



LUANA APARECIDA GILIO

**MEIOS DE CULTURA PARA PRODUÇÃO DE ENDÓSPOROS
POR *Bacillus velezensis***

**LAVRAS - MG
2023**

LUANA APARECIDA GILIO

**MEIOS DE CULTURA PARA PRODUÇÃO DE ENDÓSPOROS POR *Bacillus*
*velezensis***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, linha de pesquisa em Controle Biológico de Doenças de Plantas, para obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Wagner Bettiol
Orientador

Dr. Gabriel Moura Mascarin
Co-orientador

**LAVRAS - MG
2023**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Gilio, Luana Aparecida.

Meios de cultura para produção de endósporos por *Bacillus velezensis* / Luana Aparecida Gilio. - 2023.

64 p.

Orientador(a): Wagner Bettiol.

Coorientador(a): Gabriel Moura Mascarin.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Controle Biológico. 2. Fermentação líquida. 3. Meios de cultura. I. Bettiol, Wagner. II. Mascarin, Gabriel Moura. III. Título.

LUANA APARECIDA GILIO

**MEIOS DE CULTURA PARA PRODUÇÃO DE ENDÓSPOROS POR
*Bacillus velezensis***

CULTURE MEDIA FOR ENDOSPORES PRODUCTIONS BY *Bacillus velezensis*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 18 de janeiro de 2023.

Dr. Wagner Bettiol

Dr Gileno Vieira Lacerda Júnior

Dr Flavio Henrique Vasconcelos de Medeiros

EMBRAPA Meio Ambiente

EMBRAPA Meio Ambiente

UFLA

Dr. Wagner Bettiol
Orientador

Dr. Gabriel Moura Mascarin
Coorientador

**LAVRAS, MG
2023**

À todas as pessoas que me ajudaram nessa etapa, em especial à minha mãe Cecília, ao meu pai Sebastião, à minha irmã Silvana e ao meu namorado Luan.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus e à Nossa Senhora Aparecida, pelo dom da vida, por toda proteção, iluminando meu caminho e me amparando nas dificuldades.

À minha mãe Cecília de Lima Alves Gilio e ao meu pai Sebastião Gilio, por não medirem esforços para que eu pudesse estudar, por me ensinarem desde tão cedo o amor pela agricultura, por me ensinarem a valorizar as pequenas coisas e por estarem sempre ao meu lado, me apoiando, incentivando e dando suporte em todos os momentos.

À minha irmã Silvana Alves Gilio, por todo apoio, amor, auxílio e compreensão.

Ao meu namorado Luan da Silva Batista, por todo incentivo, compreensão, por me motivar todos os dias e estar a qualquer momento pronto pra ajudar.

Ao Prof. Dr. Wagner Bettiol, pela orientação, apoio, incentivo, confiança, paciência, ensinamentos transmitidos e, principalmente, pela dedicação e ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Engenheiro Agrônomo Victor Schiavon Villa Nova e à sua esposa Engenheira Agrônoma Patrícia Maria Swart, pela colaboração com este trabalho, ensinando muitos detalhes práticos do cultivo *on farm* de *Bacillus*, pelo fornecimento de reagentes para o preparo de meios e por toda troca de conhecimentos que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Gabriel Moura Mascarin, pela co-orientação, suporte e ensinamentos.

À equipe do Laboratório de Microbiologia Ambiental “Raquel Ghini” da Embrapa Meio Ambiente, em especial ao Abrahão, Ana Carolina, Celinha, Elke Vilela, Neusa Domingos e Rosely Nascimento, pela ajuda ao longo do desenvolvimento desta dissertação.

À Embrapa Meio Ambiente, pelas oportunidades de desenvolver esta dissertação e para meu aperfeiçoamento pessoal e profissional.

Aos amigos que fiz nesta jornada e que se mantiveram firmes e fortes ao meu lado durante as muitas fermentações, Ana Clara, Ana Reina, Aline Lira, Bruno, Elisa Góis, Gabriela Dias, Gabriela Gontijo, Gileno Lacerda, João Ventura, Letícia Fernandes, Luana Dantas, Lucas Guedes, Paul Pherez, Peterson Nunes e Tamires Duarte.

Ao João Ventura por toda ajuda na análise estatística dos dados.

À minha antiga professora do ensino médio Cidinha e à minha ex-orientadora da graduação Roseli dos Reis Goulart, hoje amigas, que foram fundamentais para que eu chegasse até aqui, me incentivando, dando conselhos e ensinando.

Aos professores da pós-graduação que muito contribuíram com a minha formação.

À Universidade Federal de Lavras – UFLA e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de ingresso no Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia e pelo aprendizado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa.

Aos membros da banca, pela disponibilidade em colaborar com este trabalho.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram com o desenvolvimento desta pesquisa.

MUITO OBRIGADA!

“No tempo de Deus
Todas as promessas irão se cumprir
No tempo de Deus
A ferida vai virar cicatriz
No tempo de Deus
Os seus sonhos se tornarão reais
No tempo de Deus
Você verá que valeu a pena esperar”

Pr. Lucas. Trecho da música “Tempo de Deus”.

