

UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA E CIÊNCIAS SOCIAIS
CAMPUS III – JUAZEIRO
ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA

**MEIO DE CULTURA ALTERNATIVO PARA MULTIPLICAÇÃO DE
BACTÉRIAS DE INTERESSE AGRÍCOLA**

SOPHIA SANTOS ELEFTHERIOS DINAS

Juazeiro – BA

Jul, 2022

SOPHIA SANTOS ELEFTHERIOS DINAS

**MEIO DE CULTURA ALTERNATIVO PARA MULTIPLICAÇÃO DE
BACTÉRIAS DE INTERESSE AGRÍCOLA**

Monografia apresentada ao Colegiado de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade do Estado da Bahia UNEB Campus III, como requisito parcial para avaliação do Trabalho de Conclusão do Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Dr. Adailson Feitoza de Jesus Santos

Juazeiro – BA

Jul, 2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Regivaldo José da Silva/CRB-5-1169

D583m Dinas, Sophia Santos Eleftherios

Meio de cultura alternativo para multiplicação de bactérias de interesse agrícola /
Sophia Santos Eleftherios Dinas. Juazeiro-BA, 2022.
37 fls.: il.

Orientador: Prof. Dr. Adailson Feitosa de Jesus Santos.

Inclui Referências

TCC (Graduação – Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) –
Universidade do Estado da Bahia. Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais.
Campus III. 2022.

1. Pragas agrícolas – Controle biológico. 2. Bactérias benéficas. 3. Bactéria para
combater pragas. 4. Bactérias agrícolas. 5. Crescimento de microrganismos. I. Santos,
Adailson Feitosa de Jesus. II. Universidade do Estado da Bahia. Departamento de
Tecnologia e Ciências Sociais. III. Título.

CDD: 632.96

SOPHIA SANTOS ELEFTHERIOS DINAS

**MEIO DE CULTURA ALTERNATIVO PARA MULTIPLICAÇÃO DE BACTÉRIAS
DE INTERESSE AGRÍCOLA**

Trabalho de conclusão de curso aprovado como
pré-requisito parcial à obtenção ao grau de
Bacharel em Engenheiro de Bioprocessos e
Biotecnologia no curso de graduação em
Engenharia Bioprocessos e Biotecnologia do
Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais
da Universidade do Estado da Bahia.

Aprovado em 18/07/2022

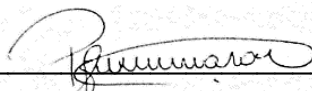
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Adailson Feitosa de Jesus Santos (Presidente/Orientador)
Universidade do Estado da Bahia – Departamento de Tecnologia e Ciências
Sociais – Campus III



Prof. Dr. Jakson Leite (Primeiro examinador)
Instituto Federal do Pará – Campus Itatiuba



Profª. Ma. Poliana Gonçalves Guimarães (Segundo examinador)
Universidade do Estado da Bahia – Departamento de Ciências Humanas –
Campus VI

Juazeiro BA

2022

Agradecimentos

A Deus, pela minha vida, e por me permitir ultrapassar todos os obstáculos encontrados ao longo dessa caminhada.

A minha Mãe pelo apoio, força e amor incondicional. A minha família, em especial Tia Laine, Tia Wana, Tia Kátia e Tia Crys por todo suporte emocional e financeiro para que eu pudesse chegar até aqui, por todo o incentivo e fé de que eu conseguiria alcançar meus objetivos. Aos meus avós, em especial vovô Grego, que sempre desejou ver seus netos formados, mas infelizmente partiu antes de ver essa minha realização.

Ao meu namorado Diego por ser meu alicerce, pela sua cumplicidade durante todos esses anos e por sempre me amparar em todos os momentos delicados da minha vida. A sua família por ter me acolhido, em especial a minha sogra Nêuda (*In memorian*) por sempre me encorajar e aconselhar na vida pessoal e acadêmica.

As minhas amigas Renata, Dafhne, Rafaela, Flavia e Erínne, pela amizade incondicional. Aos amigos que encontrei nessa jornada, Maria Clara, Gabriel, Bianca por toda alegria, parceria diária, e pelas madrugadas de estudo. A Kayo e Igor pelo companheirismo e risadas nos últimos anos, vocês foram fundamentais para a execução desse trabalho.

Ao meu orientador, Adailson, por desde o primeiro dia de aula ter servido de inspiração para mim, passando seu conhecimento sempre com entusiasmo e da melhor forma possível. Você foi peça essencial para minha formação profissional, agradeço por toda consideração e confiança, sempre será um exemplo a ser seguido.

A equipe do LBM por todo aprendizado e trabalho em conjunto. A Universidade do Estado da Bahia, através de sua estrutura e corpo docente por ter me proporcionado conhecimento de qualidade e ter contribuído para meu crescimento profissional e pessoal. E a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a conclusão de mais uma etapa da minha vida.

RESUMO

O aumento da demanda por alimentos, aliado a necessidade de uma produção agrícola que utiliza menos fertilizantes químicos e pesticidas sintéticos tem impulsionado o desenvolvimento de novas ferramentas para a agricultura. Neste cenário, os microrganismos têm sido vistos com uma possível ferramenta que alia redução de custos e produtividade. Devido ao crescimento na produção e uso de bioinsumos, e as projeções para um crescimento contínuo, as técnicas de produção estão sendo atualizadas constantemente, e o meio de cultura é um fator importante e precisa ser considerado para obtenção de melhores resultados na multiplicação, seja industrial ou *on farm*. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a eficiência de um meio de cultura alternativo para o crescimento e multiplicação de microrganismos, de interesse agrícola, em condições laboratoriais. *Bacillus amyloliquefaciens* e *Chromobacterium subtsugae* foram cultivadas em meio de cultura TSB e meio de cultura alternativo em diferentes concentrações (0,2%, 0,5%, 1% e 2%) para estabelecimento da sua curva de crescimento a partir da determinação da densidade óptica (DO) a 600 nm a cada 12 horas, durante 72 horas. Na fermentação de *B. amyloliquefaciens* todas as concentrações do meio alternativo permitiram atingir o crescimento semelhante à do meio TSB, sendo que a melhor concentração foi de 1%. Para *C. subtsugae* sua taxa de crescimento foi melhor nas concentrações 1% e 2% quando comparado aos demais tratamentos, porém, a concentração de 1% se mostra mais viável economicamente. Este estudo mostrou que o meio de cultura alternativo é uma opção para a multiplicação das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, de interesse agrícolas testadas.

Palavras-Chave: *Bacillus amyloliquefaciens*; *Chromobacterium subtsugae*; crescimento de microrganismos

ABSTRACT

The increased demand for food, plus the need for agricultural production that uses less chemical fertilizers and synthetic pesticides has driven the development of new tools for agriculture. In this scenario, microorganisms have been seen as a possible tool that combines cost reduction and productivity. Due to the growth in production and use of bio-supplies, besides the projections for continued growth, production techniques are being constantly updated, and the culture medium is an important factor and needs to be considered to obtain better results in multiplication, whether industrial or *on farm*. Thus, the present study aimed to evaluate the efficiency of an alternative culture medium for the growth and multiplication of microorganisms of agricultural interest under laboratory conditions. *Bacillus amyloliquefaciens* and *Chromobacterium subtsugae* were grown in TSB and alternative culture medium at different concentrations (0.2%, 0.5%, 1% and 2%) to establish their growth curve by determining the optical density (OD) at 600 nm every 12 hours for 72 hours. In the fermentation of *B. amyloliquefaciens*, all concentrations of the alternative medium achieved similar growth to that of TSB medium, and the best concentration was 1%. For *C. subtsugae* its growth rate was better in the 1% and 2% concentrations when compared to the other treatments, but the 1% concentration is more economically feasible. This study showed that the alternative culture medium is an option for the multiplication of Gram-positive and Gram-negative bacteria of agricultural interest tested.

Keywords: *Bacillus amyloliquefaciens*; *Chromobacterium subtsugae*; growth of microorganisms

Sumário

1	INTRODUÇÃO	8
2	OBJETIVOS.....	9
2.1	Geral.....	9
2.2	Específicos	9
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	9
3.1	Cinética de crescimento	9
3.2	Meios de cultura para crescimento microbiano.....	12
3.3	Produção de produtos biológicos.....	14
3.3.1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	15
3.3.2	<i>Chromobacterium subtsugae</i>	16
4	METODOLOGIA	17
4.1	Local.....	17
4.2	Inóculo	17
4.3	Teste de população microbiológica.....	17
4.4	Condições de crescimento	17
4.5	Parâmetros avaliados	18
4.5.1	<i>pH</i>	18
4.5.2	<i>Densidade ótica</i>	18
4.6	Estatística	18
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5.1	Teste de população microbiológica.....	18
5.2	Efeito do tempo no crescimento dos microrganismos e pH.....	19
6	CONCLUSÃO	25
	REFERÊNCIAS	26

1 INTRODUÇÃO

Com o potencial dos microrganismos em aumentar a produtividade agrícola, atuando na promoção de crescimento das plantas, no biocontrole de doenças e pragas, na tolerância a estresse abióticos, essa tecnologia vem se fixando como uma ferramenta sustentável e promissora para melhorar a produção agrícola (GABARDO *et al.*, 2020ab). Vários gêneros de bactérias, incluindo *Bacillus*, *Saccharopolyspora* e *Chromobacterium* têm sido utilizados na agricultura como promotores de crescimento, fixadores biológicos de nitrogênio e agentes de controle biológico (KANG *et al.*, 2019; FARIAS *et al.*, 2021).

Recentemente foi estimado que o mercado de produtos biológicos alcançará a faixa 10,2 bilhões de dólares até 2025 para a categoria de biopesticidas, com taxa de crescimento anual de aproximadamente 15% (FORTUNE BUSINESS INSIGHTS, 2020). Para a categoria de biofertilizantes foi estimado 3,15 bilhões de dólares até o final de 2026, com uma taxa de crescimento anual de cerca de 11% (FORTUNE BUSINESS INSIGHTS, 2019), enquanto que a categoria de bioestimulantes é estimado em torno de US\$ 2 bilhões, com crescimento de cerca de 12 a 15% (DUNHAM e TRIMMER, 2018).

Nos últimos anos tem-se observado a crescente demanda por insumos biológicos no Brasil (EMBRAPA, 2021). Em parte, devido ao crescimento exponencial da produção “*on farm*” que consiste na multiplicação de microrganismos em propriedades rurais a partir de inóculos de produtos comerciais (ABRUNHOSA, 2019). De acordo com o Decreto 6.913, de 23 de julho de 2009, artigo 1º, §8º determina que “ficam isentos de registro os produtos fitossanitários com uso aprovado para a agricultura orgânica produzidos exclusivamente para uso próprio” (BRASIL, 2002), embora haja uma séria discussão sobre esse tema, atualmente.

Durante a multiplicação dos microrganismos, fatores físicos e químicos podem influenciar na sua taxa de crescimento, um deles é o meio de cultura (TOROTRA *et al.*, 2017), que deve atender requisitos básicos de fontes de energia, carbono, nitrogênio, elementos minerais (STANBURY; WHITAKER; HALL, 2016). A escolha do meio de cultura adequado se faz necessário para alcançar melhores

resultados, uma vez que interfere na atividade de crescimento, síntese de metabólitos, entre outros (VASSILEVA *et al.*, 2021).

