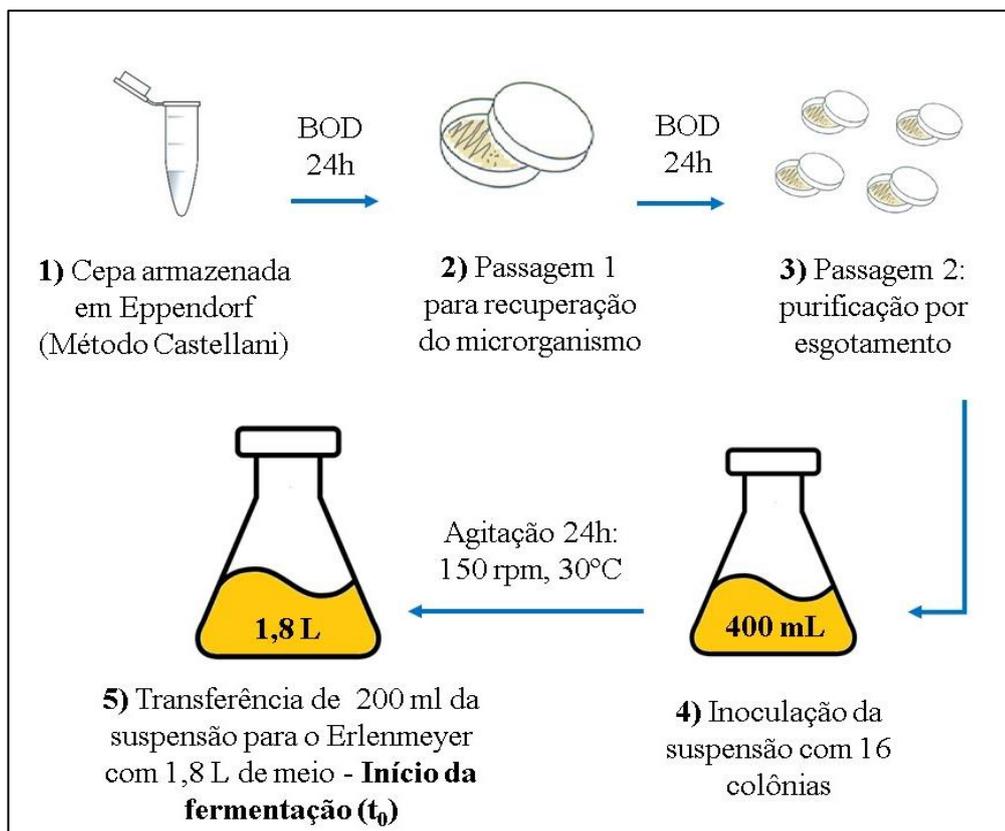


Figura 14: Esquema experimental.

Fonte: Autor (2024)

A partir do tempo zero, a cada 2 horas foram coletadas amostras para determinação da absorbância e a concentração celular do caldo fermentativo e a cada 4 horas uma amostra de 5 mL do cultivo foi coletada em duplicata em um tubo Falcon de 15 mL para posterior análise da concentração dos substratos. A amostra foi centrifugada a 3500 rpm por 20 minutos (centrífuga Quimis 222T28[®]). O sobrenadante resultante da centrifugação das amostras (Figura 15) foi armazenado em frascos coletores estéreis, identificados com o número da amostra e congelados em freezer. As amostras foram descongeladas em temperatura ambiente somente no dia das análises e a partir delas foi quantificado o teor de nitrogênio e sacarose do meio.

O esquema de retirada de amostras e análises estão representados na Figura 16.

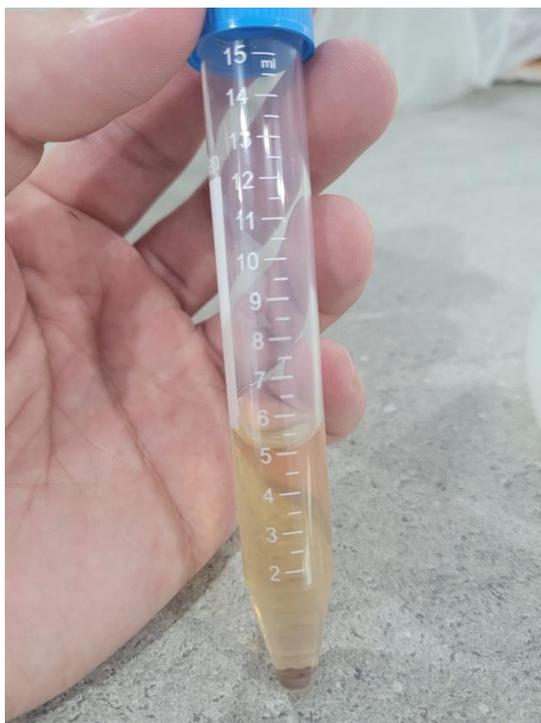


Figura 15: Alíquota centrifugada
Fonte: Autor (2024)

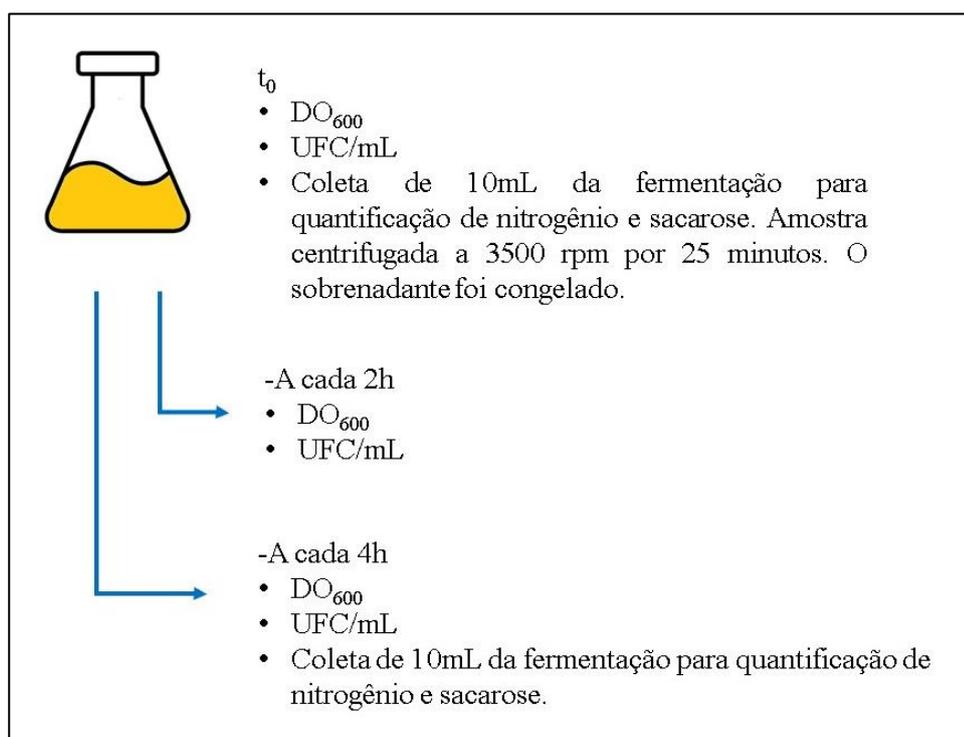


Figura 16: Esquema de retirada das amostras e análises do experimento.
Fonte: Autor (2024)

3.4 Leitura da absorbância

A absorbância da amostra foi medida em um espectrofotômetro da marca Kasvi® (Figura 17), utilizando-se o comprimento de onda de 600nm. O meio de cultura estéril foi utilizado para a leitura do branco.



Figura 17: Espectrofotômetro Kasvi®
Fonte: Autor (2024)

3.5 Quantificação de microrganismos

A quantificação da população bacteriana foi feita a partir da metodologia proposta por Bettiol et al (2022), conforme descrito a seguir.

- Inicialmente foram separados 8 tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina;
- Os tubos foram identificados com o código da amostra e número da diluição;
- Com uma micropipeta, 1 mL do cultivo microbiano foi transferido para o primeiro tubo de solução salina, formando a diluição -1;
- O tubo foi agitado por 3 vezes em um agitador vortex da marca Kasvi®;
- Após agitação, 1 mL da diluição -1 foi pipetado e transferido para um novo tubo de ensaio, constituindo a diluição -2;
- O tubo da diluição -2 foi agitado em vortex e 1 mL de seu volume foi transferido para um novo tubo contendo solução salina (diluição -3)
- Esses passos foram repetidos até a diluição -8 (figura 15);
- Finalizada a etapa de diluição, iniciou-se a etapa de plaqueamentos;

- Com uma micropipeta, 100µl da diluição -8 foram pipetados em uma placa de petri, contendo meio LBA, e o conteúdo foi espalhado por toda a placa com uma alça do tipo T. Para cada diluição foram feitos 5 plaqueamentos;
- As placas foram fechadas com papel filme, e identificadas com o código da amostra, número da diluição e data;
- A ponteira da micropipeta e a alça T foram trocadas entre cada diluição;
- O processo foi repetido com todas as diluições;
- Todas as placas foram colocadas em estufa tipo BOD (modelo Cienlab®), a 30°C com fotoperíodo de 12 horas;
- No dia seguinte as placas tiveram as colônias típicas contadas. Para contagem, foram consideradas as placas que possuíam no mínimo 30 colônias;
- Para cálculo de UFC/mL foi utilizada a seguinte fórmula:

UFC/mL= (número de colônias nas cinco placas / 5) x diluição da amostra x 10

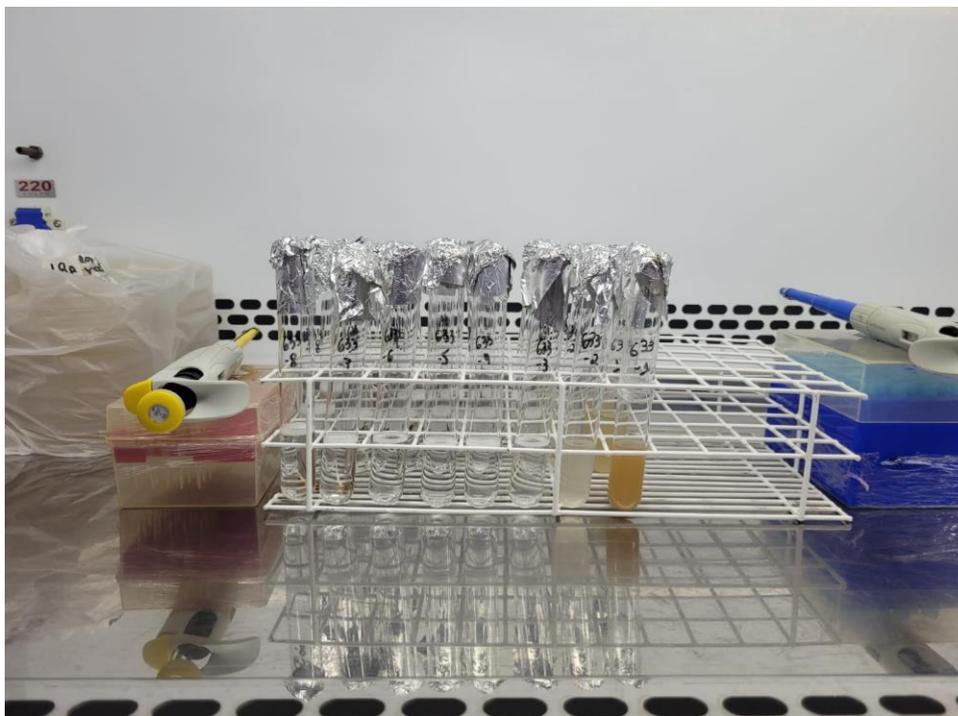


Figura 18: Sequência de tubos para realização da técnica de diluição seriada.
Fonte: Autor (2024)

Durante a contagens das placas resultantes das diluições, o caldo fermentativo teve a sua pureza avaliada, sendo considerada pura quando não eram observadas colônias diferentes do padrão morfológico de *B. amyloliquefaciens*.

3.6 Plaqueamento em meio diferencial

Em todas as repetições, foram realizados plaqueamentos em meio diferencial HiCrome™ *Bacillus* Agar®, nos tempos 24h e 48h. Foram utilizadas as diluições -6 e -7 de cada repetição para a realização dos plaqueamentos com o meio.

O meio foi escolhido como um parâmetro de avaliação da pureza da fermentação, pois nesse meio colônias de *B. amyloliquefaciens* adquirem coloração amarela.

3.7 Repetições

Cada repetição foi composta por duas partes: a parte 1 de cada repetição teve a suspensão inoculada as 07h30 da manhã, e o tempo zero da fermentação as 07h30 da manhã do dia seguinte. Com a parte 1 de cada repetição foram avaliados do t_0 ao t_{10} / t_{24} a t_{34} e t_{48} .

A parte 2 das repetições foram inoculadas as 17h30 (suspensão e fermentação t_0), e com ela foram analisados os seguintes intervalos: t_{14} a t_{24} / t_{38} a t_{48} . A tabela 1 representa os horários e as amostras coletadas em cada horário da fermentação.