RESUMO

Para minimizar os prejuízos causados pelas doenças de plantas é essencial na agricultura realizar o controle. Dentre as medidas de controle de doenças de plantas, o controle biológico é uma alternativa econômica e ambientalmente viável. Dentre os agentes de biocontrole usados, o gênero *Bacillus* é reconhecido por sua eficiência, com várias espécies disponíveis no mercado. O isolado de *Bacillus velezensis* AP 3 vem se mostrando promissor no controle de doenças, nematoides, tratamento de sementes e como coinoculante, pois atua através de antibiose, competição e indução de resistência, além de promover o crescimento vegetal, sendo um produtor de fitohormônios. Considerando as necessidades de desenvolver produtos eficientes e aumentar o número de produtos biológicos disponíveis no mercado, o presente trabalho teve como objetivos otimizar a produção massal de *B. velezensis* AP 3 e desenvolver uma formulação pó-molhável. A otimização foi baseada na produção de endósporos avaliada por meio da determinação das unidades formadoras de colônias. A otimização da fermentação líquida foi realizada testando-se oito diferentes meios de cultura. Logo em seguida foram avaliados os efeitos da aeração, temperatura, estresse de oxigênio, sonicação em banho ultrassom e o volume de pré-cultura. Para a otimização de fatores nutricionais após serem testados meios diferentes, alguns foram selecionados para testes com a substituição da fonte de nitrogênio ou carbono. Posteriormente, o isolado foi formulado em duas diferentes formulações, as quais foram compostas por 50% de inertes 50% do caldo fermentado com *B. velezensis* AP-3 e acrescido de 5% de dispersante após secagem. As formulações foram avaliadas quanto à estabilidade de armazenamento e suspensibilidade. A agitação dos meios de cultura, o estresse de oxigenação, o estresse em banho ultrassom e o volume de pré-cultura testados não interferem na produção de endósporos de *B. velezensis* AP-3. A melhor temperatura para a produção de endósporos de *B. velezensis* AP-3, foi de 34 °C. Os meios de cultura quimicamente definidos para bactérias + sacarose + hidrolisado proteico, o utilizado por agricultor, o utilizado por agricultor + hidrolisado proteico, o de melão + farelo de algodão, o de melão + proteína isolada de soja + levedura hilyses[®] e o de melão + hidrolisado proteico produziram pelo menos 1×10^9 endósporos mL⁻¹. A formulação em pó-molhável à base de amido solúvel apresentou vida de prateleira superior a 114 dias quando armazenada em temperatura ambiente e também apresentou suspensibilidade adequada.

Palavras-chave: Controle biológico. Fermentação líquida. Meios de cultura. Formulação.

ABSTRACT

The control of plant disease is essential to minimize the damage. Among plant disease control measures, biological control is an economically and environmentally viable alternative. The genus *Bacillus* is recognized for its efficiency in the control plant disease, with several species available on the market. The isolate of *Bacillus velezensis* AP 3 has been showing promise in the control of diseases, nematodes, seed treatment and as a coinoculant, as it acts through antibiosis, competition and induction of resistance, in addition to promoting plant growth, being a producer of phytohormones. The present work aimed to optimize the mass production of *B. velezensis* AP 3 and to develop a wettable powder formulation. Optimization was based on endospore production which was evaluated by determining colony forming units. The optimization of liquid fermentation was performed by testing eight different culture media. Soon after, the physical factors aeration, temperature, leaving the Erlenmeyers stationary after a day of fermentation, sonication in an ultrasound bath and the pre-culture volume were evaluated. For the optimization of nutritional factors after testing different media, some were selected for tests with replacement of the nitrogen or carbon source. Subsequently, the isolate was formulated in two different formulations, which were composed of 50% inert 50% of broth fermented with *B. velezensis* AP-3 and added 5% dispersant after drying. The formulations were evaluated for storage stability and suspension. The agitation of the culture media, the oxygenation stress, the stress in an ultrasound bath and the pre-culture volume tested do not interfere with the production of *B. velezensis* AP-3 endospores. The best temperature for the production of *B. velezensis* AP-3 endospores was 34 °C. Chemically defined culture media for bacteria + sucrose + protein hydrolyzate, the one used by a farmer, the one used by a farmer + protein hydrolyzate, the molasses + cottonseed meal, the molasses + soy protein isolate + hylises yeast and the molasses + protein hydrolyzate produced at least 1×10^9 endospores mL⁻¹. The wettable powder formulation based on soluble starch had a shelf life of over 114 days when stored at room temperature and also had adequate suspensibility.

Keywords: Biological control. Liquid fermentation. Culture media. Formulation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Esporos de *Bacillus velezensis* AP-3 em azul e suas células vegetativas em vermelho vistos em microscópio óptico no aumento de 400X.
- Figura 2** Células de *Bacillus velezensis* AP-3 vistas em microscópio óptico no aumento de 400X.
- Figura 3** Placas com a produção de endósporos de *Bacillus velezensis* AP-3 (UFC mL⁻¹) nos meios de cultura da Tabela 14.
- Figura 4** Valores de pH, produção de endósporos e células vegetativas de *Bacillus velezensis* no meio melaço + farelo de algodão e no meio quimicamente definido para bactérias + sacarose + hidrolisado proteico ao longo de cinco dias de fermentação.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Trabalhos publicados comprovando eficácia do isolado de <i>Bacillus velezensis</i> AP-3.
Tabela 2	Composição dos meios líquidos em estudo para otimização da produção de endósporos do isolado de <i>Bacillus velezensis</i> AP-3.
Tabela 3	Composição de meios líquidos com menor custo para otimização da produção de endósporos do isolado de <i>Bacillus velezensis</i> AP-3.
Tabela 4	Composição do meio líquido quimicamente definido para bactérias de Moraes, Capalbo e Moraes (1991) e do mesmo substituindo a glicose por açúcar cristal para otimização da produção de endósporos do isolado de <i>Bacillus velezensis</i> AP-3.
Tabela 5	Composição do meio melaço + farelo de algodão de Dure (2022) e do meio melaço + proteína isolada de soja + levedura hilyses [®] para otimização da produção de endósporos do isolado de <i>Bacillus velezensis</i> AP-3.
Tabela 6	Composição dos meios líquidos que tiveram as maiores produções de endósporos substituindo a fonte de nitrogênio original do meio por hidrolisado proteico.
Tabela 7	Produção de endósporos e células totais de <i>Bacillus velezensis</i> AP-3 expressos em Unidades formadoras de colônias por mL (UFC mL ⁻¹) em diferentes meios de cultura sob fermentação líquida.
Tabela 8	Produção de endósporos de <i>Bacillus velezensis</i> AP-3 expressos em Unidades formadoras de colônias por mL (UFC mL ⁻¹) em diferentes meios de cultura e diferentes volumes sob fermentação líquida.
Tabela 9	Produção de endósporos de <i>Bacillus velezensis</i> AP-3 expressos em Unidades formadoras de colônias por mL (UFC mL ⁻¹) sob diferentes condições de agitação (150 rpm, 200 rpm e 250 rpm) sob fermentação líquida no meio de cultura quimicamente definido para bactérias (MORAES; CAPALBO; MORAES, 1991).
Tabela 10	Produção de endósporos de <i>Bacillus velezensis</i> AP-3 expressos em Unidades formadoras de colônias por mL (UFC mL ⁻¹) sob diferentes

temperaturas (22°C, 28°C e 34°C) sob fermentação líquida no meio de cultura quimicamente definido para bactérias (MORAES; CAPALBO; MORAES, 1991).