Assim, o meio de cultura precisa conter os nutrientes necessários para dar aporte ao crescimento e multiplicação microbiano, além de apresentar baixo custo e fácil disponibilidade (STANBURY; WHITAKER; HALL, 2016). Diversos estudos vêm sendo realizados para formulações de meios de cultura alternativos, utilizando por exemplo resíduos agroindustriais na produção de bioprodutos agrícolas (BUENO *et al.*, 2019; CAJAMARCA, 2019)

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a eficiência de um meio de cultura alternativo no crescimento e multiplicação de microrganismos em condições laboratoriais.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o efeito de um meio de cultura alternativo para a multiplicação de bactérias de importância agrônômica.

2.2 Específicos

- Avaliar a população microbiológica dos inóculos de *Bacillus amyloliquefaiens* e *Chromobacterium subtsugae*;
- Avaliar diferentes concentrações do meio de cultura alternativo para o crescimento de microrganismos de interesse agrícola;
- Avaliar parâmetros como densidade ótica e pH.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Cinética de crescimento

A cinética de crescimento microbiano é uma reação autocatalítica onde a taxa de crescimento é diretamente proporcional a concentração da célula e pode ser determinada pela razão entre a taxa de crescimento de uma população microbiana específica e a concentração de substrato (NIKITINA e CHERNUKAHA, 2020; SAKTHISELVA; MEENAMBIGA; MADHUMATHI, 2019).

Para as bactérias, o tempo necessário para completar um ciclo de fissão é conhecido como tempo de duplicação/geração (BJÖRKLUND, 2019), este crescimento exponencial pode ser expresso por:

$$N = N_0 2^n$$

Onde N é o número final da célula; N_0 é o número inicial de células e n é o número de gerações durante o período de crescimento exponencial (WILLEY *et al.*, 2017). O tempo de geração (g) da população em crescimento exponencial corresponde a t/n , em que t corresponde ao período de tempo decorrido e n o número de gerações no tempo t (MADIGAN *et al.*, 2016).

Sendo assim, de acordo com Madigan *et al.* (2016) é possível calcular n (Equação 3.2) a partir do conhecimento dos números inicial e final de células em uma população em crescimento exponencial ao aplicar logaritmos em ambos os lados da equação:

$$N = N_0 2^n$$

$$\log N = \log N_0 + n \log 2$$

$$\log N - \log N_0 = n \log 2$$

$$n = (\log N - \log N_0) / \log 2$$

$$n = (\log N - \log N_0) / 0,301$$

$$n = 3,3(\log N - \log N_0)$$

E, a partir de n e do conhecimento de t , o tempo de geração, g :

$$g = t/n$$

$$g = t/[3,3(\log N - \log N_0)]$$

Com a variação da taxa de crescimento microbiano ao longo do tempo pode-se traçar a curva de crescimento, que se divide em fase lag, exponencial, estacionária e de morte. A fase lag é o estágio inicial em que o metabolismo da população microbiana inoculada está se adaptando ao meio com a síntese de macromoléculas e enzimas necessárias para seu crescimento, a duração desta

fase varia de acordo com a condição do inóculo e natureza do meio (SAKTHISELVAN *et al.*, 2019).

Na fase log ou exponencial a população se replica rapidamente em intervalos regulares por um período curto ou longo a depender dos recursos disponíveis, condições ambientais e pela própria genética do microrganismo (POMMERVILLE, 2014). Devido a taxa metabólica de células individuais está no máximo, são preferencialmente utilizadas para estudos enzimáticos ou de outros componentes celulares, e também para fins industriais e laboratoriais (MADIGAN *et al.*, 2016; TORTORA *et al.*, 2017).

Após um período, o crescimento torna-se limitado em razão do esgotamento de nutrientes, acumulação de resíduos e mudanças no pH, de forma que a taxa de mortalidade se equipara a taxa de crescimento das células, atingindo-se, assim, a fase estacionária (ELIZABETH *et al.*, 2021; TORTORA *et al.*, 2017).

Naturalmente o número total de células viáveis decresce ao tempo em que aumenta o número de células que morrem, entrando assim, na fase de morte (ELIZABETH *et al.*, 2021). No entanto, uma pequena fração de células sobrevive por tempo indeterminado quando se há produção de esporos, enquanto outra fração sobrevive entrando em um estado com taxa metabólica extremamente baixa podendo novamente entrar em fase exponencial se for fornecido substrato (GRAY *et al.*, 2019).

O crescimento é medido pelo monitoramento de alterações no número de células ou de algum outro componente celular (proteínas, ATP, ácidos nucleicos), pode ser realizado por métodos diretos como contagem em placas, filtração por membrana, contagem microscópica direta, número mais provável, e por métodos indiretos como peso seco, atividade metabólica e turbidez (densidade ótica) (MADIGAN *et al.*, 2016; TORTORA *et al.*, 2017).

O crescimento de uma população microbiana e a taxa de crescimento que esta apresenta são influenciados por fatores físicos (temperatura, pH e pressão osmótica) e químicos que incluem nutrientes em maiores quantidades como carbono, nitrogênio, enxofre, fósforo e oxigênio, e pequenas quantidades de

elementos-traço (ferro, cobre, molibdênio e zinco) que atuam como cofatores no metabolismo celular (TOROTRA *et al.*, 2017).

Cada um dos componentes do meio de cultura afeta a atividade de crescimento, esporulação e produção de metabólitos, desta forma, a otimização da composição do meio é desejável (VASSILEVA *et al.*, 2021) para alcançar resultados pretendidos.

3.2 Meios de cultura para crescimento microbiano

Os componentes de um meio de cultura devem suprir as exigências necessárias para a biomassa celular, síntese de metabólitos e energia para a biossíntese e manutenção das células (STANBURY; WHITAKER; HALL, 2016). Para tal, é fundamental uma fonte carbono que será utilizada como matéria prima para o metabolismo energético, síntese de compostos celulares e metabólitos primários ou secundários; uma fonte de nitrogênio inorgânica ou orgânica cuja atuação se dá principalmente na síntese de proteínas e ácidos nucleicos; e sais minerais que atuam como cofatores e reguladores osmóticos (MONNERAT *et al.*, 2020). O fosfato, em especial, é elemento importante por sua relação com síntese de fosfolipídios e ácidos nucleicos, sendo sua adição dependente da composição específica do meio, necessidade do organismo e natureza do produto desejado (SINGH *et al.*, 2017a).

O crescimento e síntese de metabólitos dependem da composição do meio de cultura e condições de cultivo, de forma que alterações na natureza das fontes de carbono e nitrogênio ou em sua concentração interferem no produto final, assim, para se obter produção em grande escala de metabólitos, é necessário um meio de cultura com composição e concentração adequada (MY; LOAN; THUOC, 2022; SINGH *et al.*, 2017a), considerando que a sua otimização pode reduzir custos (MSARAH *et al.*, 2020; UYGUT e TANYULDIZI, 2018).

Assim, diferentes meios de cultura são utilizados rotineiramente em laboratório para crescimento de microrganismos. A nível laboratorial, geralmente são utilizados carboidratos simples (glicose e frutose), como fonte de carbono, e peptona, triptona, extrato de carne bovina ou extrato de levedura como fonte de

nitrogênio (ERKMEN, 2021; WEN *et al.*, 2021). Exemplos comumente empregados são o caldo nutriente (NB), caldo de infusão de cérebro e coração (BHI), caldo de dextrose de batata (PDB), caldo triptona de soja (TSB) e Luria Bertani (LB) (AL-SALLOUM *et al.*, 2017; ALKHFAJI, 2018; ERKMEN, 2021; HASANAIN *et al.*, 2017; MAGARELLI *et al.*, 2022; PUMIRAT *et al.*, 2017; SATYANTINI *et al.*, 2019; SON e KIM, 2022; SUN *et al.*, 2019).

Stanbury, Whitaker e Hall (2016) afirmam que para o cultivo em grande escala, os nutrientes escolhidos para o meio de cultura devem preencher os seguintes requisitos: baixo custo; maior concentração ou rendimento de biomassa ou produto; permitir a taxa máxima de formação de produto; mínimo rendimento de produto indesejado; acessível durante todo o ano; e, apresentar menor dificuldade durante todo o processo de cultivo.

Desta forma, como o custo de meios de cultura laboratoriais para a produção em larga escala é alto, a nível industrial é utilizadas fontes de carbono como melaço, licor de maceração de milho, suco de beterraba ou glicose, sacarose em sua forma pura para microrganismos sensíveis, e farelo de soja, amônia ou sais de nitrato como fonte de nitrogênio (BEHERA e VARMA, 2017; CHO e KASEM, 2018). Além de resíduos agroindustriais que são ricos em compostos bioativos na produção de bioprodutos agrícolas (CAJAMARCA, 2019; XU e GEELLEN, 2018).

Na busca pela otimização da produção microbiana e diminuição dos custos envolvidos, matérias-primas alternativas tem sido alvo de estudos. Lo, Lee e Liu (2020) aperfeiçoaram o cultivo de *Rhodopseudomonas palustres* PS3 para produção de biofertilizante com meio alternativo de baixo custo, identificando o melaço e licor de maceração de milho como fonte de carbono e nitrogênio eficiente. Cantabella *et al.* (2021) relataram que *Pseudomonas oryzae* PGP01 cultivada em meio de cascas e polpas de batata congeladas suplementado com triptona, melaço de cana, NaCl e K₂HPO₄ alcançou crescimento similar ao meio comercial, além de preservar sua atividade biológica na promoção de crescimento vegetal.

Em vista da importância dos nutrientes para o crescimento microbiano, o conhecimento das necessidades nutricionais dos microrganismos se faz necessário

para que o meio de cultura escolhido forneça de forma e quantidade adequada os aparatos para o crescimento celular e síntese de metabólitos, uma vez que a composição do meio pode influenciar significativamente esses parâmetros assim como a concentração e rendimento do produto final, afetando diretamente a economia do processo de multiplicação (GONÇALVES, 2013; SANTOS JUNIOR *et al.*, 2022).

Uma vez que o meio influencia significativamente o metabolismo microbiano, o alvo do ajuste de sua composição vai além da taxa de crescimento, mas também a produção de metabólitos de interesse. Moreno-Velandia *et al.* (2021) estudaram a influência do meio de cultura na síntese de lipopeptídeos cíclicos (CLP) por *B. velezensis* Bs006, e constataram que no cultivo em meio LB teve uma alta população de células, porém, os meios PZN e Landy proporcionaram uma alta concentração do CLP. Já Betlej *et al.* (2020) utilizaram diferentes concentrações de sacarose com duas variantes de enriquecimento (peptona e extrato de chá) para produção de celulose, observando que tanto a quantidade do produto final quanto parâmetros físicos e mecânicos foram dependentes da composição meio de cultura. Mazmira *et al.* (2012) demonstraram o efeito de monossacarídeos e dissacarídeos no crescimento, esporulação e síntese de endotoxinas por *B. thuringiensis* MPK13, observando que as porcentagens dos parâmetros analisados variaram conforme os diferentes sacarídeos utilizados na formulação do meio e indicaram a glicose como a melhor opção.