Tabela 1. Horários de coletas de amostras da parte 1

Parte 1					
Dia	Hora	Tempo de crescimento	DO600	UFC/mL	Nitrogênio e sacarose
1	07:30h	0	SIM	SIM	SIM
	09:30h	2	SIM	SIM	-
	11:30h	4	SIM	SIM	SIM
	13:30h	6	SIM	SIM	-
	15:30h	8	SIM	SIM	SIM
	17:30h	10	SIM	SIM	-
2	07:30h	24	SIM	SIM	SIM
	09:30h	26	SIM	SIM	-
	11:30h	28	SIM	SIM	SIM
	13:30h	30	SIM	SIM	-
	15:30h	32	SIM	SIM	SIM
	17:30h	34	SIM	SIM	-
3	07:30h	48	SIM	SIM	SIM

Fonte: Autor (2024)

Tabela 2. Horários de coletas de amostras da parte 2

Parte 2					
Dia	Hora	Tempo de crescimento	DO600	UFC/mL	Nitrogênio e sacarose
1	17:30h	0	SIM	SIM	SIM
	07:30h	14	SIM	SIM	SIM
	09:30h	16	SIM	SIM	-
2	11:30h	18	SIM	SIM	SIM
	13:30h	20	SIM	SIM	-
	15:30h	22	SIM	SIM	SIM
	17:30h	24	SIM	SIM	-
3	07:30h	38	SIM	SIM	SIM
	09:30h	40	SIM	SIM	-
	11:30h	42	SIM	SIM	SIM
	13:30h	44	SIM	SIM	-
	15:30h	46	SIM	SIM	SIM
	17:30h	48	SIM	SIM	-

Fonte: Autor (2024)

3.8 Análise de Nitrogênio

A partir do sobrenadante resultante da centrifugação da alíquota da fermentação foram feitas as análises do teor de nitrogênio, pelo método Kjeldahl. As análises foram realizadas no laboratório de Bromatologia do Instituto Federal do Triângulo Mineiro, Minas Gerais. Foi utilizado o destilador de Nitrogênio da marca Tecnal modelo TE-0363[®], representado na Figura 19.

O método desenvolve-se em três etapas distintas: digestão da amostra por ação de ácido sulfúrico concentrado, utilizando catalisador para acelerar esta etapa; destilação do nitrogênio e titulação ácida (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1995).

Após a digestão da amostra com ácido sulfúrico e destilação utilizando-se uma solução 40% de hidróxido de sódio, o Erlenmeyer contendo borato amônio foi titulado com ácido clorídrico 0,1M, conforme mostrado na Figura 20. Os valores de molaridade do HCl, fator de correção do ácido, volume de ácido gasto e peso da amostra foram utilizados na fórmula para cálculo da porcentagem de nitrogênio da amostra, conforme a equação descrita abaixo.

$$\% \text{ de Nitrogênio} = \frac{V \text{ HCl} \times M \text{ HCl} \times 14 \times FC \text{ HCl} \times 100}{\text{Quantidade da amostra (mg)}}$$

Em que:

V_{HCl} = volume de HCl utilizado para titular

M_{HCl} = molaridade do HCl

$F_{\text{C HCl}}$ = fator de correção do HCl



Figura 19: Destilador de nitrogênio Tecnal TE-0363[®]
Fonte: Autor (2024)

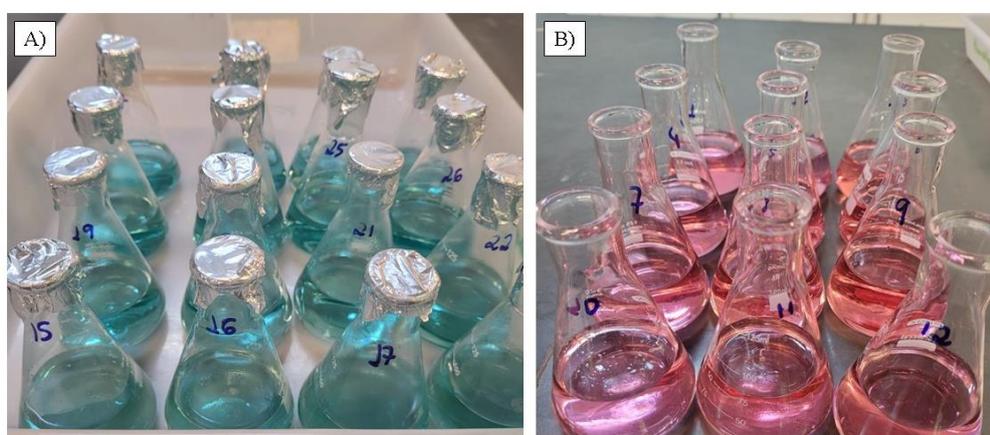


Figura 20: A) Erlenmeyers com borato de amônio ao final da destilação. B) Erlenmeyers após a titulação com HCl.
Fonte: Autor (2024)

3.9 Análise de sacarose

A concentração de sacarose foi determinada pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A cromatografia líquida é uma técnica de separação física conduzida por uma fase líquida (FERNANDES, 2014).

As amostras foram injetadas em um sistema cromatográfico da marca Shimadzu modelo LC-20A Prominence® (Figura 21). Utilizou-se uma coluna SUPELCOGEL C-610H, em que os componentes foram separados e detectados por análise em detector ultravioleta (UV) a 210nm. Como fase móvel foi utilizado ácido fosfórico (0,1%), com fluxo de 0,5 mL/min, temperatura do forno de 32°C e volume de injeção de 20 µL. Todos os ensaios de caracterização do caldo foram conduzidos em triplicata. Metodologia parecida foi usada por Fernandes et al (2014) para quantificação do teor de sacarose em variedades de sorgo sacarino.



Figura 21: HPLC Shimadzu modelo LC-20A®
Fonte: Autor (2024)

3.10 Determinação da curva de crescimento e de consumo de substratos

Após o resultado da contagem das placas resultantes da diluição seriada, os dados de UFC/mL foram tabulados em função do tempo e separados por repetição. Em seguida foi feita a média aritmética de todos os valores de UFC/mL em função do tempo. Com os resultados das médias foi gerado um gráfico de dispersão Tempo (h) x UFC/mL, resultando na curva de crescimento ao longo do tempo. Com os valores de absorbância obtidos foi gerado um gráfico Tempo (h) x DO_{600} .

Com os valores resultantes, da porcentagem de nitrogênio no meio a partir da análise de Kjeldahl e da concentração de açúcares no meio, também foi feita a média dos valores das repetições e gerando o gráfico de tempo (h) x concentração do substrato (g/L).

3.11 Cinética de crescimento e consumo de substratos

Com a curva de crescimento e consumo de substrato, foi identificada qual era a faixa de tempo em que havia maior crescimento microbiano e maior consumo de substratos, caracterizando assim a fase log. Com os dados de UFC/mL, teor de nitrogênio e açúcares no meio no intervalo de tempo da fase log, foi calculado o logaritmo natural (\ln) das médias de cada uma das variáveis, e posteriormente o gráfico de dispersão foi gerado. A partir da análise de regressão no Excel foi possível a obtenção da equação da reta, em que o coeficiente angular é o valor de $\mu_{\text{máx}}$. Para a interpretação das equações cinéticas geradas foram utilizadas as equações diferenciais de número 1, 2 e 3 disponíveis na revisão bibliográfica

O tempo de geração foi calculado após a obtenção do valor de μ_x utilizando a equação de número 4, disponível na revisão bibliográfica.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Morfologia das colônias de *B. amyloliquefaciens*

Todas as diluições seriadas feitas durante o experimento tiveram seus plaqueamentos avaliados a fim de contabilizar as colônias, e para avaliação qualitativa da pureza dos cultivos. Todas as repetições consistiram de fermentações puras, isentas de microrganismos contaminantes.

Inicialmente, por volta de 12 horas de crescimento, as colônias típicas de *B. amyloliquefaciens* BIB 0129 são colônias arredondadas, brilhosas, de aspecto translúcido e com bordas lisas conforme pode ser observado na Figura 22. As placas com mais de 24 horas de crescimento (Figura 23) passam a apresentar colônias com maior produção de goma, aspecto enrugado e mais opaco. Placas com mais de 36 horas apresentaram bastante espalhamento, impedindo a identificação de colônias isoladas. Não foram observadas diferenças morfológicas das colônias entre os tratamentos.

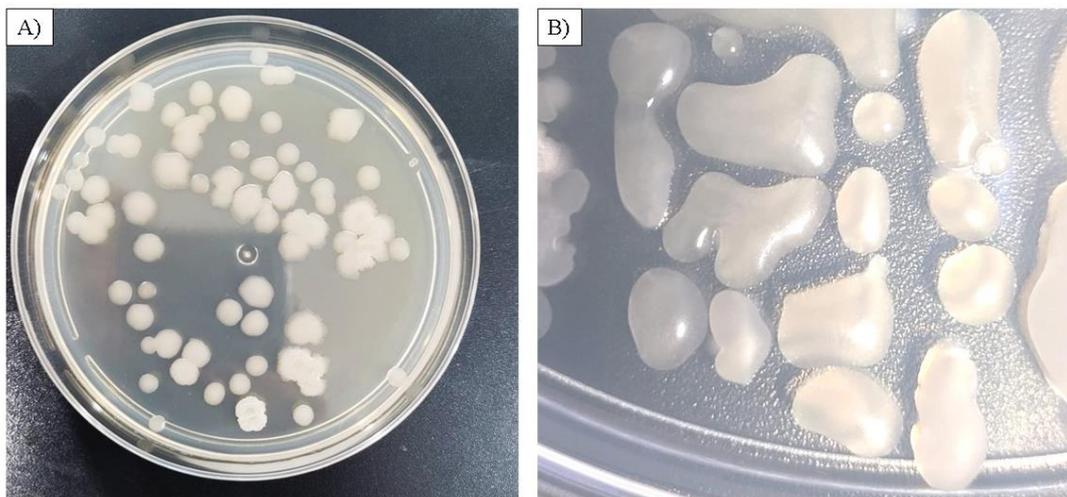


Figura 22: A) Placa de *B. amyloliquefaciens* em estágio inicial (12 horas) (meio LB). B) Colônias de *B. amyloliquefaciens* em estágio inicial de crescimento (12 horas) (meio LB).

Fonte: Autor (2024)

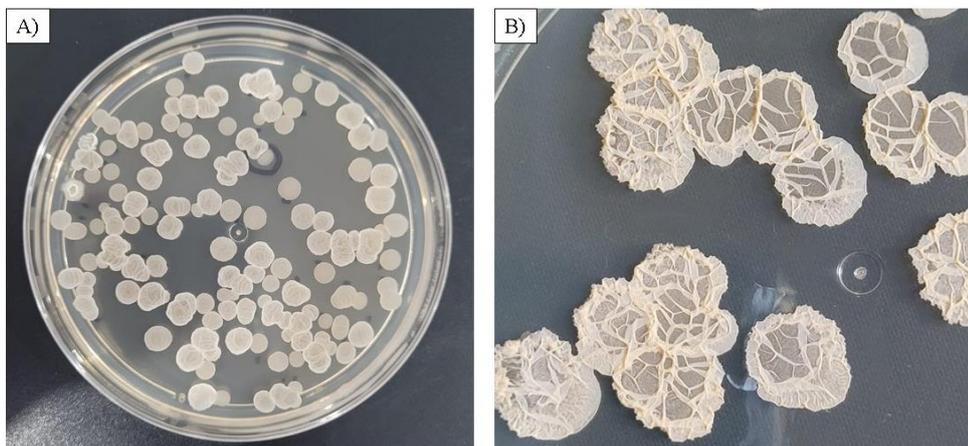


Figura 23: A) Placa de *B. amyloliquefaciens* em estágio avançado (24 horas) (meio LB).
 B) Colônias de *B. amyloliquefaciens* em estágio avançado de crescimento (24 horas) (meio LB).

Fonte: Autor (2024)

Plaqueamentos feitos com o meio diferencial HiCrome™ *Bacillus* Agar®, também confirmaram a pureza das fermentações. Para a espécie *B. amyloliquefaciens* o ágar deve adquirir coloração amarela, conforme a Figura 24A. Na figura 24B é possível observar a presença de contaminações na fermentação, a partir do aparecimento de colônias esverdeadas. Fermentações com contaminações foram descartadas e os resultados desconsiderados.

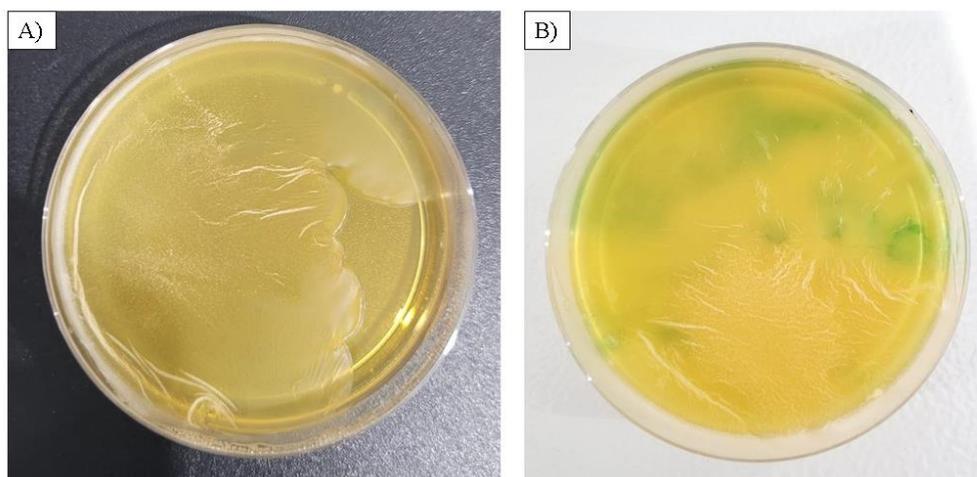


Figura 24: A) *B. amyloliquefaciens* em meio diferencial HiCrome™ *Bacillus* Agar® sem a presença de contaminações. B) Placa de *B. amyloliquefaciens* em meio diferencial HiCrome™ *Bacillus* Agar® com contaminações.