Tabela 11 Produção de endósporos de *Bacillus velezensis* AP-3 expressos em Unidades formadoras de colônias por mL (UFC mL⁻¹) sob estresse de aeração de 8, 16 ou 24 horas após um dia de fermentação no meio de cultura quimicamente definido para bactérias (MORAES; CAPALBO; MORAES, 1991).

Tabela 12 Produção de endósporos de *Bacillus velezensis* AP-3 expressos em Unidades formadoras de colônias por mL (UFC mL⁻¹) sob estresse com ondas ultrassônicas por 10, 20 ou 30 minutos após 4 horas do início da fermentação no meio de cultura quimicamente definido para bactérias (MORAES; CAPALBO; MORAES, 1991).

Tabela 13 Produção de endósporos de *Bacillus velezensis* AP-3 expressos em Unidades formadoras de colônias por mL (UFC mL⁻¹) em diferentes volumes de pré-cultura (0,5%; 1%; 1,5% e 10%) sob fermentação líquida.

Tabela 14 Produção de endósporos de *Bacillus velezensis* AP-3 expressos em Unidades formadoras de colônias por mL (UFC mL⁻¹) em diferentes meios de cultura sob fermentação líquida.

Tabela 15 Produção de endósporos de *Bacillus velezensis* AP-3 expressos em Unidades formadoras de colônias por mL (UFC mL⁻¹) no meio de cultura quimicamente definido para bactérias e no mesmo meio com substituição da glicose por açúcar em fermentação líquida.

Tabela 16 Produção de endósporos de *Bacillus velezensis* AP-3 expressos em Unidades formadoras de colônias por mL (UFC mL⁻¹) no meio de cultura melaço + farelo de algodão e no meio melaço + proteína isolada de soja + levedura hilyses[®] sob fermentação líquida.

Tabela 17 Produção de endósporos de *Bacillus velezensis* AP-3 expressos em Unidades formadoras de colônias por mL (UFC mL⁻¹) nos melhores meios testados substituindo a fonte de nitrogênio.

Tabela 18 Viabilidade de endósporos de *Bacillus velezensis* AP-3 formulados em amido solúvel e fécula de batata após 26, 63, 86 e 114 dias após a formulação.

Tabela 19 Suspensibilidade de formulações a base de *Bacillus velezensis* AP-3.

LISTA DE ABREVIATURAS

μL - Microlitro

COV's - Compostos orgânicos voláteis

DAF- Dias após a formulação

HP - Hidrolisado proteico

LB - Luria Bertani

mL - Mililitro

NA - Nutriente Ágar

O₂ - Oxigênio

pH - Potencial hidrogeniônico

UFC - Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1. Mercado de produtos biológicos	19
2.2. Otimização da produção de agentes de controle biológico.....	20
2.3. Formulação de produtos biológicos.....	20
2.4. Gênero <i>Bacillus</i>	21
2.5. <i>Bacillus velezensis</i> AP-3	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1. Origem do isolado e manutenção da cultura.....	30
3.2. Teste com cinco meios recomendados para <i>Bacillus</i>	30
3.3. Escolha do volume de meio no Erlenmeyer (50 ou 100 mL)	31
3.4. Otimização das condições físicas de fermentação	33
3.4.1. Efeito da aeração por meio da agitação a 150, 200 e 250 rotações por minuto	33
3.4.2. Efeito da temperatura de incubação a 22, 28 e 34°C na produção de endósporos.....	34
3.4.3. Efeito do estresse de oxigênio durante o processo fermentativo na produção de endósporos	34
3.4.4. Efeito da sonicação em banho ultrasson na produção de endósporos.....	35
3.4.5. Efeito do volume de pré-cultura na produção de endósporos	35
3.5. Otimização das condições nutricionais	36
3.5.1. Avaliação de meios de cultura de menor custo na produção de endósporos	36
3.5.2. Substituição da fonte de carbono no meio quimicamente definido para bactérias para a produção de endósporos.....	38
3.5.3. Substituição da fonte de nitrogênio no meio melação + farelo de algodão na produção de endósporos	39
3.5.4. Substituição da fonte de nitrogênio nos melhores meios testados com hidrolisado proteico para a produção de endósporos	40
3.6. Cinética de crescimento do isolado de <i>Bacillus velezensis</i> AP-3.....	42
3.7. Formulação do agente de biocontrole em pó molhável (WP)	42
3.8. Custo dos meios de cultura	43
4. RESULTADOS	43
4.1. Teste com cinco meios recomendados para <i>Bacillus</i>	43

4.2. Escolha do volume de meio no Erlenmeyer (50 ou 100 mL)	43
4.3. Otimização das condições físicas de fermentação	45
4.3.1. Efeito da aeração por meio da agitação a 150, 200 e 250 rotações por minuto	45
4.3.2. Efeito da temperatura de incubação a 22, 28 e 34°C na produção de endósporos	45
4.3.3. Efeito do estresse de oxigênio durante o processo fermentativo na produção de endósporos	46
4.3.4. Efeito da sonicação em banho ultrasson na produção de endósporos	46
4.3.5. Efeito do volume de pré-cultura na produção de endósporos	47
4.4. Otimização das condições nutricionais	48
4.4.1. Avaliação de meios de cultura de menor custo na produção de endósporos	48
4.4.2. Substituição da fonte de carbono no meio quimicamente definido para bactérias para a produção de endósporos	49
4.4.3. Substituição da fonte de nitrogênio no meio melaço + farelo de algodão na produção de endósporos	50
4.4.4. Substituição da fonte de nitrogênio nos melhores meios testados com hidrolisado proteico para a produção de endósporos	50
4.5. Cinética de crescimento do isolado de <i>Bacillus velezensis</i> AP-3	51
4.6. Formulação do agente de biocontrole em pó molhável (WP)	52
5. DISCUSSÃO	53
6. CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58