3.3 Produção de produtos biológicos

Os produtos biológicos compreendem três categorias gerais: (i) biopesticidas, (ii) bioestimulantes e (iii) biofertilizantes (MARRONE, 2019). Os biopesticidas são derivados de organismos ou compostos naturais utilizados para proteção de cultivos inibindo o crescimento e o desenvolvimento de patógenos e insetos-praga por diferentes mecanismos de ação, podem ser categorizados como biopesticidas microbianos, biopesticidas bioquímicos e protetores incorporados em plantas (PIPs) (PARWEEN e JAN, 2019). Enquanto os bioestimulantes são usados para promover o crescimento e aumento de produtividade das plantas, além de induzir tolerância a estresses abióticos (YAKHIN *et al.*, 2017).

Com o declínio do uso de pesticidas sintéticos em razão dos seus efeitos nocivos e colaterais, quando utilizados de forma indevida, os biopesticidas tem ganhado espaço no mercado como uma ferramenta promissora devido a sua especificidade, biodegradabilidade e economia (PATHMA *et al.*, 2020). Estima-se que o mercado global de biopesticidas crescerá de US\$ 3,3 bilhões em 2020 para US\$ 7,4 bilhões em 2027, com um aumento anual de 12,4% (RESEARCH AND MARKETS *et al.*, 2020).

Já o mercado de bioestimulantes é estimado em torno de US\$ 2 bilhões, com crescimento de cerca de 12 a 15% (DUNHAM e TRIMMER, 2018). A perspectiva é que o cenário dos bioestimulantes seja maior que o dos biopesticidas em razão do interesse de investimento de empresas agroquímicas e *startups* devido a maior facilidade regulatórias para inserção de novos produtos ao mercado (MARRONE, 2019).

No processo de formulação de produtos biológicos a biotecnologia está inserida desde a seleção de microrganismos até a chegada do produto as prateleiras. Assim, de acordo com Bashan *et al.* (2014) o termo inoculante refere-se ao produto da formulação contendo um transportador e agente bacteriano ou consórcio de microrganismos. Sua aplicação na agricultura não é novidade, entretanto, tem ganhado mais espaço com o investimento das indústrias visando formular inoculantes mais eficientes, de baixo custo, que atenda às necessidades e à qualidade exigida pelos agricultores (SANTOS; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2019).

Esses microrganismos estão envolvidos na promoção de crescimento de plantas e controle contra pragas e patógenos, representando um bom suporte para a produção de culturas (LOPES *et al.*, 2018; SANTOS; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2019; SINGH *et al.*, 2017b).

3.3.1 *Bacillus amyloliquefaciens*

O Grupo Operacional *Bacillus amyloliquefaciens* (OGBa) é composto por quatro espécies, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus siamensis*, *Bacillus velezensis* e *Bacillus nakamurai*, são Gram-positivas, em forma de bastonete e formadoras de endósporos (SALEM; GIRBAL-NEUHAUSER; CHABANE, 2021).

B. amyloliquefaciens possui uma versatilidade na redução da incidência ou gravidade de várias doenças em diversos hospedeiros devido a competição com patógenos pelos nutrientes, secreção de substâncias antimicrobianas, antibióticos, hidrolases, lipopeptídeos, regulação do microbioma da rizosfera, entre outros mecanismos (LIU *et al.*, 2017; HAN *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2017; JIAO *et al.*, 2020). Além disso, também pode promover o crescimento de plantas através da produção de auxinas, como o ácido indolacético (AIA), fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato, entre outros (LI *et al.*, 2019; QIN *et al.*, 2017). Em razão da sua eficácia, atualmente, a quantidade de produtos à base de *B. amyloliquefaciens* alcança os 35 produtos com registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (AGROFIT, 2022).

3.3.2 *Chromobacterium subtsugae*

Chromobacterium subtsugae é uma beta-proteobactéria Gram-negativa encontrada em solos e águas de regiões tropicais e subtropicais, possui formato de cocobacilo, é anaeróbia facultativa, não esporulada e móvel. Sua temperatura ótima de crescimento é entre 30 °C – 35 °C, suas colônias são de cor violeta devido a síntese de violaceína (MARTIN *et al.*, 2007; SHANNAG e CAPINERA, 2018).

Esse pigmento possui uma ampla gama de atividades biológicas como propriedades bacteriostáticas e antibióticas, antifúngica, anticâncer, propriedades antivirais, entre outras (ARULDASS *et al.*, 2018; CHOI *et al.*, 2021; DURÁN *et al.*, 2016; MASUELLI *et al.*, 2016; SUBRAMANIAM e SIVASUBRAMANIAN, 2014).

C. subtsugae possui atividade inseticida por diferentes modos de ação contra uma variedade de insetos-praga como tripes, ácaros fitófagos, moscas brancas, lagartas, psilídeos, cochonilhas e besouros (SHANNANG e CAPINERA, 2018). Asolkar *et al.* (2014) relataram três metabólitos com fatores inseticidas, incluindo “cromamida A”, violaceína e um composto não identificado. Devido a sua ação inseticida, um extrato a base de seus metabólitos foi aprovado pela Environmental Protection Agency (EPA) e está comercialmente disponível (OLIVEIRA-HOFMAN *et al.*, 2021), no entanto, no Brasil não existe nenhum produto registrado com essa espécie, porém, há a comercialização de produtos não registrados que informam essa espécie como seu ingrediente ativo, o que pode gerar insegurança jurídica.

Além disso, algumas cepas desse gênero têm exibido atividade de biocontrole contra diferentes fitopatógenos, essa supressão tem sido atribuída a metabólitos como lipopeptídeos cíclicos, proteases e quitinases (HAN; PARK; KIM, 2017; KIM *et al.*, 2014; SOUSA *et al.*, 2019).

4 METODOLOGIA

4.1 Local

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LBM) localizado no Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais – Campus III da Universidade Estadual da Bahia.

4.2 Inóculo

Para a produção do inóculo de *Chromobacterium subtsugae*, a cepa preservada proveniente do acervo do LBM foi ativada em meio Ágar Nutriente (AN) e incubada por 72 horas, posteriormente, 5 colônias foram inoculadas em 100 ml de meio de cultura Caldo Triptona de Soja (TSB) e incubado em shaker orbital (SL – 222, Solab) a 130 rpm com temperatura a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ por um período de 36 horas.

Para o inóculo do *Bacillus amyloliquefaciens*, foi utilizado um produto registrado comercial.

4.3 Teste de população microbiológica

Foi realizada a diluição seriada do inóculo de *Bacillus amyloliquefaciens* e de *C. subtsugae* em solução salina 0,85% e avaliada a quantificação de UFC/ml pelo método de microgota, onde 5 μL de cada diluição foi disposto em triplicata no meio Ágar nutriente.

4.4 Condições de crescimento

Para a fermentação bacteriana, 2 ml de cada inóculo foi transferido para Erlenmeyers de 250 ml contendo 200 ml do meio de cultura Caldo Triptona de Soja (TSB), utilizado como controle e do meio de cultura alternativo em diferentes concentrações (0,2%; 0,5%; 1% e 2%) com pH ajustado para 7,0, previamente

autoclavados. Posteriormente, foram incubados em shaker orbital (SL – 222, Solab) a 130 rpm com temperatura controlada a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ por um período de 72 horas.

O Caldo Triptona de Soja utilizado durante o experimento apresenta a seguinte composição [g/L]: Digestivo pancreático de caseína ,17,0; Digestivo papaico de soja 3,0; Dextrose, 2,5; NaCl, 5,0; K_2HPO_4 , 2,0.

O meio de cultura alternativo é um condicionante de solo produzido a partir da fermentação de leveduras, sendo composto por ácido fosfórico, uréia, extrato de levedura e agente complexante de L-aminoácidos.

4.5 Parâmetros avaliados

Durante o período de fermentação, a cada 12 horas foi retirado alíquotas em triplicatas para avaliação dos seguintes parâmetros

4.5.1 pH

Em todas as amostras coletadas foram realizadas leituras de pH em pHmetro de bancada modelo PHS-3E devidamente calibrado.

4.5.2 Densidade ótica

Em todas as amostras coletadas foram realizadas leitura da densidade ótica a 600 nm, em espectrofotômetro Kasuaki modelo IL-226.

4.6 Estatística

Os dados foram analisados em R, sendo realizada análise da variância simples (One Way ANOVA), seguida do teste de Tukey para comparações entre as médias ($p<0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Teste de população microbiológica

De acordo com a Tabela 1, tanto o inóculo de *B. amyloliquefaciens* quanto o inóculo de *C. subtsugae* estavam puros. A quantificação bacteriana do inóculo de

B. amyloliquefaciens é compatível com a exibida na bula do produto, sendo esta 3×10^9 UFC mL⁻¹.

Tabela 5.1. Teste de população dos inóculos

Inóculo	Quantificação bacteriana mesofílica total (UFC mL ⁻¹)	Contaminação
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	$1,3 \times 10^9$	Ausente
<i>Chromobacterium subtsugae</i>	$5,0 \times 10^9$	Ausente

5.2 Efeito do tempo no crescimento dos microrganismos e pH

Durante o experimento a temperatura do shaker variou de 28,6-32,9°C. Pode ser visto na Figura 1 que no tratamento controle (TSB) *B. amyloliquefaciens* teve um rápido crescimento entre 0-12 horas, atingindo seu máximo em 12 horas com diferença significativa em relação aos demais tratamentos. De acordo com Singh, Ratuela e Cameotra (2014) a dextrose utilizada na composição do meio TSB é um açúcar simples, prontamente utilizado pelo gênero *Bacillus* para sua multiplicação, levando a um rápido aumento na biomassa, assim, podendo explicar o rápido consumo desta fonte de carbono por *B. amyloliquefaciens* entre 0-12 h. Após o período de 12 h o número de células decresceu consideravelmente e se manteve constante até 72 horas.

Para o tratamento S-0,2% o crescimento máximo ocorreu no período de 24 h. Em 12 h os tratamentos S-1% e S-2% entram em fase logarítmica, atingindo seu máximo em 60 e 48 h, respectivamente. S-0,5% foi estatisticamente semelhante às outras concentrações em 24 h, sofrendo uma queda até 48 h e retornando ao mesmo valor final de S-0,2%.

Yang *et al.* (2019) relataram que a densidade populacional de *B. amyloliquefaciens* T-5 obteve maiores valores quando cultivado em açúcares, porém, a síntese de antibióticos (bacilaeno e macrolactina) foi maior no cultivo com aminoácidos (L-Arginina, L-Prolina, L-Alanina, L-Histidina) ou ácidos orgânicos (ácido lático e ácido cítrico). Visto que o meio de cultura alternativo possui em sua composição L-

aminoácidos e extrato de levedura, também rica em aminoácidos (PODPORA *et al.*, 2016), a síntese de metabólitos secundários pode ter sido mais acentuada, quando comparada ao tradicional TSB.