Fonte: Autor (2024)

HiCrome™ *Bacillus* Agar®, é um meio diferencial que utiliza substratos cromogênicos em sua composição. Os microrganismos alvo são caracterizados por sistemas enzimáticos que metabolizam o substrato para liberar o cromogênio, que pode então ser detectado visualmente pela observação direta de uma mudança da cor do meio (SIEGRIST, 2016).

4.2 Curva de crescimento

Com as médias aritméticas resultantes dos valores de UFC/mL em função do tempo, apresentadas nas tabelas 3 e 4, foram geradas as curvas de crescimento para cada um dos tratamentos. A partir das curvas de crescimento de *B. amyloliquefaciens* BIB 0129 foram iniciados os estudos de cinética.

Tabela 3. Médias de DO₆₀₀ e UFC/mL em função do tempo (h) (concentração de 8,4 g/L dos substratos)

Tempo (h)	DO₆₀₀	UFC/mL
0	0,4278	1,15x10 ⁸
2	0,7580	1,02x10 ⁸
4	1,0080	1,18x10 ⁸
8	2,0557	2,94x10 ⁸
10	2,6667	4,33x10 ⁸
14	4,2550	1,51x10 ⁹
16	4,2500	1,22x10 ⁹
18	4,4275	1,13x10 ⁹
20	4,1525	1,42E+09
22	4,0725	1,84x10 ⁹
24	4,2100	9,78x10 ⁸
26	4,2633	9,20x10 ⁸
28	4,4800	1,58x10 ⁹
30	4,2500	1,17x10 ⁹
32	4,1567	1,20x10 ⁹
38	4,5525	1,45x10 ⁹
40	4,4400	8,49x10 ⁸
42	4,3500	1,38x10 ⁹
44	4,5250	2,13x10 ⁹
46	4,4900	1,70x10 ⁹
48	4,0925	1,10x10 ⁹

Fonte: Autor (2024)

A curva de crescimento de *B. amyloliquefaciens* cepa BIB 0129 em meio MPB com a concentração de 8,4 g/L de sacarose e extrato de levedura pode ser observada na Figura 25.

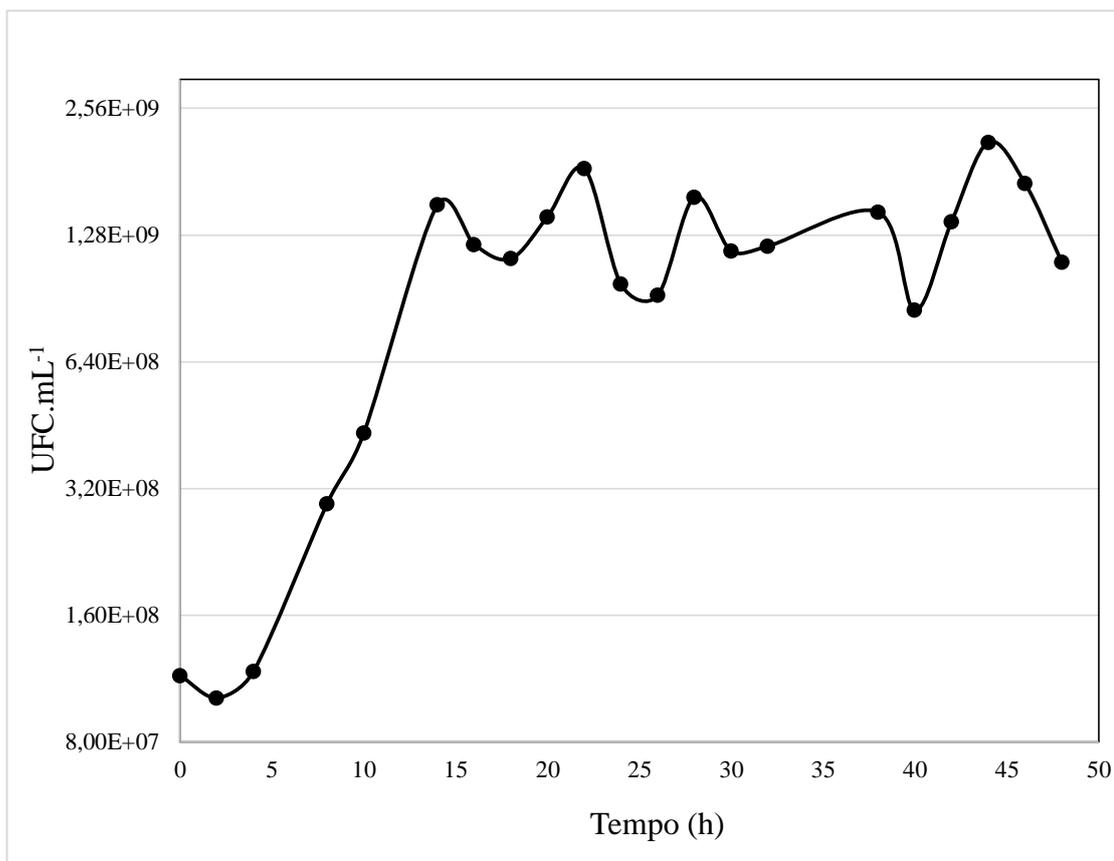


Figura 25: Curva de crescimento tempo (h) x UFC.mL⁻¹ (concentração de 8,4 g/L dos substratos)
Fonte: Autor (2024)

Com a curva de crescimento do microrganismo pode ser observada uma queda na população microbiana entre o tempo 0 e 2. Essa morte de microrganismos pode ter sido ocasionada pela não adaptação de células menos resistentes ao meio de cultura após a transferência. A fase log se estendeu por aproximadamente 12 horas, entre o tempo 2 e 14, formando uma reta, evidenciando o crescimento microbiano neste intervalo. Do tempo 14 ao tempo 48, houve uma estabilização dos valores de UFC/mL, e embora os valores tenham tido uma variação, a população microbiana se manteve no mesmo logaritmo (10^9), caindo em alguns momentos para 10^8 , porém em valores próximos de 10^9 . Não foi identificada uma fase de declínio na curva de crescimento, pois microrganismos pertencentes ao gênero *Bacillus*, iniciam o processo de diferenciação

celular para formação do esporo após esgotamento de nutrientes, não havendo, portanto, uma fase de morte.

Ao final das 48 horas de fermentação a concentração celular final foi de $1,10 \times 10^9$ UFC/mL. Resultados próximos foram obtidos por Lima (2017) que em experimento com *B. amyloliquefaciens* IT45 realizado em Erlemeyer de 2L, com 200 mL de meio de cultura conseguiu após 48 horas de fermentação, concentrações celulares de $1,4 \times 10^9$ UFC/mL. Yan et al. (2017) utilizando Erlemeyers de 500 mL com 100 mL de meio de cultura, em temperatura de 30°C e 160 rpm em shaker, chegou a uma concentração celular de $1,16 \times 10^9$ UFC/mL utilizando as cepas MT45 e X27 de *B. amyloliquefaciens*.

Com os valores da DO_{600} em função do tempo, presentes na tabela 3, foi gerado um gráfico de dispersão DO_{600} x tempo (h), mostrado na Figura 26.

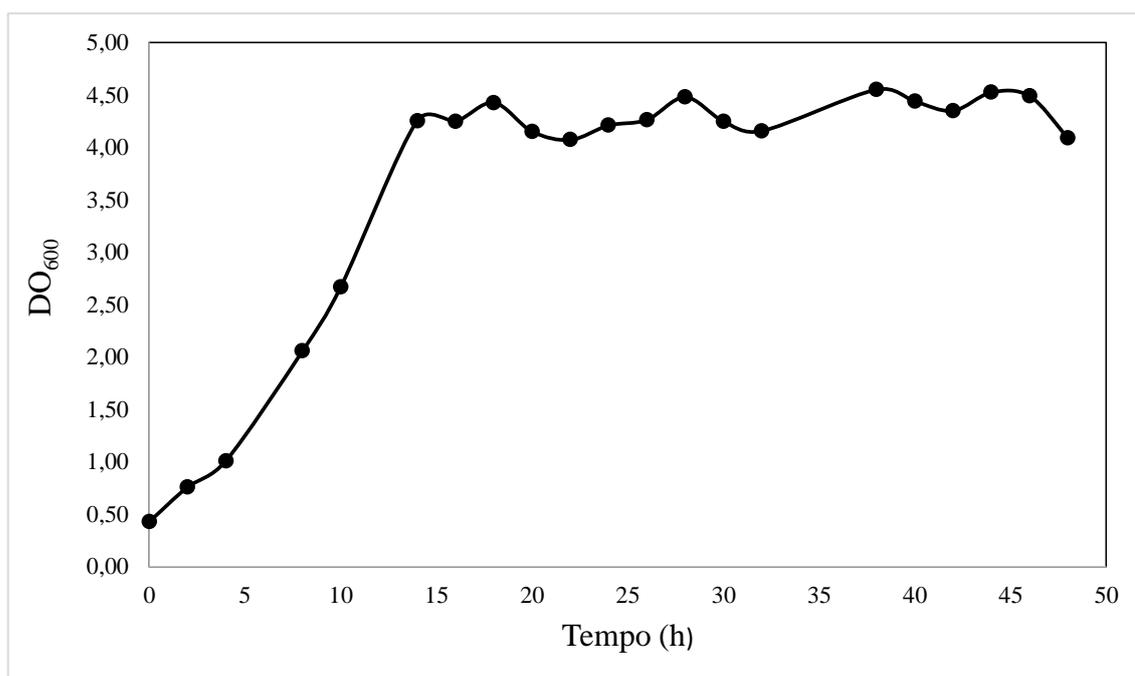


Figura 26: Curva de crescimento tempo (h) X DO_{600} (concentração de 8,4 g/L dos substratos)
Fonte: Autor (2024)

A partir da curva resultante entre a absorvância a 600nm e o tempo podemos observar o aumento crescente da absorvância ao longo do tempo, tendo a fase log se encerrando por volta das 14 horas de cultivo, coincidindo com os dados obtidos de UFC/mL. Analisando os valores da absorvância e comparando-os com os valores de UFC/mL, pode ser observado que entre o início da fermentação e as 2 horas de cultivo,

há uma redução na concentração microbiana embora tenha ocorrido um aumento na absorvância do meio.

Esse resultado dá um indicio de que a leitura da turbidez do meio não mostra o número de células viáveis disponíveis no cultivo. Da mesma maneira, a turbidimetria não é uma medida eficaz de medição em cultivos que possuam algum grau de contaminação, pois toda a população microbiana será considerada na leitura da turbidez do meio, independentemente das espécies ali presentes.

As médias dos valores de absorvância e UFC/mL resultantes do tratamento 2 (meio de cultura contendo 18g/L dos substratos) estão apresentadas na tabela 4. A partir das médias de UFC/mL e DO₆₀₀ foi feita a curva de crescimento do microrganismo conforme observado nas figuras 27 e 28.

Tabela 4. Médias de DO₆₀₀ e UFC/mL em função do tempo (h) (concentração de 18 g/L dos substratos)

Tempo (h)	DO 600	UFC/ml
0	0,5753	2,97 x10 ⁸
2	0,8175	2,68 x10 ⁸
4	1,7800	3,01 x10 ⁸
6	2,7567	8,97 x10 ⁸
8	3,3733	2,52 x10 ⁹
14	5,1233	2,43 x10 ⁹
16	5,4400	2,13 x10 ⁹
18	5,8600	2,20 x10 ⁹
20	6,2100	2,18 x10 ⁹
22	6,2267	2,09 x10 ⁹
24	6,3433	1,43 x10 ⁹
26	6,4600	1,69 x10 ⁹
28	6,2067	1,90 x10 ⁹
30	5,5867	2,27 x10 ⁹
32	5,2467	2,11 x10 ⁹
34	4,8600	2,25 x10 ⁹
38	4,9900	3,23 x10 ⁹
40	4,3600	3,70 x10 ⁹
42	4,4600	3,70 x10 ⁹
44	4,3800	3,37 x10 ⁹
46	4,1000	4,27 x10 ⁹
48	4,1117	2,32 x10 ⁹

Fonte: Autor (2024)

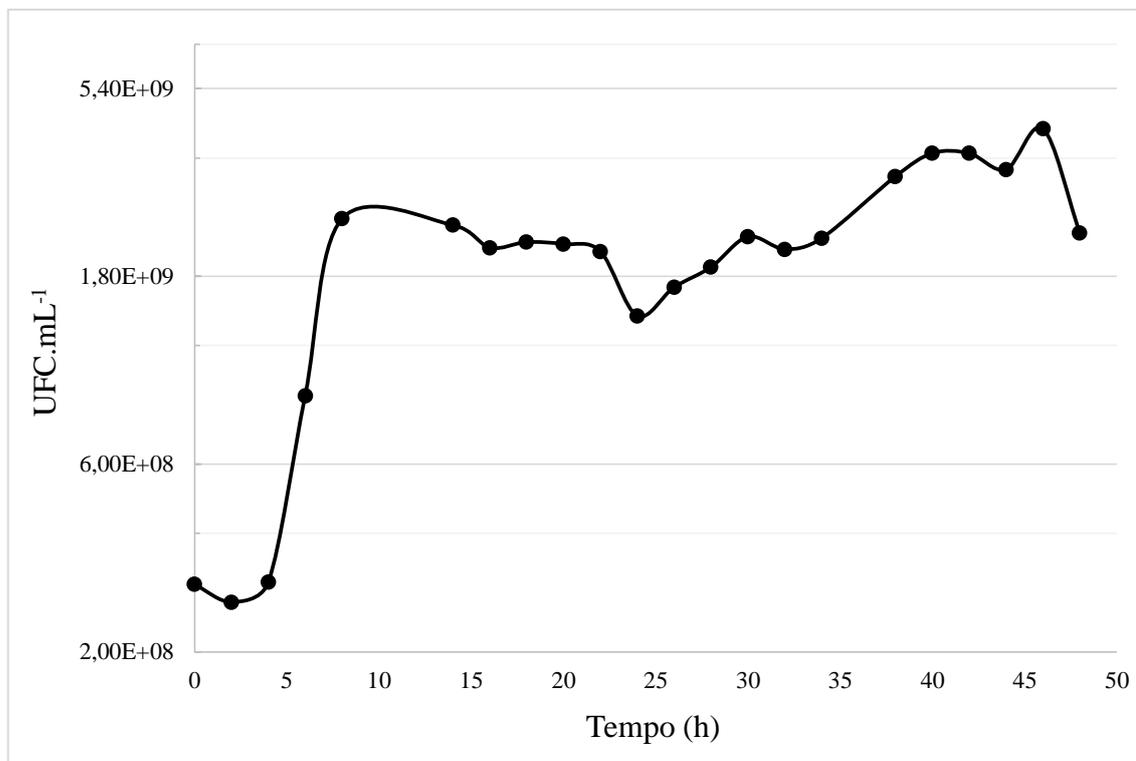


Figura 27: Curva de crescimento tempo (h) x UFC.mL⁻¹ (concentração de 18 g/L dos substratos)
Fonte: Autor (2024)