1. INTRODUÇÃO

As doenças de plantas reduzem o rendimento e a qualidade da produção agrícola causando perdas econômicas e comprometendo a segurança alimentar nos níveis doméstico, nacional e global (SAVARY et al., 2019). Desta forma, é fundamental realizar o seu controle quando atinge o limiar de dano econômico. Diversos são os métodos de controle de doenças de plantas utilizados pelos agricultores, sendo que dentre eles o controle biológico é importante nos programas de manejo integrado de pragas e doenças (KOBORI et al., 2015). Com a crescente demanda do mercado exportador por alimentos produzidos com maior qualidade e sustentabilidade (ALVES et al., 2011) e livre de resíduos de pesticidas químicas o controle biológico é a alternativa sustentável (BETTIOL; GHINI, 2003) que oferece os menores riscos (CARVALHO, 2017).

O emprego do controle biológico de pragas e doenças de plantas vem aumentando consideravelmente nos últimos anos. Estima-se que o mercado global de produtos biológicos cresça a uma taxa composta anual de crescimento (CAGR) de 14,7%, saltando de US\$ 4,3 bilhões em 2020 para US\$ 8,5 bilhões em 2025 de acordo com as estimativas de Markets and Markets (2020). Segundo Mascarin et al. (2019), apesar dos recentes avanços tecnológicos, para ampliar a adoção de biopesticidas no Brasil, é necessário melhorias em formulações comerciais, controle de qualidade, sistemas de entrega, investimento em tecnologias de embalagem e extensão de vida útil, além de otimização da produção massal dos bioagentes, incluindo novos e econômicos sistemas de fermentação.

Todas as etapas da cadeia de bioinsumos são importantes e estão interligadas. A produção massal do microrganismo alvo a ser desenvolvido pode ser otimizada a fim de reduzir os custos e diminuir o tempo de fermentação. Outra etapa importante na cadeia de bioinsumos é a formulação. As formulações são necessárias para que o produto final tenha melhor eficiência, estabilidade, segurança e facilidade de aplicação (RHODES, 1993). Os componentes de uma formulação são geralmente o ingrediente ativo, os veículos e os adjuvantes (HYNES; BOYETCHKO, 2006; ASH, 2010).

O ingrediente ativo de produtos biológicos é constituído dos propágulos dos microrganismos, tais como conídios, microescleródios, blastósporos, endósporos ou micélio (HYNES; BOYETCHKO, 2006). Dentre os agentes de controle biológico utilizados, o gênero *Bacillus* abriga várias espécies importantes no controle de doenças, bem como de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RABEE et al., 2019; PACIFICO; ECKSTEIN;

BETTIOL, 2021). *Bacillus* é um gênero de bactérias gram-positivas em formato de bastonetes, geralmente aeróbicas ou anaeróbicas facultativas (LYNGWI; JOSHI, 2014). As bactérias deste gênero formam endósporos, estrutura de resistência que permite a sua permanência no solo por muitos anos até o restabelecimento das condições favoráveis (MADIGAN et al., 2016), bem como sobrevivência nas formulações dos bioagentes.

Dentre as espécies de *Bacillus*, *Bacillus velezensis* é promissora para o biocontrole. Medeiros e Bettiol (2021) observaram que o isolado *Bacillus velezensis* AP-3, além de controlar a murcha de *Fusarium*, se mostrou halotolerante e promoveu o crescimento das plantas de tomate. O mesmo isolado foi eficiente no controle do complexo *Fusarium*-nematoides em algodoeiro (PACIFICO; ECKSTEIN; BETTIOL, 2021), além de controlar outras diversas doenças.

Contudo, há necessidade de desenvolver técnicas para aumentar a produção de endósporos em meio líquido, sendo este o objetivo do presente estudo.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Mercado de produtos biológicos

No ano de 2015 o Brasil usou cerca de 899 milhões de litros de agrotóxicos em produtos formulados nos 71,2 milhões de hectares plantados com 21 culturas (PIGNATI et al., 2017). Assim, o país apresenta um grande mercado para uso de produtos com a finalidade de controlar problemas fitossanitários, entre eles os produtos biológicos, visto a grande área plantada e os desafios enfrentados.

Estima-se, que no Brasil, o mercado de bioprodutos atinja 3,7 bilhões de dólares em 2030, representando um crescimento de 107% em relação ao ano de 2021 (CROPLIFE BRASIL, 2021). Para que esse mercado continue crescendo, os sistemas de produção têm de levar em conta a enorme diversidade climática e edáfica do país, aproveitando a biodiversidade (PARRA, 2014).

O mercado de produtos biológicos é promissor tanto no Brasil quanto em outros países e atende às necessidades do mercado global por ser um método ambientalmente adequado, não poluindo o meio ambiente e não apresenta riscos ao homem e aos animais, além de apresentar menor risco de selecionar patógenos resistentes (JÚNIOR; SANTOS; AUER, 2000). Atualmente, existem registrados no Brasil 263 inseticidas microbiológicos, 79 biofungicidas,

54 bionematicidas, 49 acaricidas microbiológicos e 5 bactericidas microbiológicos (AGROFIT, 2022). Porém, ainda há necessidade de mais opções de produtos microbiológicos com efeitos nematicidas, fungicidas, bactericidas e acaricidas surgindo a necessidade de desenvolver novos produtos, além da inexistência de bioherbicidas no mercado.