Em um estudo de Ali *et al.* (2018) de desenvolvimento de meio para cultivo

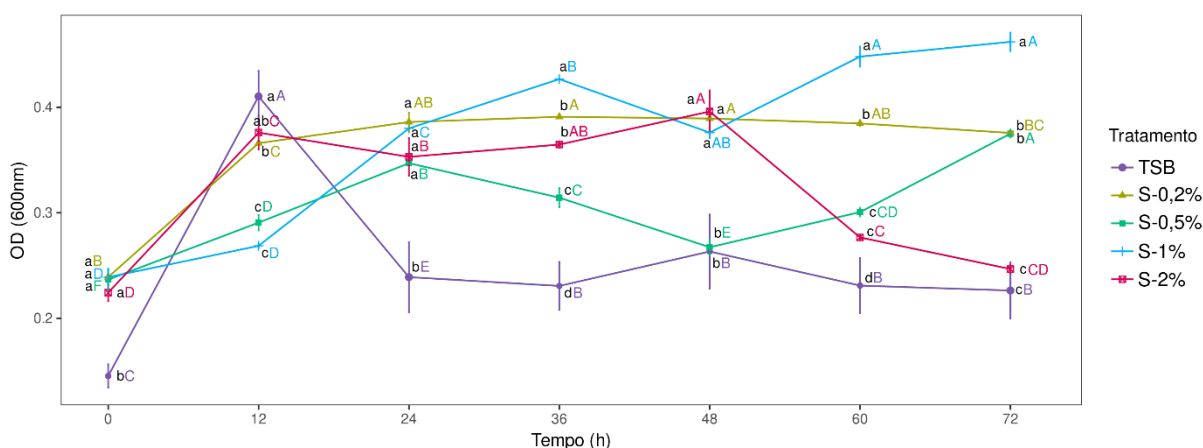


Figura 1. Curva de crescimento de *Bacillus amyloliquefaciens*. Os valores foram calculados a partir das triplicatas. Letras diferentes são significativamente diferentes entre si em $p \leq 0,05$. Letras pretas e minúsculas referem à diferença entre os tratamentos e coloridas e maiúsculas entre os tempos dentro do mesmo tratamento. As siglas TSB refere-se ao meio de cultura Caldo Triptona de Soja e S-(0,2, 0,5, 1 e 2%) ao meio de cultura alternativo.

de *B. amyloliquefaciens subsp. plantarum*. foi utilizado o açúcar de palma e águas residuais da produção de tofu em comparação com meio comercial o Luria Bertani (LB), os autores não encontraram diferença significativa na densidade ótica dos três meios indicando que os meios testados podem ser utilizados para o crescimento deste microrganismo.

Assim, observa-se que as demais concentrações do meio de cultura alternativo podem suportar o crescimento em taxas similares ao meio laboratorial TSB, destacando S-1% que com 36 h tem um aumento considerável na densidade ótica, se tornando o melhor tratamento entre as concentrações do meio de cultura alternativo. Assim, a escolha do meio para multiplicação de *B. amyloliquefaciens* pode ser justificada pelo menor custo do produto comercial.

Na Figura 2 o tempo 0 do pH dos tratamentos se mostrou levemente ácido, variando de 6,17-6,45. Em 12, horas o pH do tratamento TSB caiu para 5,58, se estabilizando até 36 horas, a partir de onde seguiu aumentando até 72h. Resultado semelhante ao encontrado por Lee *et al.* (2019), no qual a cepa *B. amyloliquefaciens* Y1 foi cultivada em TSB e o pH do meio diminuiu acentuadamente no início da inoculação e, posteriormente, aumentou alcançando valor próximo ao do primeiro dia de fermentação.

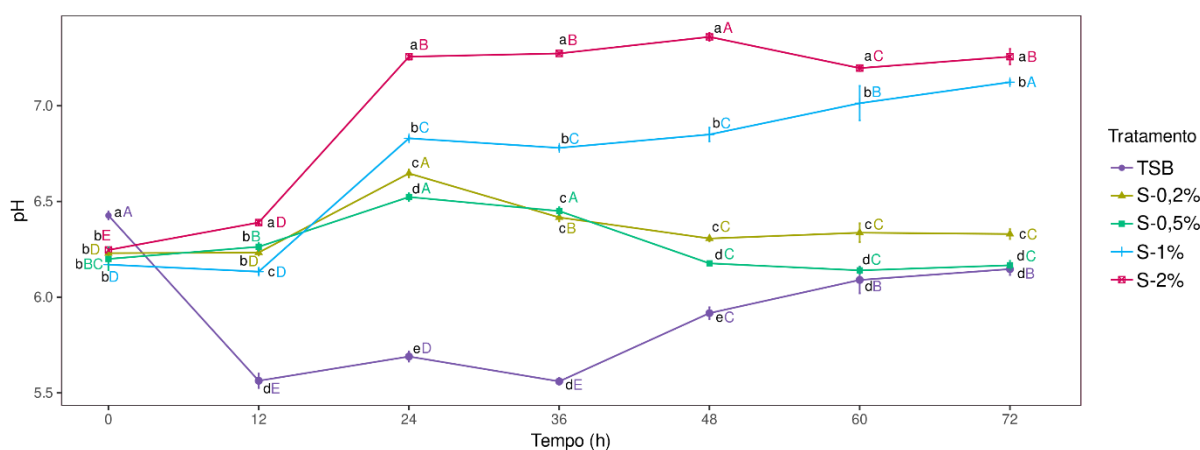


Figura 2. Variação do pH durante a curva de crescimento de *Bacillus amyloliquefaciens*. Os valores foram calculados a partir das triplicatas. Letras diferentes são significativamente diferentes entre si em $p \leq 0,05$. Letras pretas e minúsculas referem à diferença entre os tratamentos e coloridas e maiúsculas entre os tempos dentro do mesmo tratamento. As siglas TSB refere-se ao meio de cultura Caldo Triptona de Soja e S-(0,2, 0,5, 1 e 2%) ao meio de cultura alternativo.

Os demais tratamentos tenderam a aumentar nas primeiras 24h da fermentação, no entanto, os S-0,2% e S-0,5% caíram para valores próximos aos iniciais e se mantiveram constantes a partir de 48h, enquanto S-1% e S-2% mantiveram sua tendência à neutralidade. Todos os tratamentos estão dentro da faixa de pH ideal (5-7) para um ótimo crescimento (GOTOR-VILA *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2020).

Durante o processo de crescimento microbiano, os microrganismos podem alterar o pH do meio, promovendo ou inibindo seu próprio crescimento (RATZKE e GORE, 2018). Neste caso, a acidificação repentina do TSB em 12h condiz com o rápido crescimento visto na Figura 1. Considerando os tratamentos S-0,2% e S-0,5%, os microrganismos podem ter produzido metabólitos que reagiram com os componentes do meio, os quais por estarem mais diluídos foram consumidos após 24h, revertendo ao pH inicial, fato que não ocorreu nas maiores concentrações.

Na Figura 3 a densidade ótica máxima de *C. subtsugae* em TSB foi no período de 24 horas se mantendo constante até às 72h. S-0,2% e S-0,5% tiveram seu crescimento máximo em 12 horas, decrescendo em seguida. S-0,2%, porém, apresentou a menor taxa populacional que os outros tratamentos, o que indica que essa concentração do meio de cultura alternativo não é capaz de sustentar o crescimento de *C. subtsugae*. Os tratamentos S-1% e S-2% foram semelhantes até o tempo 36h, a partir de onde S-1% entrou em fase de declínio, enquanto S-2% manteve a taxa de crescimento até as 60 horas da fermentação.

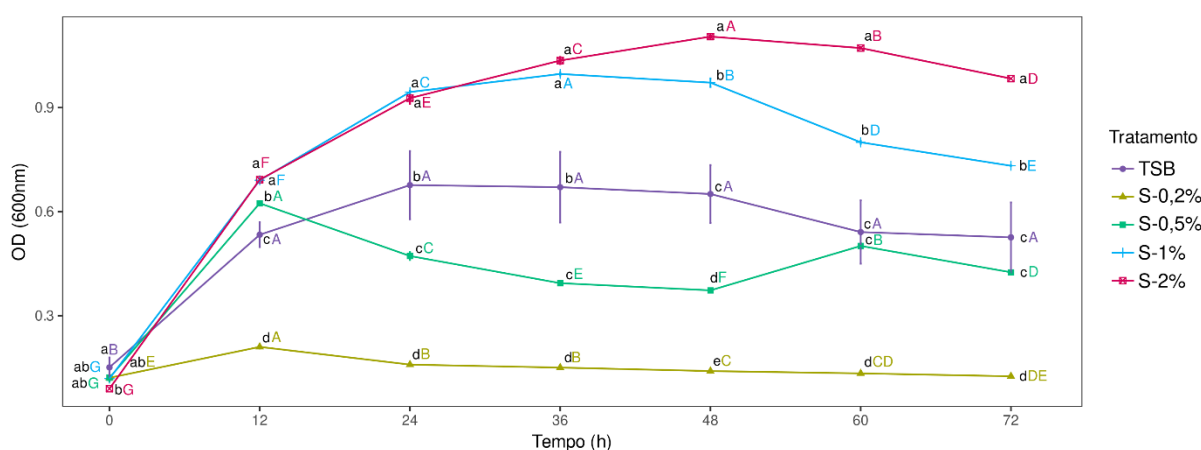


Figura 3. Curva de crescimento de *Chromobacterium subtsugae*. Os valores foram calculados a partir das triplicatas. Letras diferentes são significativamente diferentes entre si em $p \leq 0,05$. Letras pretas e minúsculas referem à diferença entre os tratamentos e coloridas e maiúsculas entre os tempos dentro do mesmo tratamento. As siglas TSB refere-se ao meio de cultura Caldo Triptona de Soja e S-(0,2, 0,5, 1 e 2%) ao meio de cultura alternativo.

O menor crescimento de *C. subtsugae* nos tratamentos S-0,2% e S-0,5% pode estar relacionado a concentração do substrato ou nutriente ser limitante, de forma ao consumo do substrato ocorrer reduzindo a produção de novas células, sendo esta energia utilizada para atender aos requisitos de manutenção da célula em condições de não crescimento (MAIER e PEPPER, 2015).

A concentração de substrato é um fator importante, pois, permite o crescimento do microrganismo ou aumento da síntese de produtos (BELTRÁN-PRIETO e NGUYEN, 2018). Desta forma, em alguns estudos o aumento na concentração da fonte de carbono proporcionou o aumento do crescimento, síntese de metabólitos e atividade biológica dos microrganismos (ZHANG *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2020), assim como a concentração do extrato de levedura também

influenciou no crescimento de *B. thuringiensis* (CHUKA-OGWUDE; NWUCHE; OGBONNA, 2017). Resultado similar ao do presente estudo, no qual as concentrações de 1% e 2% do meio de cultura alternativo, apresentaram as melhores taxas de crescimento para *C. subtsugae*, com destaque para a maior concentração. No entanto, a concentração de 1% pode ser a mais viável economicamente, uma vez que seria utilizado menos meio e com menor tempo de fermentação, 36h, reduzindo os custos operacionais envolvidos.