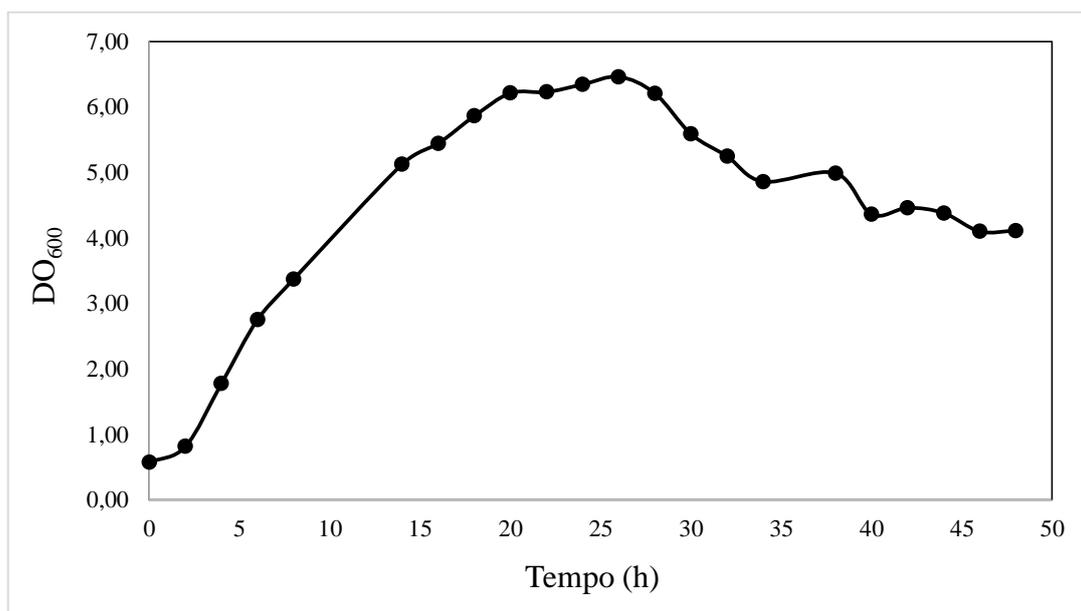


Figura 28: Curva de crescimento tempo (h) X DO₆₀₀ (concentração de 18 g/L dos substratos)
Fonte: Autor (2024)

Ao se adicionar mais substratos ao meio de cultura, foi observado um crescimento mais rápido do microrganismo, com uma pequena redução da concentração microbiana na fase lag, entre os tempos 0h e 2h de cultivo. A partir da quarta hora de fermentação a bactéria *B. amyloliquefasciens* BIB0129 iniciou a fase exponencial de crescimento, que se estendeu até a oitava hora da fermentação, totalizando 4 horas de fase logarítmica, entrando a partir deste momento na fase estacionária. Ao final do experimento a concentração de células obtidas foi de $2,32 \times 10^9$ UFC/mL, não obtendo uma diferença significativa em relação a concentração de 8,4 g/L dos substratos.

A curva de crescimento Tempo (h) x DO₆₀₀ para a concentração de 18 g/L dos substratos, mostrou um aumento constante dos valores de absorvância até as 26 horas de cultivo, seguido de uma queda da DO₆₀₀ até as 48 horas. Ao se aumentar a concentração de substratos no meio de cultura, *B. amyloliquefasciens* cepa BIB 0129 apresentou um crescimento irregular se comparado a curva de crescimento em que foi utilizada uma concentração menor de substratos no meio de cultura, uma vez que, o aumento constante da absorvância até as 26 horas não coincidiu com o crescimento celular observado na figura 27, em que a concentração máxima resultante da fase log foi obtida na oitava hora de cultivo.

As quedas dos valores de absorvância do cultivo podem estar relacionadas ao fim da fase exponencial de crescimento, em que as células se encontram mais alongadas para que ocorra a divisão celular. De acordo com Chien et al (2012), durante a divisão celular, células de *B. subtilis* dobram de massa para na sequência se dividirem ao meio formando 2 células filhas de tamanho equivalente. O meio de cultura também exerce relação com o tamanho das células. Schaechter et al (1958) e Kjeldgaard et al (1958) observaram que células de *Salmonella* apresentavam tamanho duas vezes maior quando crescidas em meio rico em nutrientes, do que células cultivadas em um meio pobre em nutrientes. O mesmo comportamento de controle dependente do tamanho das células e disponibilidade de nutrientes também foi observado em *B. subtilis* (PIERUCCI et al, 1987; SARGENT, 1975). Valores elevados de absorvância podem ter sido observados na fase de crescimento exponencial em decorrência da maior disponibilidade de substratos nesta etapa. O esgotamento de nutrientes após a fase logarítmica pode ter impactado na redução do tamanho celular, acarretando na queda dos valores de absorvância. Além disso, o esgotamento de nutriente é um sinalizador para as células vegetativas de *Bacillus* para o início do processo de esporulação, onde há uma perda citosplasmática gradual até a total lise celular e liberação do esporo.

4.3 Cinética de crescimento

Com base nos dados de UFC/mL mostrados nas tabelas 3 e 4 e nas curvas de crescimento apresentadas nas figuras 21 e 23 foram identificados os intervalos em que ocorreu a fase de crescimento exponencial. Nesses intervalos foram realizados os estudos de cinética, e para isso foi calculado o ln dos valores de UFC/mL e foram gerados os gráficos de dispersão, juntamente com a equação da reta. Os valores de velocidade específica de crescimento e tempo de geração podem ser observados na tabela 5 e nas figuras 29 e 30.

Tabela 5: Valores de cinética de crescimento de *B. amyloliquefasciens* BIB029 (h^{-1})

Concentração (Sacarose e extrato de levedura)	Velocidade específica (μ) (h^{-1})	Tempo de geração (h)
8,4 g/L	0,2527	3,14
18 g/L	0,5312	1,30

Fonte: Autor (2024)

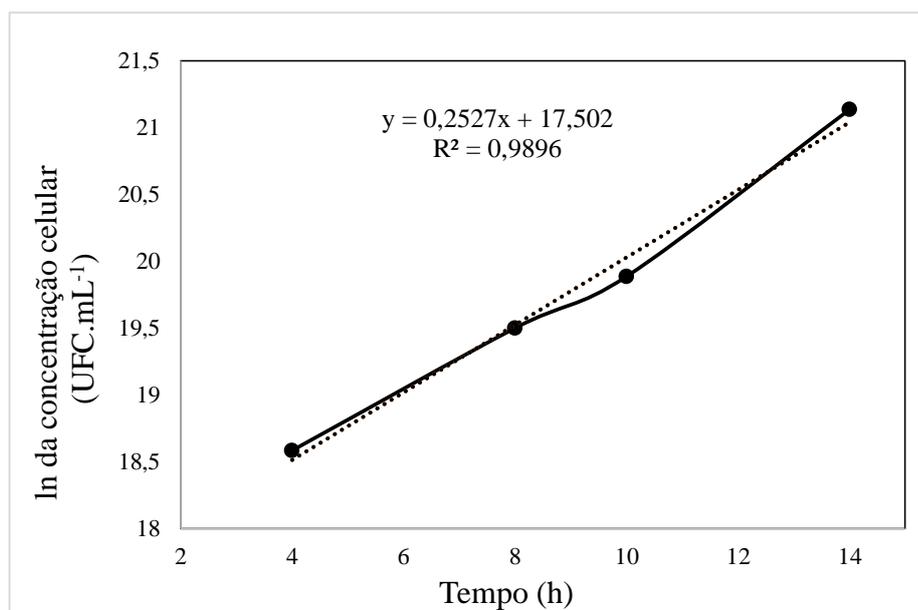


Figura 29: Cinética de crescimento fase log para a concentração de 8,4 g/L dos substratos.

Fonte: Autor (2024)

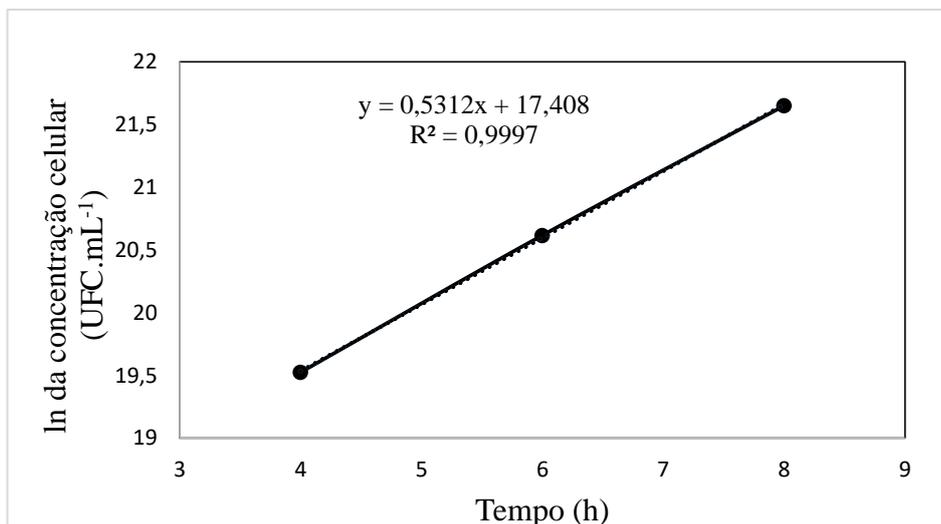


Figura 30: Cinética de crescimento fase log para a concentração de 18 g/L dos substratos.

Fonte: Autor (2024)

Ambos os parâmetros cinéticos, de velocidade específica de crescimento celular (μ_x) e tempo de geração (tg) foram maiores quando a concentração dos substratos no meio de cultura estava maior.

Para a concentração de 8,4 g/L dos substratos foi concluído que a fase log de crescimento se iniciou por volta da 4ª hora de cultivo e se estendeu até a 14ª hora de cultivo totalizando 10 horas de fase log. A partir da equação da reta, podemos concluir que a velocidade de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) é $0,25 \text{ h}^{-1}$. Com o valor de $\mu_{m\acute{a}x}$ e a partir das equações diferenciais, temos que o tempo de geração de *B. amyloliquefaciens* para o tratamento de menor concentração foi de 3,14 horas.

Por outro lado, quando se aumentou a concentração de substratos no meio de cultura (18 g/L), *B. amyloliquefaciens* BIB0129 também iniciou a fase log de crescimento celular após 4 horas de fermentação, porém chegou ao fim da fase log após 8 horas de cultivo, atingindo a concentração celular de $2,52 \times 10^9 \text{ UFC/mL}$, conforme pode ser observado na tabela 5. A velocidade de crescimento celular ($\mu_{m\acute{a}x}$) no tratamento 2 foi de $0,53 \text{ h}^{-1}$, e o tempo de geração de 1,30 horas.

De acordo com Morais e Bonomi (2021), são as equações cinéticas que indicam como as variáveis do experimento interferem nas velocidades de crescimento, morte celular, geração de produtos e também consumo de substratos, sendo necessário tratar os dados experimentais, desprezando os pontos que apresentaram erros grosseiros. Dessa maneira, foram excluídos os pontos experimentais em que os valores de UFC/mL destoaram do restante.

Martín et al (2021) estudaram a cinética de crescimento de *Bacillus pumilus* cepa CCIBP-C5, em diferentes meios de cultivo a base de farinha de soja como fonte de nitrogênio e melaço de cana e quitina coloidal como fontes de carbono. Foram obtidos tempos de geração de 1,94 horas para o meio a base de farinha de soja e quitina e 2,67 horas para o meio utilizando farinha de soja e melaço de cana.

Silva et al (2021) também testaram diferentes meios de cultura para otimizar o crescimento e produção de celulases de *Bacillus licheniformis* BCLLNf-01. Em experimentos, foi observado que em meio BLM + 0,5% CMC, *B. licheniformis* apresentou uma velocidade de crescimento de $0,06 \text{ h}^{-1}$, por outro lado, nos meios enriquecidos com glicose e caseína as taxas de crescimento foram maiores. Nos meios BLM + 1% de glicose e BLM + 1% de glicose + 1% de caseína *B. licheniformis* apresentou $\mu = 0,11 \text{ h}^{-1}$.

De acordo com Anderson e Jayaraman (2003) a natureza e as características dos substratos utilizados no meio de cultura interferem no metabolismo do microrganismo, incluindo a expressão de enzimas e metabólitos. O fluxo de metabólitos possui uma relação direta com a concentração de substratos.