2.2. Otimização da produção de agentes de controle biológico

A produção em larga escala dos agentes microbianos de controle é uma importante etapa da cadeia dos bioinsumos. A produção massal dos microrganismos pode ser realizada de três formas: sólida, líquida ou bifásica (MASCARIN et al., 2019). A fermentação em estado sólido é um processo trabalhoso e sujeito à contaminação (ALVES; LOPES, 2008), porém podem ser usados resíduos agroindustriais, subprodutos ou matérias-primas baratas (ZHAO et al., 2021). O processo de fermentação bifásico é uma melhoria do processo de fermentação sólida (MASCARIN et al., 2019). Neste processo, há menores riscos de contaminação, porém o processo pode ser demorado e haver variações no rendimento e dificuldades em secar e colher os esporos dos substratos colonizados antes da formulação final e estabilização (JACKSON, 1997; MASCARIN; ALVES; LOPES, 2010; MASCARIN; JARONSKI, 2016). A fermentação líquida apresenta vantagens de maior controle sobre o processo culminando em menor nível de contaminação, curto tempo de produção e necessidade de menos espaço e mão de obra (SRIRAM; ROOPA; SAVITHA, 2011).

A utilização de meios líquidos com baixo custo e que proporcionem bom rendimento no processo fermentativo do microrganismo alvo é importante para a produção em larga escala. No geral, o processo de otimização da fermentação se dá testando os diferentes fatores que interferem na fermentação, como aeração do meio, relação C/N, pH inicial, quantidade de inóculo inicial, fontes dos nutrientes e o tempo de fermentação. Todos estes fatores isolados ou em conjunto podem interferir na produtividade final de estruturas do microrganismo alvo e no custo de produção. Encontrar o arranjo ideal desses fatores é garantir o sucesso desta importante etapa.

2.3. Formulação de produtos biológicos

Mesmo com a rápida expansão dos bioprotetores existem gargalos a serem sanados, como a vida de prateleira dos produtos (FARIA; WRAIGHT, 2001). As dificuldades enfrentadas nas etapas de multiplicação, armazenamento, comercialização e, principalmente,

no desenvolvimento de formulações estáveis e com vida de prateleira adequada, impactam a oferta e a qualidade desses produtos no mercado. Desenvolver novas formulações que possam manter ou aprimorar a eficiência dos agentes ativos se apresenta como um desafio econômico e tecnológico a ser superado (FARIA et al., 2010).

De acordo com Rhodes (1993), formular é importante para otimizar a eficiência do produto, a estabilidade e a segurança, além de assegurar fácil aplicação no campo. Uma formulação adequada para uso deve ser eficaz, economicamente viável e de fácil aplicação. As formulações podem ser apresentadas em dois grupos, sendo as formulações secas (pós, grânulos, pellets, pós-molháveis e encapsulados) e as formulações líquidas (suspensões, emulsões e encapsulados) (AULD; HETHERINGTON; SMITH, 2003). O principal objetivo da formulação de produtos biológicos é aumentar a vida de prateleira e garantir maior estabilidade. Desta forma, espera-se que os processos e ingredientes da formulação mantenham o produto viável pelo maior tempo possível e permita a rápida dispersão dos agentes biológicos (AULD; HETHERINGTON; SMITH, 2003; HYNES; BOYETCHKO, 2006).

As formulações, além de prolongar a vida de prateleira, podem melhorar a viabilidade após a aplicação, como a proteção à radiação UV-B, flutuações na umidade e na temperatura, lavagem pela chuva e competição com outros microrganismos entre outros (IGNOFFO et al., 1977; DAOUST; PEREIRN, 1986; INGLIS; GOETTEL; JOHNSON, 1993). As características físicas dos produtos formulados também são importantes, pois podem interferir na facilidade de uso e manuseio. Todavia, formulações de biopesticidas precisam apresentar boa dispersão em água, pouca ou nenhuma sedimentação, floculação, formação de espuma ou separação de fases no tanque de pulverização.

2.4. Gênero *Bacillus*

Bacillus pertence à família Bacillaceae do filo Firmicutes e são bactérias gram-positivas que possuem forma de bastonetes, podendo ser aeróbios obrigatórios ou anaeróbios facultativos (AJILOGBA; BABALOLA, 2013). O gênero *Bacillus* possui um grande número de espécies. Uma característica importante desse gênero é a formação de endósporos (Figura 1), estrutura de parede celular multicamadas que garante resistência a fatores ambientes estressantes, como secreção de antibióticos peptídicos, moléculas sinalizadoras peptídicas, enzimas extracelulares e resistência à luz UV, à dessecação e às altas temperaturas (LYNGWI; JOSHI, 2014). De

acordo com Earl, Losick e Kolter (2008), *Bacillus* formam endósporos quando os níveis de nitrogênio, carbono e fósforo estão abaixo do limite ideal para seu crescimento.

Figura 1: Esporos de *Bacillus velezensis* AP-3 em azul e células do mesmo isolado em vermelho visto no microscópio óptico no aumento de 400X.



Fonte: Rosely Nascimento (2022).

As bactérias deste gênero são as mais utilizadas em controle biológico de diversos fitopatógenos, além de seu amplo uso como bioestimulantes de plantas, sendo componente de diversos produtos comerciais (CAWOY et al., 2011; MONNERAT et al., 2020). *Bacillus* têm ocorrência cosmopolita e são encontrados em todas as partes do mundo, crescem em vários substratos como solo, superfície de plantas, rizosfera, grãos armazenados e insetos mortos dentre outros (MONNERAT et al., 2020).

De acordo com Nagórska, Bikowski e Obuchowski (2007), a presença de bactérias nas raízes pode melhorar o crescimento das plantas e controlar doenças através de vários mecanismos como: competição com outros microrganismos que podem causar efeitos negativos nas plantas, indução das respostas de defesa do hospedeiro contra patógenos e aumentar a absorção de certos nutrientes, como nitrogênio e fósforo. De acordo com Allard-Massicotte et al. (2016), essa colonização pode ocorrer em apenas algumas horas após o assentamento das células na raiz da planta.