Assim como em *B. amyloliquefaciens*, o pH inicial dos tratamentos de *C. subtsugae* (Figura 4) variou de levemente ácido para neutro (6,46-6,71). Da mesma forma que em 12 horas, o pH do tratamento TSB teve comportamento semelhante ao de *B. amyloliquefaciens*, apresentando um decréscimo com pequena variação até 36 horas e aumentando até 72h. Enquanto os demais tratamentos tenderam a aumentar o pH ao longo da fermentação, mas com valores dentro da faixa de crescimento ótimo do microrganismo, de 7 a 8, como indicado por Fernandes (2017), o que corrobora com a avaliação de que a diferente composição dos meios interagem de forma distinta com os microrganismos afetando diretamente o pH.

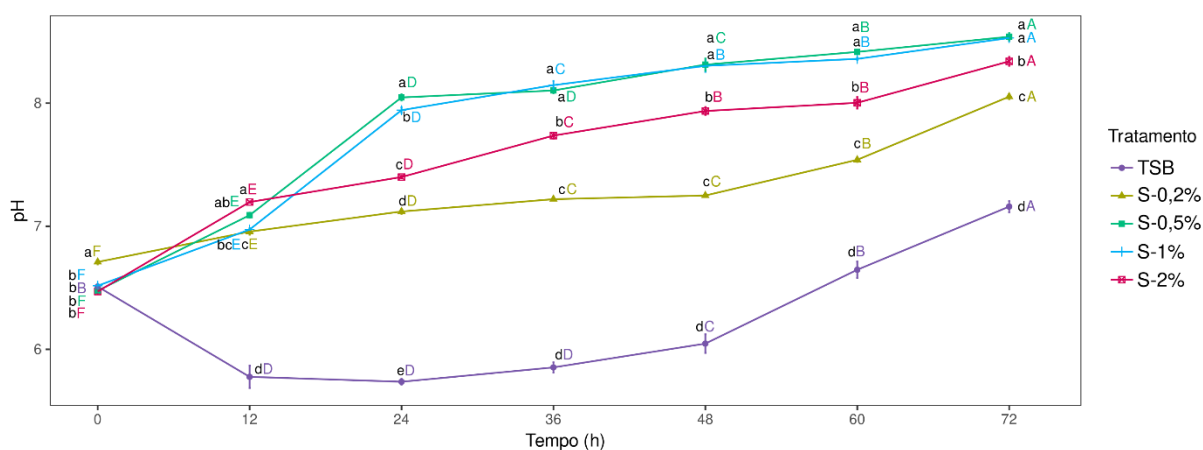


Figura 4. Variação do pH durante a curva de crescimento de *Chromobacterium subtsugae*. Os valores foram calculados a partir das triplicatas. Letras diferentes são significativamente diferentes entre si em $p \leq 0,05$. Letras pretas e minúsculas referem à diferença entre os tratamentos e coloridas e maiúsculas entre os tempos dentro do mesmo tratamento. As siglas TSB refere-se ao meio de cultura Caldo Triptona de Soja e S-(0,2, 0,5, 1 e 2%) ao meio de cultura alternativo.

Em demonstração da influência dos nutrientes e pH no crescimento do microrganismo, Castro *et al.* (2015) demonstraram que o crescimento de *C. violaceum* foi melhor em meio LB com pH neutro, comparado a outros valores de pH do

mesmo meio e meio carente em nutrientes (M9). Comportamento semelhante foi observado no experimento, de forma que o pH dos tratamentos S-0,2% e S-0,5% estavam dentro da faixa de pH ideal, porém suas concentrações influenciaram no crescimento bacteriano.

Os nutrientes, como carbono e nitrogênio, são básicos e essenciais para garantir as fontes de energia e a multiplicação celular, desta forma, a qualidade e concentração da relação C:N podem determinar o crescimento bacteriano e a produção de metabólitos secundários (CHO e KASEM, 2018). De forma geral, as bactérias Gram-positivas apresentam maiores exigências nutricionais quando comparadas com as bactérias Gram-negativas (JAY, 2000). Ndlovu *et al.* (2017) demonstraram a relação da produção de metabólitos secundários com diferentes fontes de carbono para *B. amyloliquefaciens* ST34 (Gram-positiva) e *Pseudomonas aeruginosa* ST5 (Gram-negativa), onde os maiores rendimentos de metabólitos secundários sintetizados pelas cepas ST34 e ST5 foi utilizando frutose e glicose como únicas fontes de carbono, respectivamente.

No desenvolvimento de um meio de baixo custo para o crescimento de *Bacillus amyloliquefaciens* S20A1, Cho e Kasem (2018) comprovaram que a mistura de pó de feijão preto + soja (BS) e feijão mungo + soja (MS) na proporção 1:1 componentes ricos em proteína, aminoácidos e carboidratos tiveram o melhor desempenho quando comparado ao meio LB.

Lee *et al.* (2019) relataram o desenvolvimento de meio de cultura utilizando fertilizante composto por MgSO_4 , KH_2PO_4 , CaCO_3 , NaCl , KOH , sacarose, gelatina, quitina em pó, extrato de levedura e Power Chitin para cultivo em larga escala de *B. amyloliquefaciens* Y1, obtendo sucesso na multiplicação e no custo quando comparado ao meio comercial LB. Em outro estudo, foi demonstrado que a síntese de exopolissacarídeos teve correlação com o crescimento de *B. velezensis*, e sua produção máxima foi alcançada quando utilizado melaço e extrato de levedura como meio de cultura (MOGHANNEM *et al.*, 2018).

Na otimização de produção de violaceína por *C. violaceum*, foi estudado a influência de diferentes parâmetros, entre eles, fontes de nitrogênios no qual as

fontes orgânicas obtiveram um melhor resultado na produção, sendo que o extrato de levedura foi mais eficiente do que extrato de carne bovina e peptona (DIKE-NDUDIM; NWACHUKWU; NDUBUEZE, 2022).

O meio alternativo utilizado no experimento é composto por ureia, extrato de levedura e L-aminoácidos. O extrato de levedura pode fornecer fatores de crescimento, como vitaminas e aminoácidos, que sustentam o crescimento bacteriano (WANG *et al.*, 2015), portanto, o meio de cultura avaliado apresentou eficiência no crescimento das bactérias testadas.

6 CONCLUSÃO

O meio de cultura alternativo foi eficiente para o crescimento de *B. amyloliquefaciens* e *C. subtsugae* em comparação ao cultivo em meio padrão TSB. De modo que a concentração de 1% demonstrou ser a melhor para *B. amyloliquefaciens*, enquanto as concentrações 1% e 2% proporcionaram maior crescimento de *C. subtsugae*, no entanto, a concentração de 1% é mais viável economicamente.

REFERÊNCIAS

ABRUNHOSA, Letícia Santos. **Avaliação da contaminação de meios de cultura utilizados para produção "on farm" de bioinseticida**. 2019. 48 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Farmácia), Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

Agrofit. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Coordenação Geral de Agrotóxicos e Afins/DFIA/DAS, 2022. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em 11 abr. 2022.

ALI, M.; KARNI, I.; AMIN, M.; ICHSAN, M. Development of Growth Media for *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, a Poultry Probiotic Candidate. **Journal of Applied Biological Sciences**, vol. 12, n. 1, p. 46–50, 2018. Disponível em: <https://jabsonline.org/index.php/jabs/article/view/560>. Acesso em: 21 Jun. 2022.

ALKHFAJI, A; ABD-ALRAZAQ, Z. Bee collected pollen load (BCPL) as alternative culture media for bacterial and yeast growth. **J. Pharm. Sci. & Res.**, vol. 10, n. 4, p. 830–835, 2018. Disponível em: <https://www.jpsr.pharmainfo.in/Documents/Volumes/vol10Issue04/jpsr10041829.pdf>.

AL-SALLOUM, Y.; ABBAS, H.; SHEIKH, Q. I.; HADI, S.; ALSAYED, S.; ALMUSALLAM, T. Effect of some biotic factors on microbially-induced calcite precipitation in cement mortar. **Saudi Journal of Biological Sciences**, vol. 24, n. 2, p. 286–294, Fev. 2017. DOI 10.1016/j.sjbs.2016.01.016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1319562X16000188>. Acesso em: 22 Jun. 2022.

ARULDASS, C. A.; MASALAMANY, S. R. L.; VENIL, C. K.; AHMAD, W. A. Antibacterial mode of action of violacein from *Chromobacterium violaceum* UTM5 against *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Environmental Science and Pollution Research**, vol. 25, n. 6, p. 5164–5180, Fev. 2018. DOI 10.1007/s11356-017-8855-2. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-017-8855-2>. Acedido em: 25 Jun. 2022.

ASOLKAR, R., HUANG, H.; KOIVUNEN, M; MARRONE, P. 2014. **Chromobacterium Bioactive Compositions and Metabolites**. U.S. Patent 8,715,754

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E.; PRABHU, S. R.; HERNANDEZ, J.-P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). **Plant and Soil**, vol. 378, n. 1–2, p. 1–33, Mai. 2014. DOI 10.1007/s11104-013-1956-x. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11104-013-1956-x>. Acesso em: 17 Abr. 2022.

BEHERA, B. K.; VARMA, A. **Microbial Biomass Process Technologies and Management**. Cham: Springer International Publishing, 2017. DOI 10.1007/978-3-319-53913-3. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-53913-3>. Acesso em: 22 Jun. 2022.

BELTRÁN-PRIETO, J. C.; NGUYEN, H. B. S. L. Numerical analysis of initial amount of substrate and biomass in substrate inhibition process. **WSEAS Transactions on Systems and Control**, vol. 13, p. 491–496, 2018. Disponível em: <https://publikace.k.utb.cz/handle/10563/1008503>. Acesso em: 23 Jun. 2022.

BETLEJ, I.; SALERNO-KOCHAN, R.; KRAJEWSKI, K. J.; ZAWADZKI, J.; BORUSZEWSKI, P. The influence of culture medium components on the physical and mechanical properties of cellulose synthesized by kombucha microorganisms. **Bio-Resources**, vol. 15, n. 2, p. 3125–3135, 18 Mar. 2020. DOI 10.15376/biores.15.2.3125-3135. Disponível em: <https://bioresources.cnr.ncsu.edu/resources/the-influence-of-culture-medium-components-on-the-physical-and-mechanical-properties-of-cellulose-synthesized-by-kombucha-microorganisms/>. Acesso em: 22 Jun. 2022.

BIOFERTILIZERS Market by Product, Microorganism Type and Application, Crop Type: Global Opportunity Analysis and Industry Forecast, 2019–2026. **Fortune Business Insights**: Maharashtra, India, September, 2019

BIOPESTICIDES - Global Market Trajectory & Analytics. **Research and Markets**, 2020.

BIOPESTICIDES Market Size, Share and Industry Analysis by Product Type, Source, Mode of Application, Crops and Regional Forecast 2018–2025. **Fortune Business Insights**: Maharashtra, India, September, 2020.

BJÖRKLUND, M. Cell size homeostasis: Metabolic control of growth and cell division. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, vol. 1866, n. 3, p. 409–417, Mar. 2019. DOI 10.1016/j.bbamcr.2018.10.002. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488918302544>. Acesso em: 18 Jun. 2022.