4.4 Cinética do consumo de nitrogênio

A partir da análise do teor de nitrogênio pelo método de Kjeldahl, foram geradas médias dos teores de nitrogênio da amostra em função do tempo conforme os dados apresentados na tabela 6 para o tratamento 1 (concentração de 8,4 g/L dos substratos) e tabela 7 para o tratamento 2 (concentração de 18 g/L).

Os valores expressos na tabela 6 mostram a porcentagem de nitrogênio em 1 mL de amostra analisada.

Tabela 6. Porcentual (%) e concentração (g/L) de Nitrogênio na amostra para concentração de 8,4 g/L dos substratos nos diferentes tempos de cultivo

Tempo (h)	% de N	g/L de Nitrogênio
0	0,1115	1,1150
4	0,1048	1,0480
8	0,1012	1,0124
14	0,0933	0,9331
18	0,0922	0,9220
22	0,0929	0,9293
28	0,0925	0,9251
38	0,0895	0,8952
42	0,0884	0,8839
44	0,0896	0,8964
46	0,0903	0,9026

Fonte: Autor (2024)

Valores baixos de teor de nitrogênio foram encontrados ao longo da fermentação. Para efeito de comparação também foi analisado o meio de cultura estéril que apresentou uma concentração de 1,2780g/L de nitrogênio no meio de cultura, valor um pouco acima do encontrado no sobrenadante do tempo zero. Conforme o gráfico presente na Figura 31, podemos observar uma queda na concentração de nitrogênio ao longo da fermentação.

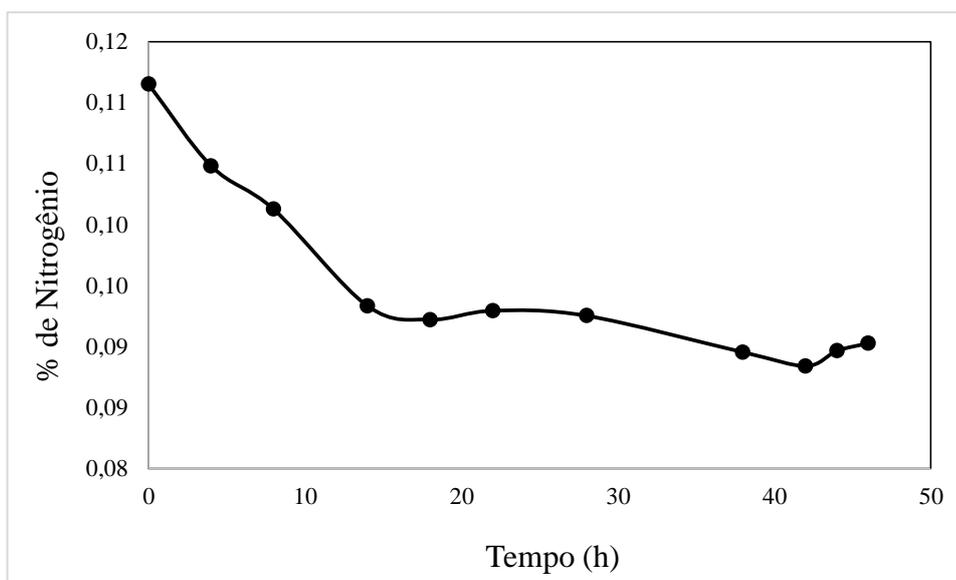


Figura 31: Porcentual (%) de Nitrogênio na amostra para concentração de 8,4 g/L dos substratos nos diferentes tempos de cultivo

Fonte: Autor (2024)

A partir dos resultados mostrados no gráfico pode ser concluído que o maior consumo de nitrogênio ocorre entre os tempos 0 e 14 horas, coincidindo com a fase log de crescimento celular que ocorreu no intervalo de tempo 4h a 14h.

A partir da curva de consumo de nitrogênio do meio de cultura com *B. amyloliquefaciens*, observa-se que o consumo de nitrogênio foi baixo ao longo das 48 horas de fermentação, variando de 1,1150g/L no tempo zero a 0,9026g/L de N no tempo 46. O maior consumo de nitrogênio foi observado entre a quarta hora de fermentação e a décima quarta hora, caracterizando a fase log. Após esse momento foi observada uma estabilização dos valores de Nitrogênio, conforme observado na figura 28.

Para o tratamento 2, em que a fonte de Nitrogênio (extrato de levedura) foi aumentada o consumo de nitrogênio variou de 2,47g/L no tempo zero a 2,30g/L no tempo 48, conforme os dados apresentados na tabela 6 que contém os valores de % de N resultante das análises e conversão para g/L de acordo com o tempo de fermentação. O meio de cultura estéril também foi analisado pelo método Kjeldahl, apresentando concentração de nitrogênio de 2,42g/L. A curva de consumo de nitrogênio pode ser observada na figura 32.

Tabela 7: Porcentual (%) e concentração (g/L) de Nitrogênio na amostra para a concentração de 18 g/L dos substratos nos diferentes tempos de cultivo.

Tempo (h)	% de N	g/L de N
0	0,2473	2,4729
4	0,2472	2,4725
8	0,2317	2,3169
14	0,2246	2,2457
18	0,2246	2,2459
22	0,2248	2,2482
24	0,2261	2,2607
28	0,2228	2,2276
38	0,2275	2,2748
42	0,2290	2,2897
44	0,2284	2,2840
46	0,2301	2,3007

Fonte: Autor, 2024

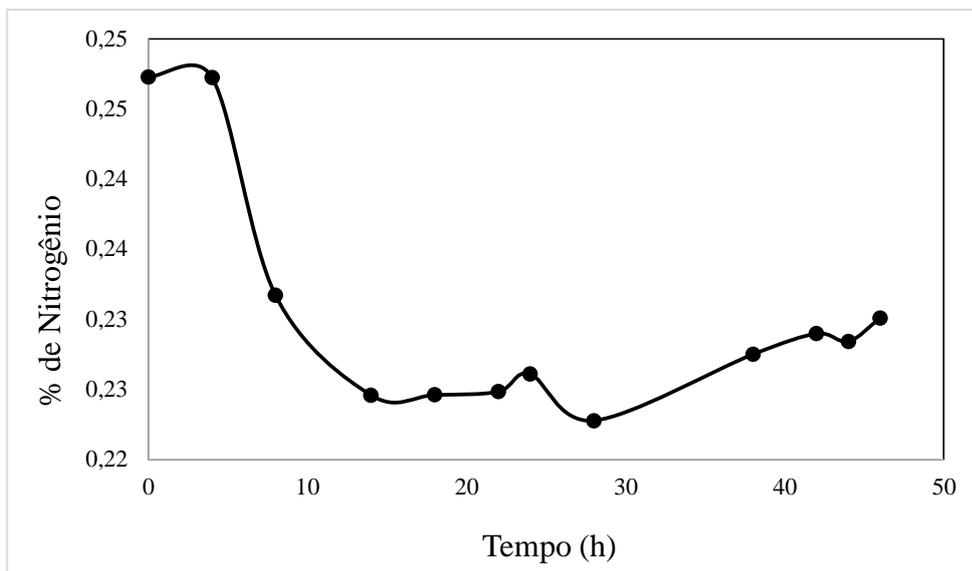


Figura 32: Porcentual (%) de Nitrogênio na amostra para concentração de 18 g/L dos substratos nos diferentes tempos de cultivo
Fonte: Autor (2024)

Para os estudos de cinética do consumo de nitrogênio no meio de cultura, foram calculados os valores de \ln da concentração em g/L de nitrogênio, na fase log de crescimento. Os valores de velocidade instantânea (μ_s) estão descritos na tabela 7, e nas figuras 33 (concentração de 8,4 g/L dos substratos) e 34 (Concentração de 18 g/L dos substratos).

Tabela 8: Valores de cinética de consumo de nitrogênio (h^{-1})

Concentração de substratos	μ_s (h^{-1})
8,4 g/L	-0,0124
18 g/L	-0,0093

Fonte: Autor (2024)

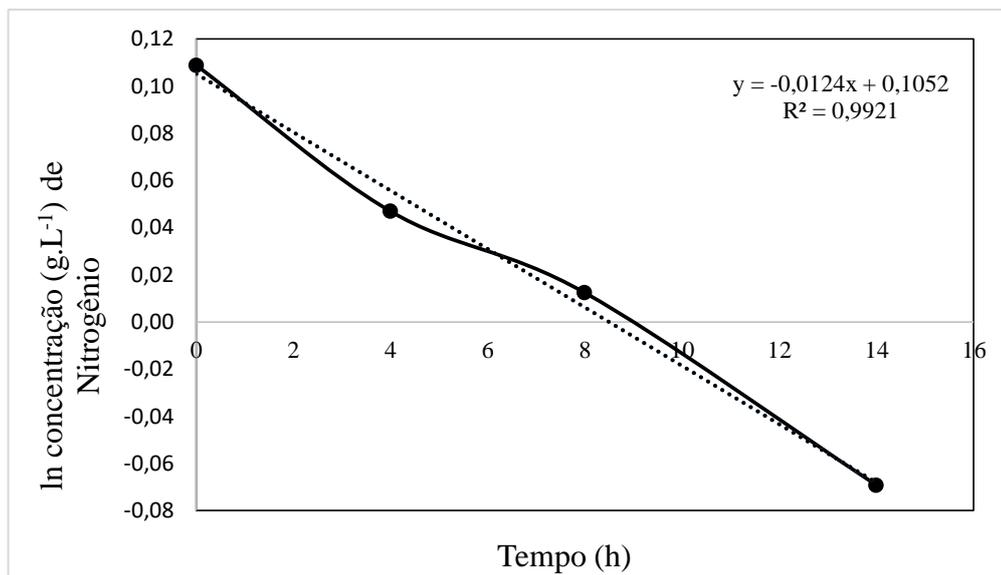


Figura 33: Cinética do consumo de Nitrogênio – Concentração de 8,4 g/L dos substratos

Fonte: Autor (2024)

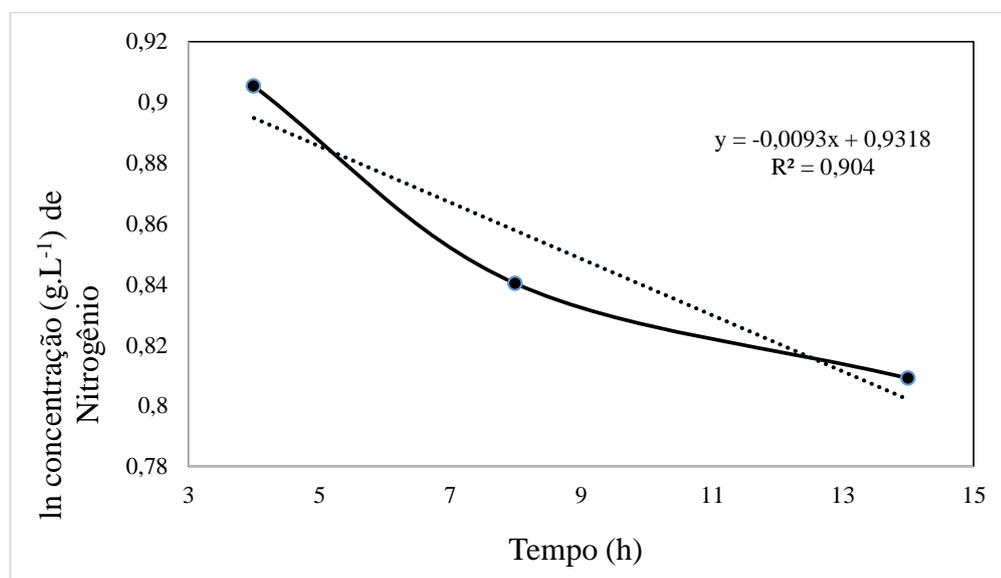


Figura 34: Cinética do consumo de nitrogênio - Concentração de 18 g/L dos substratos

Fonte: Autor (2024)

Conforme a equação dada pela regressão dos dados, o μ_s para o consumo de nitrogênio foi de $0,0124\text{h}^{-1}$ para o consumo de nitrogênio no tratamento 1. Diferenças na velocidade instantânea de consumo do substrato (μ_s) foram observadas com alterações no meio de cultura. Com concentração mais elevada de substrato (tratamento 2) a velocidade instantânea foi de $0,0093\text{h}^{-1}$, valor mais baixo se comparado ao tratamento 1.

A fase exponencial de crescimento microbiano é a fase mais importante para estudos de fisiologia e cinética dos microrganismos, pois nela é possível observar a

influência de uma série de fatores, entre eles a composição do meio de cultura, a partir das modificações resultantes na curva de crescimento (ALTERTHUM et al, 2020).

Em fermentações de microrganismos, o substrato pode ser consumido com a finalidade de obtenção de algum produto específico como por exemplo em indústrias de produção de etanol ou simplesmente, o substrato será utilizado para a manutenção da biomassa celular. De acordo com Hiss (2001), em fermentações industriais dificilmente são observados valores constantes de conversão de substrato em produto, pois isso depende da relação do microrganismo com o substrato, demais componentes do meio e também da parcela de energia do microrganismo destinada para manutenção das suas funções vitais.

Alves et al (2020) em fermentações utilizando *Bacillus megaterium* para produção do polímero poli(3-hidroxibutirato), observaram um baixo consumo de nitrogênio em suas fermentações, variando o consumo entre 0,09g/L e 0,13g/L.