Diversas espécies de *Bacillus* apresentam potencial como agente de biocontrole. Algumas espécies de *Bacillus* têm sido relatadas como eficientes agentes de biocontrole e promotoras de crescimento de plantas (MEDEIROS; BETTIOL, 2021; BATISTA et al., 2021; PROBANZA et al., 2002), agindo como indutoras de resistência (CHAKRABORTY;

CHAKRABORTY; BASNET, 2006), produtoras de metabólitos secundários com ação inibitória contra patógenos (NAGÓRSKA; BIKOWSKI; OBUCHOWSKI, 2007), solubilizadoras de fósforo e potássio (HAN; SUPANJANI; LEE, 2006; RENSEIGNÉ et al., 2006) e produtoras de moléculas antibacterianas, antifúngicas e nematicidas (PIURI; SANCHEZ-RIVAS; RUZAL, 1998; CHAKRABORTY; CHAKRABORTY; BASNET, 2006; PACIFICO; ECKSTEIN; BETTIOL, 2021) entre outros.

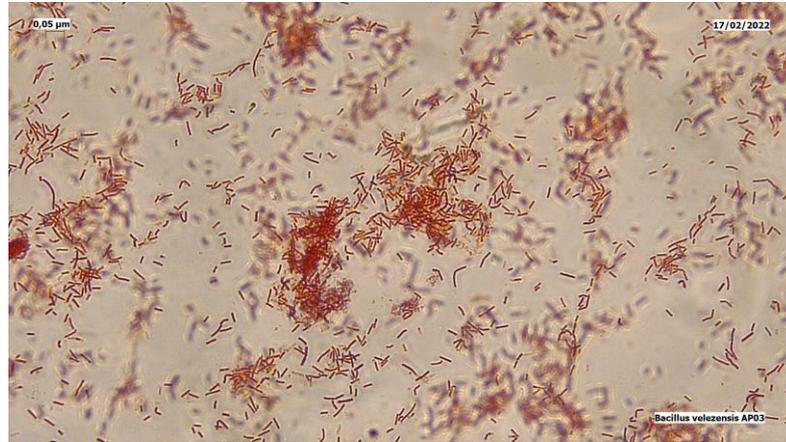
Bacillus velezensis foi classificado como uma nova espécie de *Bacillus* após isolamento de uma cepa retirada do Rio Vélez, em Málaga, sul da Espanha, após a realização da hibridização DNA-DNA confirmar que esta espécie apresentava menos de 20% de hibridização com as outras espécies de *Bacillus*, representando assim, uma nova espécie (RUIZ-GARCIA et al., 2005). A partir de então foram feitas reclassificações de outros *Bacillus* como pertencente a esta espécie. Análises genômicas revelaram que as cepas de *Bacillus velezensis* relatadas como supressoras do crescimento de patógenos e promotoras do crescimento de plantas têm genes específicos relacionados à biossíntese de metabólitos secundários. Mais especificamente, *B. velezensis* exibe uma alta capacidade genética para sintetizar lipopeptídeos cíclicos e policetídeos, além de metabólitos secundários que podem desencadear resistência em plantas (RABBEE et al., 2019), sendo uma espécie promissora para ser utilizada no controle biológico de doenças de plantas (RABBEE et al., 2019).

Apesar da maioria das espécies de *Bacillus* serem benéficas, existem espécies patogênicas para humanos, como a *Bacillus anthracis*, agente causal do antraz, além de que algumas cepas de *Bacillus cereus* podem causar infecções alimentares e algumas doenças sistêmicas, entre outras espécies (EHLING-SCHULZ; LERECLUS; KOEHLER, 2019).

2.5. *Bacillus velezensis* AP-3

O isolado de *Bacillus velezensis* AP-3 (Figura 2) anteriormente identificado como *B. subtilis* é extremamente promissor, tendo em vista os trabalhos desenvolvidos com o mesmo e apresentados na tabela abaixo. De acordo com os trabalhos apresentados na Tabela 1, o isolado é caracterizado como promotor do crescimento vegetal em algumas culturas, age por antibiose e compete por espaço com o patógeno na planta. O isolado se mostrou efetivo no controle de diversas doenças foliares, no tratamento de sementes visando controle de patógenos, no controle de nematoides, na coinoculação em soja, além dos excelentes resultados da ação de seus metabólitos e de ser um produtor de fitohormônios.

Figura 2: Células de *Bacillus velezensis* AP-3 visto no microscópio óptico no aumento de 400X.



Fonte: Da autora (2023).

Tabela 1. Trabalhos publicados comprovando eficácia do isolado de *Bacillus velezensis* AP-3.

Eficiência do isolado	Autores
Os metabólitos do isolado inibiram o crescimento micelial de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e <i>Fusarium oxysporum in vitro</i> , porém não promoveu o crescimento do feijoeiro em condições de casa de vegetação aplicado via sulco de plantio ou nas sementes.	(DURE, 2022).
O isolado ou seus metabólitos proporcionaram incrementos na nodulação da soja cv. BR-16 e BR-37 e incrementou o rendimento da soja no campo.	(ARAÚJO; HUNGRIA, 1999)
Controlou o complexo <i>Fusarium</i> x nematoides em algodoeiro. Os metabólitos do isolado são termoestáveis, pois após autoclavagem continuaram controlando <i>Fusarium in vitro</i> . O isolado também apresentou boa colonização das raízes de algodoeiro.	(PACIFICO; ECKSTEIN; BETTIOL, 2021).
Controlou a ferrugem asiática da soja.	(DORIGHELLO, 2013).

Em teste *in vitro* o isolado inibiu os seguintes fungos patogênicos de sementes de soja: *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum truncatum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina* e *Phomopsis*. Os seus metabólitos incrementaram a produção de pelos radiculares em soja em condições de casa de vegetação. Os hormônios vegetais Ácido Indol Acético (AIA) e Ácido Abscísico (ABA) foram detectados nos metabólitos do isolado. (ARAÚJO; HENNING; HUNGRIA, 2005).

O isolado aumentou o teor de água foliar e a regulação dos estômatos, sem prejudicar as taxas fotossintéticas, além de diminuir as atividades antioxidantes em milho e feijão, podendo ser usado como inoculante para proteção contra estresse hídrico. (LIMA et al., 2019).