BRASIL. 2002. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/D4074.htm#anexoi.24>. Acesso em: 14 abr. 2022.

BUENO, P. A. A.; BALESTRI, E. L.; ROSIELLO, R. D. A. V. F.; SILVA, C. C.; GUALDI, B. L.; OLIVEIRA, V. M. A. T. de; CRISTÓFOLI, J. B.; SEKINE, E. S.; BUENO, R. D. O. Use of starch manufacturer residue in the production of inoculating biofertilizer. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, vol. 23, p. 13, 27 Jun. 2019. DOI 10.5902/2236117038537. Disponível em: <https://periodicos.ufsm.br/reget/article/view/38537>. Acesso em: 22 Jun. 2022.

CAJAMARCA, Sabrina Magaly Navas. **Composição química de graduação em agronomia resíduos agroindustriais e sua relação com o potencial agrônomico de um biofertilizante líquido aeróbico – Hortbio**. 2019. 120f. Tese (Doutorado em Agronomia). Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

CANTABELLA, D.; DOLCET-SANJUAN, R.; SOLSONA, C.; VILANOVA, L.; TORRES, R.; TEIXIDÓ, N. Optimization of a food industry-waste-based medium for the

production of the plant growth promoting microorganism *Pseudomonas oryzae* PGP01 based on agro-food industries by-products. **Biotechnology Reports**, vol. 32, p. e00675, 1 Dez. 2021. DOI 10.1016/j.btre.2021.e00675. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2215017X21000916>. Acesso em: 22 Jun. 2022.

CASTRO, D.; CORDEIRO, I. B.; TAQUITA, P.; EBERLIN, M. N.; GARCIA, J. S.; SOUZA, G. H. M. F.; ARRUDA, M. A. Z.; ANDRADE, E. V.; FILHO, S. A.; CRAINEY, J. L.; LOZANO, L. L.; NOGUEIRA, P. A.; ORLANDI, P. P. Proteomic analysis of *Chromobacterium violaceum* and its adaptability to stress. **BMC Microbiology**, vol. 15, n. 1, p. 272, Dez. 2015. DOI 10.1186/s12866-015-0606-2. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/15/272>. Acesso em: 22 Jun. 2022.

CHOI, S. Y.; LIM, S.; YOON, K.; LEE, J. I.; MITCHELL, R. J. Biotechnological Activities and Applications of Bacterial Pigments Violacein and Prodigiosin. **Journal of Biological Engineering**, vol. 15, n. 1, p. 10, Dez. 2021. DOI 10.1186/s13036-021-00262-9. Disponível em: <https://jbioleng.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13036-021-00262-9>. Acedido em: 25 Jun. 2022.

CHUKA-OGWUDE, D.; NWUCHE, C. O.; OGBONNA, J. C. Co-production of parasporal crystal toxins and antimicrobial substances by *Bacillus thuringiensis* BAR 3. **Nigerian Journal of Biotechnology**, vol. 32, p. 41–52, 24 Abr. 2017. DOI 10.4314/njb.v32i1. Disponível em: <https://www.ajol.info/index.php/njb/article/view/155267>. Acesso em: 22 Jun. 2022.

DIKE-NDUDIM, J. N.; UGENYI, L. C.; NDUBUEZE, C. W. Assessment of antifungal potentials of violacein extract from *Chromobacterium violaceum* isolated from domestic and recreational water sources in Owerri, Imo State, Nigeria. **World Journal of Advanced Research and Reviews**, vol. 10, n. 3, p. 168–172, 30 Jun. 2021. DOI 10.30574/wjarr.2021.10.3.0243. Disponível em: <https://wjarr.com/content/assessment-antifungal-potentials-violacein-extract-chromobacterium-violaceum-isolated>. Acesso em: 22 Jun. 2022.

DUNHAM, W.; TRIMMER, M. Biological Products Around the World. **Bioproducts Industry Alliance Spring Meeting & International Symposium**, 2018. Disponível em: <<https://www.bpia.org/>>. Acesso em: 11 abr. 2022.

DURÁN, N.; JUSTO, G. Z.; DURÁN, M.; BROCCHI, M.; CORDI, L.; TASIC, L.; CASTRO, G. R.; NAKAZATO, G. Advances in *Chromobacterium violaceum* and properties of violacein-its main secondary metabolite: A review. **Biotechnology Advances**, vol. 34, n. 5, p. 1030–1045, Set. 2016. DOI 10.1016/j.biotechadv.2016.06.003. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975016300714>. Acedido em: 25 Jun. 2022.

ELIZABETH, O. T.; FEHINTOLA, O. T.; SEUN, A. J.; BOLANLE, F. R.; OYENIKE, A. T.; FAPOHUNDA, S. O. Concept and Kinetics of Microbial Growth and Death: A Review. **Himalayan Journal of Agriculture**, v. 2, ed. 5, 2021. Disponível em:

https://www.iarconsortium.org/articles/349_Concept_and_Kinetics_of_Microbial_Growth_and_Death_A_Review. Acesso em: 18 Abr. 2022

ERKMEN, O. Practice 14 - Cultural characteristics of bacteria. In: ERKMEN, O. (ed.). **Laboratory Practices in Microbiology**. [S. l.]: Academic Press, 2021. p. 135–141. DOI 10.1016/B978-0-323-91017-0.00014-7. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323910170000147>. Acesso em: 22 Jun. 2022.

FARIAS, D. I. O. A. de; LEITE, R. da C.; RIBEIRO, E. A.; MARTINS, A. L. L.; CHAGAS JÚNIOR, A. F. Glyphosate and atrazine inhibit growth of *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Chromobacterium subtsugae* and *Saccharopolyspora spinosa*. **Agronomía Colombiana**, vol. 39, n. 1, p. 113–120, 1 Jan. 2021. DOI 10.15446/agron.colomb.v39n1.89870. Disponível em: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/89870>. Acesso em: 17 Abr. 2022.

FERNANDES, Mirele Rodrigues. **Degradação de quitina em *Chromobacterium*: proposição da via catabólica e expressão heteróloga de uma monooxigenase lítica de polissacarídeo de *C. violaceum* ATCC 12472**. 2017. 111f. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Ceará – Centro de ciências, Fortaleza, 2017.

GABARDO, G.; PRIA, M. D.; PRESTES, A. M. C.; SILVA, H. L. da. TRICHODERMA ASPERELLUM E BACILLUS SUBTILIS COMO ANTAGONISTAS NO CRESCIMENTO DE FUNGOS FITOPATOGENICOS IN VITRO. **Brazilian Journal of Development**, vol. 6, n. 8, p. 55870–55885, 2020a. DOI 10.34117/bjdv6n8-123. Disponível em: <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/14663/12145>. Acesso em: 17 Abr. 2022.

GABARDO, G.; PRIA, M. D.; SILVA, H. L. da; HARMS, M. G. Alternative products on Asian soybean rust control and their influence on defoliation, productivity and yield components. **Summa Phytopathologica**, vol. 46, n. 2, p. 98–104, Jun. 2020b. DOI 10.1590/0100-5405/231561. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-54052020000200098&tlng=en. Acesso em: 17 Abr. 2022.

GONÇALVES, F. A. G.; COLEN, G.; TAKAHASHI, A. J. Optimization of cultivation conditions for extracellular lipase production by *Yarrowia lipolytica* using response surface method. **African Journal of Biotechnology**, vol. 12, n. 17, p. 2270–2278, 24 Abr. 2013. DOI 10.5897/AJB2012.3019. Disponível em: <https://academicjournals.org/journal/AJB/article-abstract/1C9B29824704>. Acesso em: 17 Abr. 2022.

GOTOR-VILA, A.; TEIXIDÓ, N.; SISQUELLA, M.; TORRES, R.; USALL, J. Biological Characterization of the Biocontrol Agent *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8: The Effect of Temperature, pH and Water Activity on Growth, Susceptibility to Antibiotics and Detection of Enterotoxigenic Genes. **Current Microbiology**, vol. 74, n. 9, p. 1089–1099, Set. 2017. DOI 10.1007/s00284-017-1289-8. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00284-017-1289-8>. Acesso em: 22 Jun. 2022.

GRAY, D. A.; DUGAR, G.; GAMBA, P.; STRAHL, H.; JONKER, M. J.; HAMOEN, L. W. Extreme slow growth as alternative strategy to survive deep starvation in bacteria. **Nature Communications**, vol. 10, n. 1, p. 890, Dez. 2019. DOI 10.1038/s41467-019-08719-8. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41467-019-08719-8>. Acesso em: 17 Abr. 2022.

HAN, J.-H.; PARK, G.-C.; KIM, K. S. Antagonistic Evaluation of *Chromobacterium* sp. JH7 for Biological Control of Ginseng Root Rot Caused by *Cylindrocarpon destructans*. **Mycobiology**, vol. 45, n. 4, p. 370–378, Dez. 2017. DOI 10.5941/MYCO.2017.45.4.370. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.5941/MYCO.2017.45.4.370>. Acesso em: 22 Jun. 2022.

HAN, L.; WANG, Z.; LI, N.; WANG, Y.; FENG, J.; ZHANG, X. *Bacillus amyloliquefaciens* B1408 suppresses Fusarium wilt in cucumber by regulating the rhizosphere microbial community. **Applied Soil Ecology**, vol. 136, p. 55–66, Abr. 2019. DOI 10.1016/j.apsoil.2018.12.011. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0929139318310916>. Acesso em: 17 Abr. 2022.

HASANAIN, A. M; *et al.* Development of a Cheap Media for *Bacillus thuringiensis* Growth. **International Journal of Biotechnology and Bioengineering**, vol. 3, n. 6, p. 216–223, 2017. DOI 10.25141/2475-3432-2017-6.0216. Disponível em: <https://biocoreopen.org/ijbb/Development-of-a-Cheap-Media-for-Bacillus-thuringiensis-Growth.php>. Acesso em: 22 Jun. 2022.

HAYNES, W. Tukey's Test. In: DUBITZKY, W.; WOLKENHAUER, O.; CHO, K.-H.; YOKOTA, H. (eds.). **Encyclopedia of Systems Biology**. New York, NY: Springer New York, 2013. p. 2303–2304. DOI 10.1007/978-1-4419-9863-7_1212. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-9863-7_1212. Acesso em: 22 Jun. 2022.

JAY, J. M. 2000. Modern food microbiology. 6th ed. Gaithersburg (MD): Aspen. 679p.

JIAO, R.; MUNIR, S.; HE, P.; YANG, H.; WU, Y.; WANG, J.; HE, P.; CAI, Y.; WANG, G.; HE, Y. Biocontrol potential of the endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* YN201732 against tobacco powdery mildew and its growth promotion. **Biological Control**, vol. 143, p. 104160, Abr. 2020. DOI 10.1016/j.biocontrol.2019.104160. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1049964419306164>. Acesso em: 17 Abr. 2022.

KANG, S.-M.; KHAN, A. L.; WAQAS, M.; ASAF, S.; LEE, K.-E.; PARK, Y.-G.; KIM, A.-Y.; KHAN, M. A.; YOU, Y.-H.; LEE, I.-J. Integrated phytohormone production by the plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus tequilensis* SSB07 induced thermotolerance in soybean. **Journal of Plant Interactions**, vol. 14, n. 1, p. 416–423, 1 Jan. 2019. DOI 10.1080/17429145.2019.1640294. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17429145.2019.1640294>. Acesso em: 17 Abr. 2022.