O consumo de nitrogênio está fortemente ligado a disponibilidade de oxigênio no meio (RANGARAJAN; CLARKE, 2016), e a fonte de nitrogênio utilizado e suas concentrações impactam no rendimento das fermentações. Ganesan e Rangarajan (2021), investigaram o efeito da fonte de nitrogênio utilizada e seu impacto na produção de surfactina utilizando *B. subtilis* MTCC 2415. Foram testados meios de cultura utilizando como fonte de nitrogênio NaNO_3 e NH_4Cl , sendo combinados em diferentes concentrações. O melhor rendimento na produção de surfactina foi obtido combinando-se os dois sais em proporções iguais (50% NaNO_3 e 50% NH_4Cl).

Anderson e Jayaraman (2003) em experimentos com *Bacillus thuringiensis* var *Galleriae* estudaram os efeitos da concentração de glicose e extrato de levedura no crescimento e esporulação da espécie. Variando as concentrações de glicose entre 3,4 g/L e 34 g/L, e extrato de levedura entre 1 g/L e 20 g/L, os autores observaram que altas concentrações de glicose no meio de cultura resultaram em uma população heterogênea de células vegetativas, e altas concentrações de extrato de levedura prejudicaram a síntese de componentes do esporo, dificultando a esporulação.

Tian et al (2022) testaram a otimização do meio de cultura LB, com o objetivo de aumentar a taxa de esporulação de *Bacillus subtilis* BSNK-5, para isso o extrato de levedura foi substituído por glicose, sacarose, amido solúvel e lactose. Maiores taxas de esporulação ocorreram quando o extrato de levedura foi substituído por amido solúvel no meio de cultura (3 g/L), atingindo uma eficiência de esporulação de 86,8%. Também foi avaliado o efeito da substituição da triptona do meio de por outras fontes de nitrogênio.

Farinha de soja, extrato de carne, ureia e sulfato de amônio tiveram seus efeitos avaliados na esporulação de *B. subtilis* BSNK-5. Valores maiores de esporulação foram obtidos ao se utilizar fontes orgânicas de nitrogênio (triptona, farinha de soja e extrato de carne). A maior taxa de esporulação (82,6%) foi obtida ao se utilizar farinha de soja na concentração de 12 g/L, atingindo um total de $9,8 \times 10^8$ UFC/mL de esporos bacterianos.

4.5 Cinética consumo de carboidratos

A partir das análises realizadas pelo método de cromatografia líquida foi observado o consumo de açúcares ao longo do tempo nas fermentações. A cada quatro horas foi avaliada em triplicata a concentração de açúcares no sobrenadante. A partir do cromatograma foram identificados os picos de energia aos 11, 13 e 14 minutos de corrida da amostra pela coluna, intervalo em que são gerados os picos de energia para detecção de sacarose, glicose e frutose respectivamente. A presença de glicose e frutose (monossacarídeos) no sobrenadante ocorreu a partir do metabolismo da sacarose, um dissacarídeo. A área dos picos foi utilizada para o cálculo das concentrações em g/L conforme a curva de calibração presentes nos apêndices A, B e C. As concentrações em g/L podem ser observadas na tabela 9 para a concentração de 8,4 g/L dos substratos (tratamento 1) e tabela 10 para a concentração de 18 g/L (tratamento 2)

Tabela 9: Concentração em g/L de sacarose, glicose e frutose – Concentração de 8,4 g/L dos substratos

Tempo (h)	Sacarose g/L	Glicose g/L	Frutose g/L
0	0,9214	4,3069	1,6109
4	0,5384	4,0613	2,9744
8	0,4592	3,1079	2,4373
14	0,4766	1,3934	0,3561
18	0,3458	0,2538	0,1771
22	0,1340	0,0694	0,2466
24	0,0335	0,0237	0,1990
28	0,1812	0,0205	0,2088
32	0,0325	0,0146	0,1043
38	0,0298	0,0146	0,1202
42	0,0270	0,0146	0,1662
46	0,0270	0,0146	0,1294

Fonte: Autor (2024)

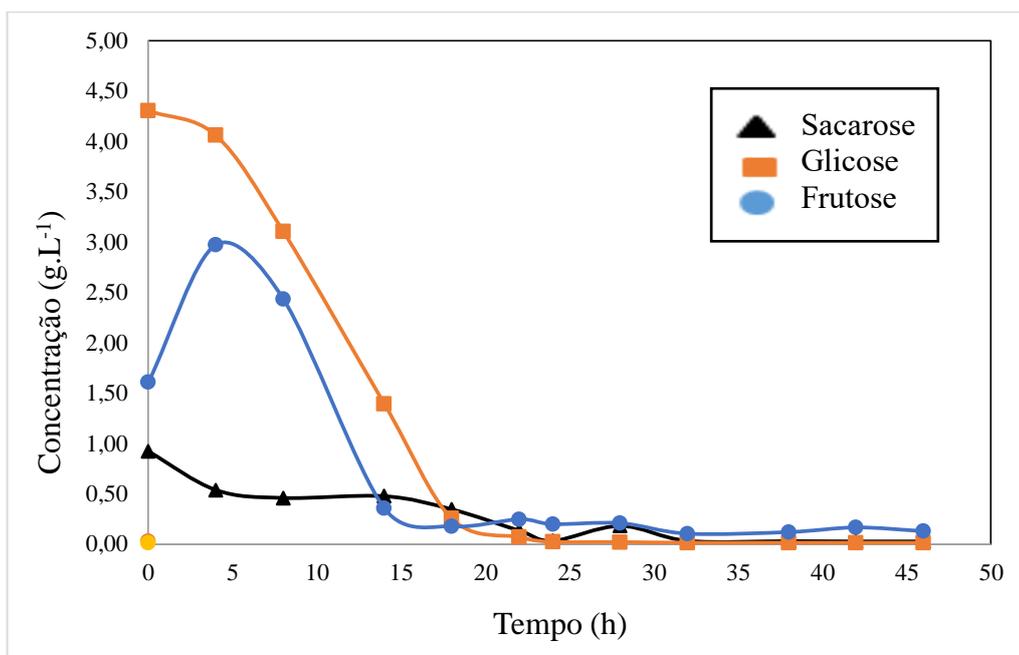


Figura 35: Consumo de açúcares (g/L) em função do tempo (h) para a concentração de 8,4 g/L dos substratos. O triângulo representa a sacarose, o quadrado a glicose e o círculo a frutose.

Fonte: Autor (2024)

Tabela 10: Concentração em g/L de sacarose, glicose e frutose – concentração de 18 g/L dos substratos

Tempo (h)	Sacarose (g/L)	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)
0	1,8179	8,1928	3,3199
4	0,1816	8,2923	5,3556
8	0,0567	6,4456	4,5162
14	0,0574	4,0710	1,9442
18	0,0590	2,9430	0,5279
22	0,0597	0,3421	0,1187
24	0,0401	0,0218	0,0521
28	0,0270	0,0278	0,0901
32	0,0270	0,0322	0,1179
38	0,0270	0,0286	0,1688
42	0,0270	0,0301	0,2235
46	0,0270	0,0268	0,2948

Fonte: Autor (2024)

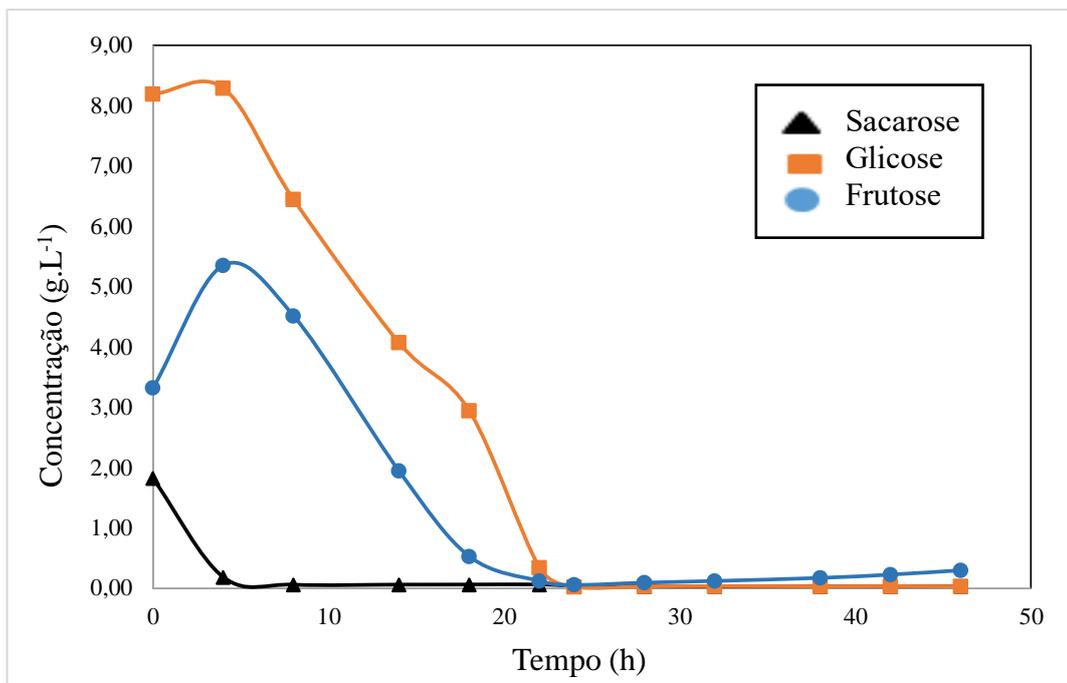


Figura 36: Consumo de açúcares (g/L) em função do tempo (h) para a concentração de 18g/L dos substratos. O triângulo representa a sacarose, o quadrado a glicose e o círculo a frutose.

Fonte: Autor (2024)

Em ambos os tratamentos pode ser observada uma concentração baixa de sacarose desde o tempo 0, momento em que foi feita a inoculação de 200 mL da suspensão no volume total do Erlenmeyer da fermentação. A concentração inicial de sacarose para o tratamento 1 foi de 0,9214 g/L e de 1,8179 g/L para o tratamento 2. Valores baixos de sacarose no tempo zero podem ter sido encontrados devido ao tempo de congelamento da amostra após a sua retirada, uma vez que a partir da coleta da amostra houve um intervalo de aproximadamente 30 minutos até a etapa de centrifugação e conseqüentemente o congelamento. Este intervalo de tempo pode ter sido suficiente para que o microrganismo já iniciasse o metabolismo do carboidrato quebrando-o em glicose e frutose.

No tratamento 1 foi observada uma queda na concentração de glicose a partir do tempo zero, atingindo valores próximos a 0 nas 22 horas de fermentação (0,0694 g/L). Para o tratamento 2 nas quatro primeiras horas houve um pequeno aumento na concentração de glicose, que começou a ser consumida a partir das quatro horas de fermentação, chegando a 0,0218 g/L de glicose na 24ª hora de fermentação.

Em relação a frutose, em ambos os tratamentos houve um aumento na concentração de frutose nas 4 primeiras horas de fermentação. No tratamento 1 concentrações próximas a zero (0,1771 g/L) foram obtidas quando a fermentação atingiu

a marca de 18 horas de crescimento. Para o tratamento 2 a concentração de 0,1187 g/L de frutose, foi identificada as 22 horas de fermentação. Em ambos os tratamentos, foi observado um comportamento semelhante de consumo de carboidratos, embora se diferenciasssem nas concentrações.

Diferenças na velocidade de consumo dos substratos foram observadas entre os dois tratamentos, sendo as velocidades específicas para o tratamento 2 (18 g/L) maiores se comparadas ao tratamento 1 (8,4 g/L) conforme pode ser observado na tabela 11.

Tabela 11: Velocidades específicas de consumo dos substratos (μ_s) (h^{-1})

Tratamento	μ_s Sacarose (h^{-1})	μ_s Glicose (h^{-1})	μ_s Frutose (h^{-1})
8,4 g/L	-0,0332	-0,2364	-0,2226
18 g/L	-0,4091	-0,4202	-0,3178

Fonte: Autor (2024)

As análises do sobrenadante pelo método de cromatografia líquida (HPLC) evidenciaram uma possível produção de ácidos orgânicos por *B. amyloliquefasciens* BIB0129. Os cromatogramas das amostras dos tratamentos indicaram a presença de picos de energia nos 18, 21 e 25 minutos de corrida da amostra a partir da oitava hora de fermentação, conforme pode ser observado na figura 37. Pelos padrões da coluna C610H utilizada, picos de energia no tempo 18 podem ser indicativos da presença de ácido láctico, enquanto que no tempo 21 apontam a produção de ácido acético e no tempo 25, ácido propiônico.

Em ambos os tratamentos, foram observados picos no cromatograma aos 8, 10 e 28 minutos de passagem da amostra pela coluna. Pelos padrões da coluna não há produção de ácidos aos 8 e 10 minutos. Picos de energia aos 28 minutos de corrida da amostra podem ser indicativos da produção de ácido isobutírico.

Carvalho et al (2023) realizou o sequenciamento genético de *B. amyloliquefasciens* BIB 0129, e na sequência de genes não foram identificados trechos responsáveis pela produção de ácido isobutírico. Dessa maneira os picos de energia aos 8, 10 e 28 minutos observados no cromatograma foram desconsiderados. Em seus trabalhos *B. amyloliquefasciens* é citada como *B. velezensis*.

Uma linhagem de bactérias anteriormente classificadas como como *B. amyloliquefasciens* subsp. *Plantarum*, intimamente associadas a plantas foram reclassificadas como *B. velezensis* estando a cepa desse estudo classificada nessa categoria. Wang et al (2008) comparou a cepa BCRC 17467^T de *B. velezensis* com a cepa BCRC 14193 de *B. amyloliquefasciens*. As cepas compartilharam semelhança de mais de 99% do gene 16S rRNA e 98,4% da sequência de genes *gyrB*, sendo, portanto, tratados como sinônimos.