O tratamento com *B. subtilis* AP-3 controlou os nematoides de forma semelhante ao tratamento químico com Carbofuran para todas as variáveis nematológicas analisadas em duas variedades de cana de açúcar. (MAZZUCHELLI; ARAÚJO, 2011).

A técnica da bioaugmentação com *B. subtilis* AP-3 não conseguiu incrementar a redução dos teores de extrato etéreo no solo contaminado com diferentes doses de óleo vegetal. (OLIVEIRA; ARAÚJO, 2011).

A pulverização de metabólitos de *B. subtilis* AP-3 nas concentrações de 1000 e 10000 ppm, 24 horas antes da inoculação de uredinósporos de *Hemileia vastatrix*, em plantas de café reduziu a porcentagem de folhas lesionadas, o número de lesões por folhas e o número de lesões por folha lesionada em praticamente 100%. Também o caldo, contendo 5% do resíduo da fermentação glutâmica do melaço, onde *B. subtilis* foi multiplicado por 15 dias, quando pulverizado em mudas de café nas concentrações de 10, 25; (BETTIOL; SAITO; BRANDÃO, 1994).

50 e 100% controlou efetivamente a ferrugem do cafeeiro, quando avaliados os mesmos parâmetros anteriores.

Metabólitos de *B. subtilis* AP-3 na concentração de 1000 ppm inibiram totalmente a germinação de *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus* agente causal da ferrugem em feijoeiro. Já quando pulverizado em folhas de feijão, 24 horas antes da inoculação da ferrugem, os metabólitos na concentração de 10000 ppm teve controle superior a 99%, já as duas diferentes formulações a base do isolado na concentração de 10000 ppm controlou em 74% e 33% a ferrugem do feijoeiro. (BETTIOL; BRANDÃO; SAITO, 1992).

Bacillus velezensis AP-3 inibiu o crescimento micelial e a germinação de esporos de *Fusarium verticillioides in vitro*, promoveu o crescimento de plantas de milho e controlou *F. verticillioides* em sementes de milho em condições de casa de vegetação. (FERREIRA et al., 2021)

O isolado inibiu em 29% o crescimento micelial *in vitro* do antagonista *Pyricularia oryzae*. (BETTIOL; KIMATI, 1989)

O caldo onde *B. subtilis* AP-3 foi cultivado por 10 dias inibiu 54% do crescimento micelial de *Pyricularia oryzae in vitro*, na concentração de 10%, enquanto que na concentração de 20% a inibição foi de 98%. (BETTIOL; KIMATI, 1990)

O isolado de *B. subtilis* AP-3 inibiu em 41% o crescimento micelial *in vitro* de *Cylindrocladium spathulatum*, agente causal da pinta preta em erva mate. (GOMES, 2000)

Bacillus subtilis AP-3 em teste *in vitro* controlou *Puccinia psidii*, agente causal da ferrugem do eucalipto, inibindo em 100% a germinação dos urediniosporos do fungo, tanto com o caldo fermentado com células, caldo autoclavado (SANTOS et al., 1998)

(metabólitos termoestáveis) e com o sobrenadante (todos os metabólitos).

O isolado de *B. subtilis* AP-3 inibiu totalmente a germinação de urediniósporos de *H. vastatrix* quando aplicado em concentração de pelo menos 5×10^7 células mL^{-1} . Quando pulverizado 24 horas antes da inoculação do patógeno foi eficiente em controlar a ferrugem do cafeeiro em discos de folhas e folhas destacadas de cafeeiro cv. Caturra. Em mudas de cafeeiro a redução do número de lesões foi de 67% para o caldo do isolado autoclavado e 89% para o caldo sem autoclavar. (BETTIOL; VARZEA, 1992)

O isolado inibiu totalmente o crescimento micelial de *R. solani*, *S. sclerotiorum*, *Bipolaris sorokiniana* e *P. oryzae*. Para os patógenos: *Alternaria tenuis*, *Macrophomina phaseolina*, *septoria nodorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani* e *Fusarium graminearum*, a inibição foi superior a 83%. Os metabólitos retardaram o desenvolvimento e diminuíram o tamanho das colônias de *Aspergillus* e *Penicillium*. O isolado mostrou-se promissor em inibir os fungos patogênicos associados a sementes de feijão e trigo. (LAZZARETTI; MENTEN; BETTIOL, 1994)

A aplicação de *B. subtilis* AP-3 em suspensão aquosa promoveu o crescimento e a redução da reprodução dos nematoides em cana-de-açúcar. A aplicação de *B. subtilis* multiplicado na vinhaça não proporcionou os benefícios de estímulo ao crescimento e controle da meloidoginose na cana-de-açúcar, encontrados com a aplicação apenas da bactéria no solo. Em meio de cultura à base de vinhaça (25%) *B. subtilis* produziu cerca $1,15 \times 10^9$ UFC mL^{-1} após 5 dias de fermentação. (CARDOZO; ARAÚJO; 2011)

-
- Formulação contendo extrato sólido à base de *B. subtilis* AP-3 mostrou eficiência igual a de Mancozeb no controle da queima das folhas do inhame causada por *Curvularia eragrostidis*. (ANDRADE et al., 1993/1995)
- Bacillus subtilis* AP-3 diminuiu o índice de pinta preta dos frutos cítricos (*Guignardia citricarpa*) em cultivo orgânico de laranja ‘pêra’. (BERNARDO; BETTIOL, 2010)
- Bacillus subtilis* AP-3 apresentou um nível intermediário de controle da podridão pós-colheita em melão ‘Gália’ causada por *Fusarium pallidoroseum* após 8 dias de armazenagem. (TERAO et al., 2010)
- Compostos orgânicos voláteis (COV’s) de *B. subtilis* AP-3 aumentaram a biomassa vegetal (88 e 18% para parte aérea e raízes de plantas de soja, respectivamente) comparado ao controle. Estes COV’S mudaram a arquitetura da raiz da soja, pois aumentou o comprimento, diâmetro, superfície, área e volume, sendo um aspecto interessante ao passo que a arquitetura da raiz pode melhorar a absorção de água e nutrientes do solo. (BAVARESCO et al., 2020)
- A inoculação de *B. subtilis* AP-3 em sementes de *Urochloa brizantha* apresentou melhora no condicionamento fisiológico das sementes. (MANRIQUE et al., 2019)
- Metabólitos concentrados de *B. subtilis* AP-3 reduziram em mais de 90% o número de lesões de *Sphaerotheca fuliginea* (oídio) em folhas de pepino e abobrinha. Produto pó-molhável com 10% de células e 10% de metabólitos concentrados do AP-3 também controlou eficientemente oídio em pepino. (BETTIOL; GARIBALDI; MIGHELI, 1997)
-