KIM, H. J.; CHOI, H. S.; YANG, S. Y.; KIM, I. S.; YAMAGUCHI, T.; SOHNG, J. K.; PARK, S. K.; KIM, J.-C.; LEE, C. H.; GARDENER, B. M.; KIM, Y. C. Both extracellular chitinase and a new cyclic lipopeptide, chromobactomycin, contribute to the biocontrol activity of *Chromobacterium* sp. C61: Chitinase and cyclic lipopeptide in biocontrol. **Molecular Plant Pathology**, vol. 15, n. 2, p. 122–132, Fev. 2014. DOI 10.1111/mpp.12070. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/mpp.12070>. Acesso em: 22 Jun. 2022.

LEE, D.-R.; CHAW, E. H. M.; AJUNA, H.; KIM, K.-Y. Effect of Large-Scale Cultivation of *Bacillus amyloliquefaciens* Y1 Using Fertilizer Based Medium for Control of Citrus Melanose Causing *Diaporthe citri*. **Korean Journal of Soil Science and Fertilizer**, vol. 52, n. 2, p. 84–92, 31 Mai. 2019. DOI 10.7745/KJSSF.2019.52.2.084. Disponível em: <http://www.kjssf.org/articles/doi/10.7745/KJSSF.2019.52.2.084>. Acesso em: 23 Jun. 2022.

LI, Q.; XU, S.; ZHAO, W.; YANG, R.; ZHAO, S.; HUANG, Z.; WANG, J. Rhizosphere microbiome mediated growth-promoting mechanisms of *Bacillus amyloliquefaciens* FH-1 on rice. **Acta Microbiol. Sin.**, vol. 59, p. 1–17, 2019. Disponível em: <https://jtp.global.cnki.net/bilingual/detail/html/WSXB201912016>. Acesso em: 18 Abr. 2022

LIU, H.; CARVALHAIS, L. C.; CRAWFORD, M.; SINGH, E.; DENNIS, P. G.; PIETERSE, C. M. J.; SCHENK, P. M. Inner Plant Values: Diversity, Colonization and Benefits from Endophytic Bacteria. **Frontiers in Microbiology**, vol. 8, p. 2552, 19 Dez. 2017. DOI 10.3389/fmicb.2017.02552. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.02552/full>. Acesso em: 17 Abr. 2022.

LO, K.-J.; LEE, S.-K.; LIU, C.-T. Development of a low-cost culture medium for the rapid production of plant growth-promoting *Rhodopseudomonas palustris* strain PS3. **PLOS ONE**, vol. 15, n. 7, p. e0236739, 30 Jul. 2020. DOI 10.1371/journal.pone.0236739. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0236739>. Acesso em: 16 Jun. 2022.

LOPES, R.; TSUI, S.; GONÇALVES, P. J. R. O.; DE QUEIROZ, M. V. A look into a multifunctional toolbox: endophytic *Bacillus* species provide broad and underexploited benefits for plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol. 34, n. 7, p. 94, Jul. 2018. DOI 10.1007/s11274-018-2479-7. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11274-018-2479-7>. Acesso em: 17 Abr. 2022.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S. **Microbiologia de Brock**. 14^a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MAGARELLI, R. A.; TRUPO, M.; AMBRICO, A.; LAROCCA, V.; MARTINO, M.; PALAZZO, S.; BALDUCCHI, R.; JOUTSJOKI, V.; PIHLANTO, A.; BEVIVINO, A. Designing a Waste-Based Culture Medium for the Production of Plant Growth Promoting Microorganisms Based on Cladodes Juice from *Opuntia ficus-indica* Pruning. **Fermentation**, vol. 8, n. 5, p. 225, 14 Mai. 2022. DOI 10.3390/fermentation8050225. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2311-5637/8/5/225>. Acesso em: 23 Jun. 2022.

MAIER, R. M.; PEPPER, I. L. Bacterial Growth. **Environmental Microbiology**. [S. l.]: Elsevier, 2015. p. 37–56. DOI 10.1016/B978-0-12-394626-3.00003-X. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012394626300003X>. Acesso em: 23 Jun. 2022.

MARRONE, P. G. Pesticidal natural products – status and future potential. **Pest Management Science**, , p. ps.5433, 15 Mai. 2019. DOI 10.1002/ps.5433. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.5433>. Acesso em: 17 Abr. 2022.

MARTIN, P. A. W.; GUNDERSEN-RINDAL, D.; BLACKBURN, M.; BUYER, J. Chromobacterium subtsugae sp. nov., a betaproteobacterium toxic to Colorado potato beetle and other insect pests. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, vol. 57, n. Pt 5, p. 993–999, Mai. 2007. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64611-0>.

MASUELLI, L.; PANTANELLA, F.; LA REGINA, G.; BENVENUTO, M.; FANTINI, M.; MATTERA, R.; DI STEFANO, E.; MATTEI, M.; SILVESTRI, R.; SCHIPPA, S.; MANZARI, V.; MODESTI, A.; BEI, R. Violacein, an indole-derived purple-colored natural pigment produced by Janthinobacterium lividum, inhibits the growth of head and neck carcinoma cell lines both in vitro and in vivo. **Tumor Biology**, vol. 37, n. 3, p. 3705–3717, Mar. 2016. DOI 10.1007/s13277-015-4207-3. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s13277-015-4207-3>. Acedido em: 25 Jun. 2022.

MAZMIRA, M. M. Effect of saccharides on growth, sporulation rate and δ -endotoxin synthesis of Bacillus thuringiensis. **AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY**, vol. 11, n. 40, 17 Mai. 2012. DOI 10.5897/AJB11.1391. Disponível em: <http://www.academicjournals.org/ajb/abstracts/abs2012/17May/Mazmira%20et%20al.htm>. Acesso em: 23 Jun. 2022.

MOGHANNEM, S. A. M.; FARAG, M. M. S.; SHEHAB, A. M.; AZAB, M. S. Exopolysaccharide production from Bacillus velezensis KY471306 using statistical experimental design. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 49, n. 3, p. 452–462, Jul. 2018. DOI 10.1016/j.bjm.2017.05.012. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1517838216306189>. Acesso em: 17 Abr. 2022.

MONNERAT, R.; *et al.* Produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero Bacillus para uso na agricultura – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2020. 46 p. - (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 369).

MORENO-VELANDIA, C. A.; ONGENA, M.; KLOEPPER, J. W.; COTES, A. M. Biosynthesis of Cyclic Lipopeptides by Bacillus velezensis Bs006 and its Antagonistic Activity are Modulated by the Temperature and Culture Media Conditions. **Current Microbiology**, vol. 78, n. 9, p. 3505–3515, Set. 2021. DOI 10.1007/s00284-021-02612-8. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s00284-021-02612-8>. Acesso em: 23 Jun. 2022.

MSARAH, M. J.; IBRAHIM, I.; HAMID, A. A.; AQMA, W. S. Optimisation and production of alpha amylase from thermophilic Bacillus spp. and its application in food

waste biodegradation. **Heliyon**, vol. 6, n. 6, p. e04183, Jun. 2020. DOI 10.1016/j.heliyon.2020.e04183. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405844020310276>. Acesso em: 23 Jun. 2022.

MY, N. T. H.; LOAN, T. T.; THUOC, D. V. High Amylase Production by a Novel Strain of *Bacillus amyloliquefaciens* M37 Isolated from Can Gio Mangrove Forest, Vietnam. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, vol. 12, n. 4, p. 4675–4685, 16 Out. 2021. DOI 10.33263/BRIAC124.46754685. Disponível em: <https://biointerfaceresearch.com/wp-content/uploads/2021/10/20695837124.46754685.pdf>. Acesso em: 23 Jun. 2022.

NDLOVU, T.; RAUTENBACH, M.; KHAN, S.; KHAN, W. Variants of lipopeptides and glycolipids produced by *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa* cultured in different carbon substrates. **AMB Express**, vol. 7, n. 1, p. 109, Dez. 2017. DOI 10.1186/s13568-017-0367-4. Disponível em: <http://amb-express.springeropen.com/articles/10.1186/s13568-017-0367-4>. Acesso em: 18 Jun. 2022.

NIKITINA, M. A.; CHERNUKHA, I. M. Studying growth kinetics of microbial populations using information technology. Solving the Cauchy problem. **BIO Web of Conferences**, vol. 23, p. 02004, 2020. DOI 10.1051/bioconf/20202302004. Disponível em: <https://www.bio-conferences.org/10.1051/bioconf/20202302004>. Acesso em: 17 Abr. 2022.

OLIVEIRA-HOFMAN, C.; COTTRELL, T. E.; BOCK, C.; MIZELL III, R. F.; WELLS, L.; SHAPIRO-ILAN, D. I. Impact of a biorational pesticide on the pecan aphid complex and its natural enemies. **Biological Control**, vol. 161, p. 104709, 1 Out. 2021. DOI 10.1016/j.biocontrol.2021.104709. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S104996442100178X>. Acesso em: 23 Jun. 2022.

PARWEEN, T.; JAN, S. Pesticides and environmental ecology. **Ecophysiology of Pesticides**. [S. l.]: Elsevier, 2019. p. 1–38. DOI 10.1016/B978-0-12-817614-6.00001-9. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128176146000019>. Acesso em: 17 Abr. 2022.

PATHMA, J.; KENNEDY, R. K.; BHUSHAN, L. S.; SHANKAR, B. K.; THAKUR, K. Microbial Biofertilizers and Biopesticides: Nature's Assets Fostering Sustainable Agriculture. In: PRASAD, R.; KUMAR, V.; SINGH, J.; UPADHYAYA, C. P. (eds.). **Recent Developments in Microbial Technologies**. Singapore: Springer Singapore, 2020. p. 39–69. DOI 10.1007/978-981-15-4439-2_2. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-981-15-4439-2_2. Acesso em: 17 Abr. 2022.

PODPORA, B.; ŚWIDERSKI, F.; SADOWSKA, A.; RAKOWSKA, R.; WASIAK-ZYS, G. Spent brewer's yeast extracts as a new component of functional food. **Czech Journal of Food Sciences**, vol. 34, n. No. 6, p. 554–563, 21 Dez. 2016. DOI 10.17221/419/2015-CJFS. Disponível em: <http://www.agriculturejournals.cz/web/cjfs.htm?volume=34&firstPage=554&type=publishedArticle>. Acesso em: 23 Jun. 2022.

POMMERVILLE, J. C. **Fundamentals of microbiology**. 10th ed. Burlington, MA: Jones & Bartlett Learning, 2014.

PRODUÇÃO de microrganismos para uso próprio na agricultura (on-farm) - Official statements. **Embrapa**, 2021. Disponível: <https://www.embrapa.br/en/esclarecimentos-oficiais/-/asset_publisher/TMQZKu1jxu5K/content/nota-tecnica-producao-de-microrganismos-para-uso-proprio-na-agricultura-on-farm-?inheritRedirect=false>. Acesso em: 11 abr. 2022.