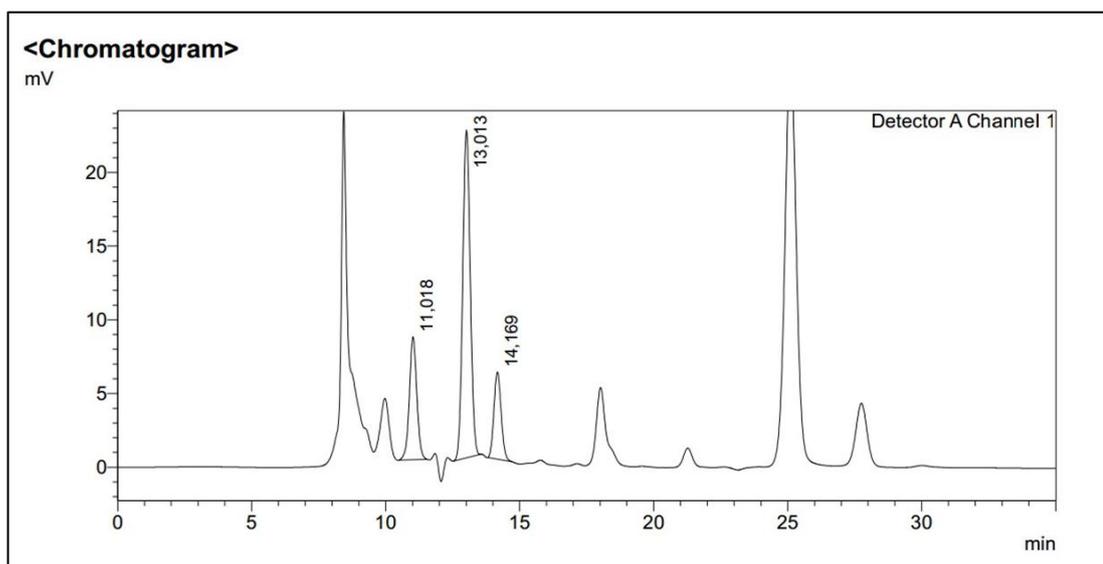


Figura 37: Cromatograma da 14^a hora de fermentação, para a concentração de 8,4 g/L dos substratos.

Fonte: Autor (2024).

Vignesh Kumar et al (2022), investigaram a presença e a produção de ácido láctico em fermentações utilizando *Bacillus amyloliquefasciens*. A cepa J2V2AA de *B. amyloliquefasciens* apresentou a maior produção de ácido láctico comparado as demais cepas, sendo sua máxima produção de 175 mg/mL em 24 horas de fermentação em meio de cultura suplementado com 30% de melão de cana. No presente estudo não foi quantificada a presença de ácidos orgânicos, apenas a detecção da sua presença pela coluna C610H. Cepas de *Bacillus* spp. (bactérias gram-positivas) apresentam avanços na produção de ácido láctico, permitindo a redução dos custos do processo de produção, uma vez que podem crescer e produzir ácido láctico em meio com sais minerais e pobres em nitrogênio, em comparação com outras bactérias lácticas (ABDEL-RAHMAN et al, 2013), podendo a produção de ácidos orgânicos ser importante do ponto de vista biotecnológico, visto que é um mecanismo de ação natural dos microrganismos para solubilização de

nutrientes do ambiente. No sequenciamento genético de BIB 0129 realizado por Carvalho et al (2023) foram identificadas rotas metabólicas de biossíntese dos ácidos láctico, acético e propiônico.

Ácidos orgânicos são formados como resultado do crescimento bacteriano e metabolismo de compostos e grande massa molecular (SHUKLA et al, 2010). Yan et al (2013), estudaram a produção de sete ácidos orgânicos (ácido málico, ácido láctico, ácido acético, ácido cítrico, ácido succinico, ácido propionico e ácido butirico) em *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, presentes no licor chinês, produto resultante da fermentação de grãos por estes microrganismos. Nos estudos realizados pelos autores foi detectada a produção de ácido acético por *B. licheniformis* por volta da 16ª hora de fermentação, havendo uma queda na sua produção com o decorrer da fermentação. A produção de ácido láctico por *B. subtilis* se manteve constante ao longo das 48 horas de fermentação. Por outro lado, o ácido propiônico foi produzido somente por *B. licheniformis* após as 16 horas fermentação, não houve produção do ácido por *B. subtilis*.

Diferentes concentrações de substrato não apresentam efeito somente na velocidade de consumo de substrato (μ_s) e na velocidade específica de crescimento celular (μ_x), como também no acúmulo de substâncias desejadas na fermentação.

Sharma et al, (2012), testaram o efeito de diferentes fontes de carbono na produção da enzima α -amilase a partir de *Bacillus amyloliquefasciens* (MTCC-1488). As concentrações de sacarose utilizadas no meio de cultura variaram de 1g/L a 6g/L, sendo que a melhor produção da enzima foi obtida na concentração de 3g/L. Concentrações de carboidratos mais próximas as concentrações utilizadas no presente estudo foram testadas por Mohanrasu et al (2020), que utilizaram diferentes fontes de carbono, entre elas glicose, sacarose e amido na concentração de 20g/L, para otimizar o acúmulo de polidroxibutirato (PHB) a partir de *Bacillus megaterium*. Os resultados obtidos pelos autores apontaram a glicose como a fonte que carbono que mais permitiu o acúmulo de PHB, em comparação com a sacarose (dissacarídeo) e o amido (polissacarídeo).

5. CONCLUSÃO

Diferentes concentrações de substrato interferem de várias formas na qualidade e rendimento de uma fermentação. Quando a concentração de sacarose e extrato de levedura foi aumentada para 18g/L, houve um aumento na velocidade específica de crescimento (μ_x) e velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), porém sem grande interferência na concentração final de células, que se mantiveram na ordem de 10^9 UFC/mL em ambos os tratamentos. Maiores velocidades de crescimento podem impactar em fermentações mais rápidas, acarretando em uma maior competitividade do microrganismo frente a outras espécies além de aumentar o rendimento de produção em um ambiente industrial. A mudança na concentração dos substratos também não apresentou grandes efeitos na produção dos ácidos orgânicos, que foram três em ambas as concentrações dos substratos. Estudos posteriores serão realizados para avaliação do comportamento do microrganismo após as 48 horas de fermentação, identificando a influência das concentrações dos substratos na esporulação e também na concentração de ácidos orgânicos produzida.

6. REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN, L.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation process. **Biotechnology advances**, v. 31, p. 877-902, 2013.

ALAM, S.; HONG, J.; WEIGAND, W. A. Effect of Yeast Extract on α -Amylase Synthesis by *Bacillus amyloliquefaciens*. **Biotechnology and Bioengineering**, Vol. 33, Pp. 780-785, 1989.

ALTERTHUM, F.; GAMBALE, W.; MONEZI, T.A. Elementos de microbiologia. In: Alterthum, F.; Schmidell, W.; Lima, U.A.; Moraes, I.O. **Biotecnologia Industrial – Fundamentos 2ª ed.** São Paulo: Blucher, 2020. p. 15- 51

ALVES, M. I., MACAGNAN, K. L., PIECHA, C. R., TORRES, M. M., RODRIGUES, R.S.; DIAZ, P. S., MOREIRA, A. S. Efeito do pH e sacarose no acúmulo de P (3HB) por *Bacillus megaterium* CN3 utilizando DCCR 22. **Brazilian Journal of Development**, (2020) 6(4), 19116-19122.

ANDERSON, R. K. I.; JAYARAMAN, K. Influence of carbon and nitrogen sources on the growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* var *galleriae* for biopesticide production. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**. 17 (3) 225-231, 2003.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Anvisa divulga número de produtos de base biológica aprovados em 2022 para uso na agricultura. Disponível em: < <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2023/anvisa-divulga-numero-de-produtos-de-base-biologica-aprovados-em-2022-para-uso-na-agricultura>>. Acesso em 18 de novembro de 2023.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**, 16Ed. Washington, DC: AOAC. v. 1, 1995.

AUCH, A.F.; VON JAN, M.; KLENK, H.P.; GÖKER, M. Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. **Standarts in Genomic Science**. 2010, 2, 117–134.

BARROS, B. Há 40 anos, DDT precipitou restrições. Valor Econômico, São Paulo, 22 nov. 2010. **Agronegócios**, p. B12.

BERKELEY, R.C.W.; LOGAN, N.A.; SHUTE, L.A.; CAPEY, A.G. Identification of *Bacillus* species. In **Methods in Microbiology**; Academic Press: Landon, Volume 16, pp. 292–328, 1984.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.; PINTO, Z. V.; LUCON, C. M. M. Controle de qualidade e conformidade de produtos e fermentados à base de *Bacillus* spp.: proposta metodológica: **Embrapa**, Jaguariúna 2022.

BORSARI, A. Bioinsumos: Mercado de R\$ 17 bilhões até 2030. **Globo rural**, 2023. Disponível em < <https://globorural.globo.com/opiniaovozes-do-agro/noticia/2023/05/bioinsumos-mercado-de-r-17-bilhoes-ate-2030.ghtml>>. Acesso em: 29 de abril de 2024.

CARDOSO, E.J.B.N.; ESTRADA-BONILLA, G.A. Inoculantes Agrícolas. In: LIMA, U.A. **Biotecnologia Industrial – Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Blucher, 2019. p. (305-332)

CARVALHO, I.; APAZA-CASTILLO, G.A.; PAZ, I.C.P.; GUIMARÃES, A.M.; QUECINE, M.C.; BONATELLI, M.L. Draft Genome Sequence of the Plant Growth Promoter and Biocontrol Agent *Bacillus velezensis* Strain BIB 0110. **Microbiology Resource Announcements**. (2023), 12, 6.

CHIEN, A.C.; HILL, N.S.; LEVIN, P.A. Cell Size Control in Bacteria. **Current Biology** 22, R340–R349, May 8, 2012.

CHOWDHURY, S.P.; HARTMANN, A.; GAO, X.; BORRISS, R. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42—A Review. **Frontiers in Microbiology**. 2015, 6, 780.

CHOWDHURY, S.P.; UHL, J.; GROSCH, R.; ALQUÉRES, S.; PITTROFF, S.; DIETEL, K.; SCHMITT-KOPPLIN, P.; BORRISS, R.; HARTMANN, A. Cyclic lipopeptides of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. plantarum colonizing the lettuce rhizosphere enhance plant defense responses toward the bottom rot pathogen *Rhizoctonia solani*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. 2015, 28, 984–995.

DRIKS, A. Maximum shields: the assembly and function of the bacterial spore coat. **Trends in microbiology**, v. 10, n. 6, p. 251-254, 2002.

DUNLAP, C.A.; BOWMAN, M.J.; ROONEY, A.P. Iturinic lipopeptide diversity in the *Bacillus subtilis* species group—Important antifungals for plant disease biocontrol applications. **Frontiers in Microbiology**. 2019, 10, 1794.

FAN, B.; BLOM, J.; KLENK, H.P.; BORRISS, R. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* form an “operational group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* species complex. **Frontiers in Microbiology**. 2017, 8, 22.

FAN, B.; WANG, C.; SONG, X.; DING, X.; WU, L.; WU, H.; GAO, X.; BORRISS, R. *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The Gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. **Frontiers in Microbiology**. 2018, 9, 2491.

FERNANDES, G.; BRAGA, T. G.; FISCHER, J.; PARRELLA, R. A. C.; RESENDE, M. M.; CARDOSO, V.L. Evaluation of potential ethanol production and nutrients for four varieties of sweet sorghum during maturation. Evaluation of potential ethanol production and nutrients for four varieties of sweet sorghum during maturation. **Renewable Energy** 71 (2014) 518- 524

FRITZE, D. Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: The aerobic endospore-forming bacteria. **Phytopathology** (2004) 94(11): 1245-1248

FUKUMOTO, J. Studies on the production of bacterial amylase. I. Isolation of bacteria secreting potent amylases and their distribution. **Nippon. Nogeikagaku Kaishi** 1943, 19, 487–503.

GANESAN, N.G.; RANGARAJAN, V. A kinetics study on surfactin production from *Bacillus subtilis* MTCC 2415 for application in green cosmetics. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. Volume 33, May 2021, 102001.

GOBERT, A.; TOURDOT-MARÉCHAL, R.; SPARROW, C. MORGE, C.; ALEXANDRE, H. Influence of nitrogen status in wine alcoholic fermentation. **Food Microbiology** 2019; 83:71–85.

GONZÁLEZ-PASTOR, J. E. Cannibalism: a social behavior in sporulating *Bacillus subtilis*. **FEMS microbiology reviews**, v. 35, n. 3, p. 415-424, 2011.

HE, H.; LI, Y.; ZHANG, L.; DING, Z.; SHI, G. Understanding and application of *Bacillus* nitrogen regulation: A synthetic biology perspective. **Journal of Advanced Research** 49. (2023); 1-14.

HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In: Schmidell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W.R. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher; 2001. p. 93-122.

JUNIOR, A.F.; OLIVEIRA, D. Estequiometria e cinética de bioprocessos. In: Alterthum, F.; Schmidell, w.; Lima, U.A.; Moraes, I.O. **Biotecnologia Industrial – Fundamentos** 2ª ed. São Paulo: Blucher, 2020. p.323-373.

KASHYAP, B.K.; SOLANKI, M.K.; PANDEY, A.K.; PRABHA, S.; KUMAR, P.; KUMARI, B. *Bacillus* as plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A promising green agriculture technology. In *Plant Health under Biotic Stress*; **Springer Nature** Singapore Pte Ltd.: Singapore, 2019; pp. 219–236

KJELDGAARD, N.O.; MAALØE, O.; SCHAECHTER, M. The transition between different physiological states during balanced growth of *Salmonella typhimurium*. **Journal of General Microbiology**. 19, 607–616, 1958.