PUMIRAT, P.; VANAPORN, M.; BOONYUEN, U.; INDRAWATTANA, N.; RUNGRU-ENGKITKUN, A.; CHANTRATITA, N. Effects of sodium chloride on heat resistance, oxidative susceptibility, motility, biofilm and plaque formation of *Burkholderia pseudomallei*. **MicrobiologyOpen**, vol. 6, n. 4, p. e00493, Ago. 2017. DOI 10.1002/mbo3.493. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mbo3.493>. Acesso em: 23 Jun. 2022.

QIN, Y.; SHANG, Q.; ZHANG, Y.; LI, P.; CHAI, Y. *Bacillus amyloliquefaciens* L-S60 Reforms the Rhizosphere Bacterial Community and Improves Growth Conditions in Cucumber Plug Seedling. **Frontiers in Microbiology**, vol. 8, p. 2620, 22 Dez. 2017. DOI 10.3389/fmicb.2017.02620. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.02620/full>. Acesso em: 17 Abr. 2022.

R CORE TEAM (2022). R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. Disponível em: <https://www.R-project.org/>.

RATZKE, C.; GORE, J. Modifying and reacting to the environmental pH can drive bacterial interactions. **PLOS Biology**, vol. 16, n. 3, p. e2004248, 14 Mar. 2018. DOI 10.1371/journal.pbio.2004248. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.2004248>. Acesso em: 23 Jun. 2022.

SAKTHISELVAN, P.; SUDHARSAN MEENAMBIGA, S.; MADHUMATHI, R. Kinetic Studies on Cell Growth. In: VIKAS, B.; FASULLO, M. (eds.). **Cell Growth**. [S. l.]: IntechOpen, 2019. DOI 10.5772/intechopen.84353. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/cell-growth/kinetic-studies-on-cell-growth>. Acesso em: 17 Abr. 2022.

SALEM, M. Z.-A.; GIRBAL-NEUHAUSER, E.; CHABANE, Y. N. Genome sequence data of *Bacillus amyloliquefaciens* L-17. **Data in Brief**, vol. 39, p. 107505, Dez. 2021. DOI 10.1016/j.dib.2021.107505. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352340921007861>. Acesso em: 17 Abr. 2022.

SANTOS JÚNIOR, V. dos; NIZOLI, É.; GALVAN, D.; GOMES, R. J.; BIZ, G.; RES-SUTTE, J. B.; ROCHA, T. de S.; SPINOSA, W. A. Micronutrient requirements and effects on cellular growth of acetic acid bacteria involved in vinegar production. **Food Science and Technology**, vol. 42, p. e05121, 2022. DOI 10.1590/fst.05121. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612022000100630&tlng=en. Acesso em: 23 Jun. 2022.

SANTOS, M. S.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. **AMB Express**, vol. 9, n. 1, p. 205, Dez. 2019. DOI

10.1186/s13568-019-0932-0. Disponível em: <https://amb-express.springeropen.com/articles/10.1186/s13568-019-0932-0>. Acesso em: 13 Abr. 2022.

SATYANTINI, W. H.; PRATIWI, R. M.; SAHIDU, A. M.; NINDARWI, D. D. Growth of *Bacillus* sp. and *Flavobacterium* sp. in culture media with the addition of liquid whey tofu waste. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, vol. 236, p. 012092, 1 Mar. 2019. DOI 10.1088/1755-1315/236/1/012092. Disponível em: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/236/1/012092>. Acesso em: 23 Jun. 2022.

SHANNAG, H. K.; CAPINERA, J. L. Comparative Effects of Two Novel Betaproteobacteriabased Insecticides on *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) and *Phenacoccus madeirensis* (Hemiptera: Pseudococcidae). **Florida Entomologist**, vol. 101, n. 2, p. 212–218, Jun. 2018. DOI 10.1653/024.101.0209. Disponível em: <http://www.bioone.org/doi/10.1653/024.101.0209>. Acesso em: 23 Jun. 2022.

SINGH, A. K.; RAUTELA, R.; CAMEOTRA, S. S. Substrate dependent in vitro antifungal activity of *Bacillus* sp strain AR2. **Microbial Cell Factories**, vol. 13, n. 1, p. 67, Dez. 2014. DOI 10.1186/1475-2859-13-67. Disponível em: <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2859-13-67>. Acesso em: 23 Jun. 2022.

SINGH, N.; RAINA, S.; SINGH, D.; GHOSH, M.; HELFISH, A. I. Exploitation Of Promising Native Strains Of *Bacillus Subtilis* With Antagonistic Properties Against Fungal Pathogens And Their Pgpr Characteristic. **Journal of Plant Pathology**, vol. 99, n. 1, p. 27–35, 16 Fev. 2017b. DOI 10.4454/jpp.v99i1.3809. Disponível em: <http://www.sipav.org/main/jpp/index.php/jpp/article/view/3809>. Acesso em: 17 Abr. 2022.

SINGH, V.; HAQUE, S.; NIWAS, R.; SRIVASTAVA, A.; PASUPULETI, M.; TRIPATHI, C. K. M. Strategies for Fermentation Medium Optimization: An In-Depth Review. **Frontiers in Microbiology**, vol. 7, 6 Jan. 2017a. DOI 10.3389/fmicb.2016.02087. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.02087/full>. Acesso em: 21 Jun. 2022.

SON, H. M.; KIM, H. Effect of nutrient types on the hydration of cementitious materials with co-cultured bacteria. **Case Studies in Construction Materials**, vol. 17, p. e01124, Dez. 2022. DOI 10.1016/j.cscm.2022.e01124. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S221450952200256X>. Acesso em: 21 Jun. 2022.

SOUSA, A. J. S.; SILVA, C. F. B.; SOUSA, J. S.; MONTEIRO, J. E.; FREIRE, J. E. C.; SOUSA, B. L.; LOBO, M. D. P.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; GRANGEIRO, T. B. A thermostable chitinase from the antagonistic *Chromobacterium violaceum* that inhibits the development of phytopathogenic fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 126, p. 50–61, Jul. 2019. DOI 10.1016/j.enzmictec.2019.03.009. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022919300456>. Acesso em: 21 Jun. 2022.

STANBURY P. F., WHITAKER A., HALL S. J. **Principles of Fermentation Technology**. Butterworth-Heinemann; Oxford, UK: 2016. Media for Industrial Fermentations; p. 213.

SUBRAMANIAM, S.; RAVI, V.; SIVASUBRAMANIAN, A. Synergistic antimicrobial profiling of violacein with commercial antibiotics against pathogenic microorganisms. **Pharmaceutical Biology**, vol. 52, n. 1, p. 86–90, Jan. 2014. DOI 10.3109/13880209.2013.815634. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/13880209.2013.815634>. Acedido em: 25 Jun. 2022.

SUN, J.; GUO, J.; YANG, Q.; HUANG, J. Diluted conventional media improve the microbial cultivability from aquarium seawater. **Journal of Microbiology**, vol. 57, n. 9, p. 759–768, Set. 2019. DOI 10.1007/s12275-019-9175-7. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12275-019-9175-7>. Acesso em: 21 Jun. 2022.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R; CASE, Christine L. **Microbiologia**. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 935 p.

UYGUT, M. A.; TANYILDIZI, M. Ş. Optimization of Alpha-Amylase Production by *Bacillus amyloliquefaciens* Grown on Orange Peels. **Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science**, vol. 42, n. 2, p. 443–449, 1 Jun. 2018. DOI 10.1007/s40995-016-0077-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40995-016-0077-9>. Acesso em: 21 Jun. 2022.

VASSILEVA, M.; MALUSÀ, E.; SAS-PASZT, L.; TRZCINSKI, P.; GALVEZ, A.; FLOR-PEREGRIN, E.; SHILEV, S.; CANFORA, L.; MOCALI, S.; VASSILEV, N. Fermentation Strategies to Improve Soil Bio-Inoculant Production and Quality. **Microorganisms**, vol. 9, n. 6, p. 1254, 9 Jun. 2021. DOI 10.3390/microorganisms9061254. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/6/1254>. Acesso em: 17 Abr. 2022.

WANG, D.; KIM, H.; LEE, S.; KIM, D.-H.; JOE, M.-H. High-level production of poly-γ-glutamic acid from untreated molasses by *Bacillus siamensis* IR10. **Microbial Cell Factories**, vol. 19, n. 1, p. 101, Dez. 2020. DOI 10.1186/s12934-020-01361-w. Disponível em: <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-020-01361-w>. Acesso em: 23 Jun. 2022.

WANG, J. H.; XU, S. Q.; ZHANG, M. Q. Research Progress on *Bacillus Amyloliquefaciens*. **Subtropical Agric. Res.**, v. 13, ed. 3, p. 191–195, 2017. DOI 10.13321/j.cnki.subtrop.agric.res.2017.03.010. Disponível em: <http://html.rhhz.net/yrdnyyj/html/20170310.htm>. Acesso: 18 Abr. 2022

WEN, J.; ZHAO, X.; SI, F.; QI, G. Surfactin, a quorum sensing signal molecule, globally affects the carbon metabolism in *Bacillus amyloliquefaciens*. **Metabolic Engineering Communications**, vol. 12, p. e00174, 12 Mai. 2021. DOI 10.1016/j.mec.2021.e00174. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8166949/>. Acesso em: 21 Jun. 2022.

WILLEY, J. M., SHERWOOD, L., WOOLVERTON, C. J., PRESCOTT, L. M. **Prescott's microbiology**. New York: McGraw-Hill, 2017.

XU, L.; GEELEN, D. Developing Biostimulants From Agro-Food and Industrial By-Products. **Frontiers in Plant Science**, vol. 9, p. 1567, 30 Out. 2018. DOI 10.3389/fpls.2018.01567. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2018.01567/full>. Acesso em: 21 Jun. 2022.

YAKHIN, O. I.; LUBYANOV, A. A.; YAKHIN, I. A.; BROWN, P. H. Biostimulants in Plant Science: A Global Perspective. **Frontiers in Plant Science**, vol. 7, 26 Jan. 2017. DOI 10.3389/fpls.2016.02049. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2016.02049/full>. Acesso em: 17 Abr. 2022.

YANG, C.; DONG, Y.; FRIMAN, V.; JOUSSET, A.; WEI, Z.; XU, Y.; SHEN, Q. Carbon resource richness shapes bacterial competitive interactions by alleviating growth-antibiosis trade-off. **Functional Ecology**, vol. 33, n. 5, p. 868–875, Mai. 2019. DOI 10.1111/1365-2435.13292. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1365-2435.13292>. Acesso em: 21 Jun. 2022.

ZHANG, W.; WEI, L.; XU, R.; LIN, G.; XIN, H.; LV, Z.; QIAN, H.; SHI, H. Evaluation of the Antibacterial Material Production in the Fermentation of *Bacillus amyloliquefaciens*-9 from Whitespotted Bamboo Shark (*Chiloscyllium plagiosum*). **Marine Drugs**, vol. 18, n. 2, p. 119, 18 Fev. 2020. DOI 10.3390/md18020119. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1660-3397/18/2/119>. Acesso em: 21 Jun. 2022.