KUMAR, A.; KUMAR, R.; KUMARI, M.; GOLDAR, S. Enhancement of plant growth by using PGPR for a sustainable agriculture: A review. **International. Journal. of Current. Microbiology and. Applied. Sciences**. 2020, 9, 152–165.

LI, B.; LI, Q.; XU, Z.; ZHANG, N.; SHEN, Q.; ZHANG, R. Responses of beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to different soilborne fungal pathogens through the alteration of antifungal compounds production. **Frontiers in. Microbiology**. 2014, 5, 636.

LIMA, Frederico Alves. **Produção de biossurfactantes por *Bacillus amyloliquefaciens* IT45**. 2017. 97 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017. DOI <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2017.62>

- MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., BENDER, K. S., BUCKLEY, D. H., & STAHL, D. A. (2016). *Microbiologia de Brock-14ª Edição*. Artmed Editora
- MARTÍN, M.C.; RODRÍGUEZ, E.R.; SUARÉZ, M.A.; RODRÍGUEZ, E.; PICHARDO, T.; ROQUE, B.; CAPÓ, Y.A. Efecto de diferentes medios de cultivo em el crecimiento y la actividad antifúngica de *Bacillus pumilus* CCIBP-C5. **Biociencia Vegetal**. Vol. 21. No. 2: 94-102, 2021.
- MERTEN, G.H.; MINELLA, J.P. Qualidade da água em bacias hidrográficas rurais: um desafio atual para a sobrevivência futura. **Agroecologia e desenvolvimento rural sustentável**, v. 3, n. 4, p. 33-38, 2002.
- MOHANRASU, K.; RAO, R. G. R.; DINESH, G. H.; ZHANG, K.; PRAKASH, G. S.; SONG, D.P.; MUNIYASAMY, S.; PUGAZHENDHI, A.; JEYAKANTHAN, J.; ARUN, A. Optimization of media components and cultures conditions for polyhydroxyalkanoates production by *Bacillus megaterium*. **Fuel** 271 (2020) 117522
- MORAIS, E.R.; BONOMI, A. Modelagem matemática e simulação de bioprocessos. In: ALTERTHUM, F.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; MORAES, I.O. **Biociencia Industrial vol. 2**. São Paulo: Blucher, 2021. p. 171-240.
- NAKANO, M.M.; HOFFMANN, T.; Zhu, Y.; JAHN D. Nitrogen and oxygen regulation of *Bacillus subtilis* nasDEF encoding NADH-dependent nitrite reductase by TnrA and ResDE. **Journal of Bacteriology** 1998;180(20):5344–50.
- NGALIMAT, M.S.; SABRI, S. Taxonomic note: Speciation within the operational group *Bacillus amyloliquefaciens* based on comparative phylogenies of housekeeping genes. *Asia-Pac. J. Mol. Biology and Biotechnology*. 2020, 28, 19–26.
- NGALIMAT, M.S.; YAHAYA, R.S.R.; BAHARUDIN, M.M.A.; YAMINUDIN, S.M.; KARIN, M.; AHMAD, S.A.; SABRI, S. A review on the biotechnological applications of the operation group *Bacillus amyloliquefaciens*. **Microorganisms** 2021, 9, 614. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030614>.
- OH, Y.K.; PALSSON, B.O.; PARK, S.M.; SCHILLING, C.H.; MAHADEVAN, R. Genome-scale Reconstruction of Metabolic Network in *Bacillus subtilis* Based on Highthroughput Phenotyping and Gene Essentiality Data. **Journal of Biological Chemistry** 2007;282 (39):28791–9. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M703759200> .
- OLIVEIRA, H. N.; ÁVILA, C. J. Controle biológico de pragas no Centro-Oeste brasileiro. In: **GeBio: Revista de Controle Biológico**, p. 11-13, abr. 2010. Disponível em: < <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/874083>>; Acesso em 08 de abril de 2024.
- PAZ, I.C.P.; SANTIN, R.C.M.; GUIMARÃES, A.M.; ROSA, O.P.P.; DIAS, A.C.F.; QUECINE, M.C.; AZEVEDO, J.L.; MATSUMURA, A.T.S. Eucalyptus growth promotion by endophytic *Bacillus* spp. **Genetics and Molecular Research**. 2012. 11:3711–3720. doi: 10.4238/2012.August.17.9.

PAZ, I.C.P.; SANTIN, R.C.M.; GUIMARÃES, A.M.; ROSA, O.P.P.; QUECINE, M.C.; SILVA, M.C.P.E.; AZEVEDO, J.L.; MATSUMURA, A.T.S. Biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Calonectria gracilis* by eucalyptus growth promoters *Bacillus* spp. **Microbial Pathogenesis** 2018 121:106–109.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.05.026>

PIERUCCI, O.; HELMSTETTER, C.E.; RICKERT, M.; WEINBERGER, M.; LEONARD, A.C. Overexpression of the *dnaA* gene in *Escherichia coli* B/r: chromosome and minichromosome replication in the presence of rifampin. **Journal of Bacteriology**. 169, 1871–1877, 1987.

PRIEST, F.G.; GOODFELLOW, M.; SHUTE, L.A.; BERKELEY, R.C.W. *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**. 1987, 37, 69–71

RANGARAJAN, V.; CLARKE, K.G. Towards bacterial lipopeptide products for specific applications – a review of appropriate downstream processing schemes. **Process Biochemistry**. 51, 2176 – 2185, 2016.

REID, S. J.; ABRATT, V.R. Sucrose utilisation in bacteria: genetic organisation and regulation. **Applied Microbiology and Biotechnology** (2005) 67: 312–321 DOI 10.1007/s00253-004-1885-y.

RODRIGO, P. Mais de 100 milhões de abelhas morrem por uso indevido de agrotóxico. Estado de Minas, 21 de julho de 2023. Disponível em:<
https://www.em.com.br/app/noticia/nacional/2023/07/21/interna_nacional,1523480/mas-de-100-milhoes-de-abelhas-morrem-por-uso-indevido-de-agrotoxico.shtml> Acesso em: 29 de abril de 2024.

SARGENT, M.G. Control of cell length in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**. 123, 7–19, 1975.

SCHAECHTER, M.; MAALØE, O.; KJELDGAARD, N.O. Dependency on medium and temperature of cell size and chemical composition during balanced grown of *Salmonella typhimurium*. **Journal of General Microbiology** .19, 592–606, 1958.

SERRANO, M.; FIOR, R.; NEVES, A.; HENRIQUES, A.O. Comunicação inter-celular durante a esporulação em *Bacillus subtilis*. **Boletim de Biotecnologia**, v. 70, p. 22-32, 2001.

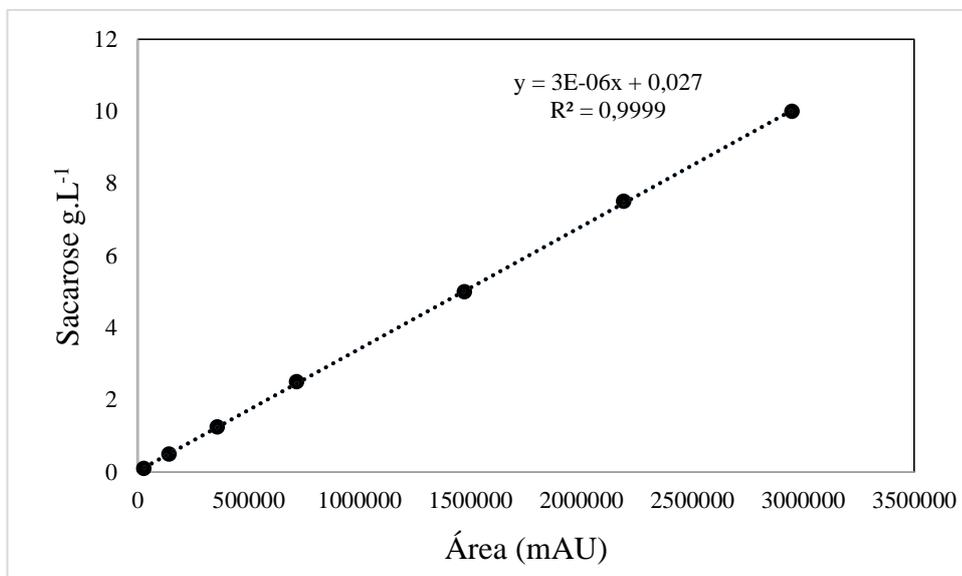
SHARMA, N.; VAMIL, R.; AHMAD, S.; AGARWAL, R. Effect of diferente carbono and nitrogen sources on α -amylase production from *Bacillus amyloliquefasciens*. **International jornal of phamaceutical sciences and research**, 2012; vol. 3(4): 1161-1163

SHUKLA, S.; CHOI, T.B.; PARK, H.K.; KIM, M.; LEE, I.K.; KIM, J.K. Determination of non-volatile organic acids in Korean traditional fermented soybean paste (Doenjang). **Food and Chemical Toxology**. 2010; 48, 2005-2010

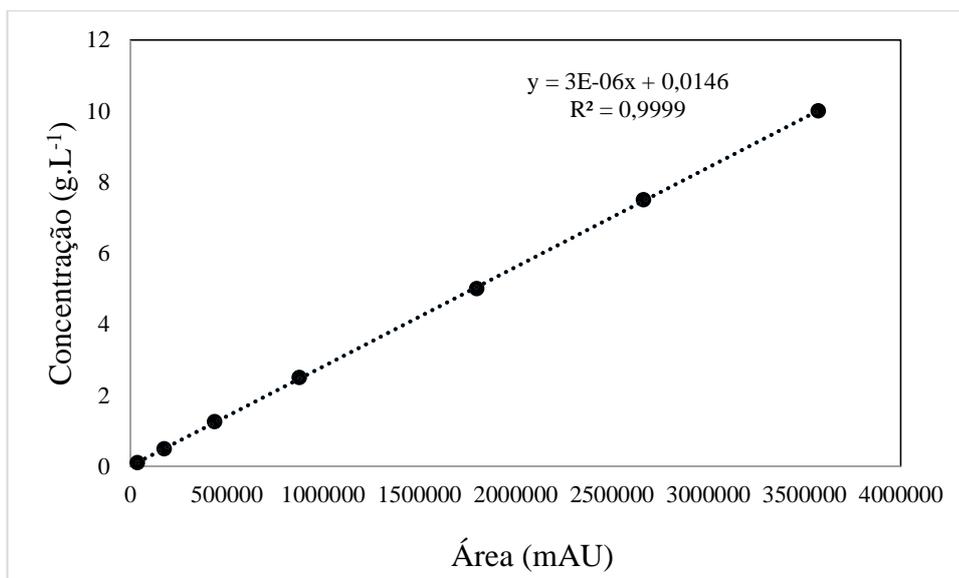
- SIEGRIST, J. Update to chromogenic media. In: **Microbiology Focus**. vol. 8.1 SigmaAldrich, 2016,
- SILVA, R.N.; MELO, L.F.A.; FINKLER, C.L.L. Optimization of the cultivation conditions of *Bacillus licheniformis* BCLLNf-01 for cellulase production. **Biotechnology Reports** 29, 2021.
- SUZUKI, A.; KNAFF, D.B. Glutamate synthase: structural, mechanistic and regulatory properties, and role in the amino acid metabolism. **Photosynthesis Research** 2005;83(2):191–217.
- TÁVORA, P. MAPA encerra 2023 com 90 produtos de baixo impacto registrados. **Ministério da Agricultura e Pecuária**, 29 de dezembro de 2023. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/mapa-encerra-2023-com-90-produtos-de-baixo-impacto-registrados>> Acesso em: 23 de abril de 2024.
- TIAN, Z.; HOU, L.; HU, M.; GAO, Y.; LI, D.; FAN, B.; WANG, F.; LI, S. Optimization of Sporulation Conditions for *Bacillus subtilis* BSNK-5. **Processes** 2022, 10, 1133. <https://doi.org/10.3390/pr10061133>
- TOMÉ, Daniel. Yeast extracts: Nutritional and flavoring food ingredients. **ACS Food Science & Technology**, v. 1, n. 4, p. 487-494, 2021.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10 Porto Alegre: ArtMed, 2012, 934 p.
- VIGNESH KUMAR. B.; MUTHUMARI, B.; KAVITHA, M.; JOHN PRAVEEN KUMAR, J.K.; THAVAMURUGAN, S.; ARUN, A.; JOTHI BASU, M. Studies on optimization of sustainable lactic acid production by *Bacillus amyloliquefasciens* from sugarcane molasses through microbia fermentation. **Sustainability** 2022, 14, 7400
- WANG, L.T.; LEE, F.L.; TAI, C.J.; KUO, H.P. *Bacillus velezensis* is a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefasciens*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** (2008), 58, 671-675
- WIRÉN, N.V.; MERRICK, M. Regulation and function of ammonium carriers in bacteria, fungi, and plants. **Topics in Current Genetics** 2004: 9, 95–120
- YAN, Z.; ZHENG, X.W.; CHEN, J.Y.; HAN, J.S.; HAN, B.Z. Effect of diferente *Bacillus* strains on the profile of organic acids in a liquid culture of *Daqu*. **Journal of Institute of Brewing**. 2013; 119: 78-83
- YAN, Z.; QUN, W.; YAN, C. Production of surfactin from waste distiller`s grains by co-culture fermentation of two *Bacillus amyloliquefasciens* staims. **Bioresource Technology**, v. 235, p. 96-103, 2017.

APÊNDICES

APÊNDICE A- Curva de calibração sacarose



APÊNDICE B- Curva de calibração glicose



APÊNDICE C- Curva de calibração da frutose