Produto pó-molhável formulado à base de células e de metabólitos de *B. subtilis* AP-3 mostrou-se semelhante aos tratamentos com fungicidas recomendados para o controle de *R. solani*, *Aspergillus* sp. e *S. sclerotiorum* em sementes de feijão; *P. oryzae* e *Rhynchospirium sativum* em sementes de arroz; e *Cercospora kikuchii*, *Phomopsis phaseoli* e *Fusarium* spp. em sementes de soja. Para *Dreschlera oryzae* em arroz e *Bipolaris sorokiniana*, *P. oryzae* e *Alternaria tenuis* em sementes de trigo, o tratamento com o produto, embora não tenha se igualado ao fungicida padrão, diferiu estatisticamente do tratamento testemunha. (LAZZARETTI; BETTIOL, 1997)

Lodo de esgoto na concentração de 20% se mostrou satisfatório para a multiplicação de *B. subtilis* AP-3 com produção de $3,52 \times 10^8$ UFC mL⁻¹. O enriquecimento do lodo com peptona e levedura não incrementou no desenvolvimento do isolado. (ARAÚJO; AIRE; FARINA, 2006)

A presença de *B. subtilis* AP-3 reduziu a eclosão de ovos de *Heterodera glycines* estimulados com exsudatos de sementes de soja em condições laboratoriais sob câmara de eclosão. O tratamento de raiz de soja com a bactéria inibiu a migração de juvenis de *H. glycines* para a planta em comparação à raiz não tratada com a bactéria. Formulação ou caldo a base do isolado aplicado no solo ou sementes reduziu as fêmeas na raiz de soja em condições de casa de vegetação. *B. subtilis* interfere no estímulo de exsudatos vegetais para eclosão e orientação prejudicando o desenvolvimento do ciclo de *H. glycines*. (ARAÚJO; SILVA; ARAÚJO, 2002)

Bacillus subtilis AP-3 atua de forma eficaz no controle dos nematoides *Rotylenchulus reniformis* e *Pratylenchus* (HIGAKI, 2012)

brachyurus no cultivo de algodoeiro, tendo equivalência ao nematicida convencional Abamectina.

O tratamento com *B. subtilis* AP-3 foi equivalente ao (MORGADO et al., 2015) tratamento químico no controle de nematoides em cana-de-açúcar. A persistência de supressividade em *Meloidogyne* spp. e *Pratylenchus zae* proporcionado pelo tratamento com *B. subtilis* e carbofuran foi confirmado.

Aplicação de *B. subtilis* AP-3 promoveu o aumento do (BAVARESCO; ARAÚJO, 2017) sistema radicular e reduziu a população de nematoides das galhas em raiz de tomateiro suscetível.

Fonte: Da autora (2023).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Ambiental “Raquel Ghini” da Embrapa Meio Ambiente (22°43’36”S e 47°00’59”W), localizado no Município de Jaguariúna, no Estado de São Paulo.

3.1. Origem do isolado e manutenção da cultura

No estudo foi utilizado o isolado de *Bacillus velezensis* AP-3, isolado de plantas de arroz, como descrito por Bettiol (1988) e identificado como *B. velezensis*, conforme sequenciamento realizado por Pacifico, Eckstein e Bettiol (2021). O inóculo inicial foi obtido a partir da transferência das culturas estoque para placas de Petri (90 x 10 mm) contendo meio nutriente ágar (NA) e incubado por dois dias a 30 ± 2 °C em incubadora do tipo BOD. Para a preservação do material de trabalho, 0,8 mL da suspensão da colônia bacteriana foi colocado em tubos de criopreservação, contendo 0,8 mL de uma solução esterilizada de glicerol a 20% (v/v) e armazenados a -20°C.

3.2. Teste com cinco meios recomendados para *Bacillus*

Em Erlenmeyers de 250 mL com três defletores basais foram adicionados 90 mL dos diferentes meios esterilizados e em seguida transferidos mais 10 mL de pré-cultura contendo de $1 - 4 \times 10^8$ células viáveis mL⁻¹ de *Bacillus* e incubados em Shaker Orbital com temperatura

constante de 28 °C a 200 rpm com fotoperíodo de 12 horas por 72 horas. As composições dos meios de cultivo estudados estão apresentadas na Tabela 2. A pré-cultura foi obtida a partir do crescimento do isolado AP- 3 em meio de cultura Luria Bertani (LB) (5 g de extrato de levedura; 10 g de peptona; 10 g de NaCl e 1000 mL de água destilada) por três dias. Após 72 horas de fermentação foi retirado 1 mL para determinação do número de endósporos e células viáveis que foram expressos em unidades formadoras de colônia (UFC mL⁻¹).

Para determinar o número de células viáveis as amostras foram colocadas em temperatura ambiente por 35 minutos antes do início da análise. Transcorrido esse período, 1 mL de cada Erlenmeyer foi colocado em tubo de ensaio com 9 mL de solução diluente (9 g de NaCl e 1 mL de Tween 80 em 1000 mL de água destilada), posteriormente, esta primeira diluição (10⁻¹) foi levada para o ultrassom sem aquecimento por 5 minutos, logo após, o tubo contendo a amostra foi agitado 3 vezes em vortex e feitas as diluições até 10⁻⁶. Posteriormente, foram transferidos 100 µL da suspensão das diluições 10⁻⁵ e 10⁻⁶, em triplicata, para placas de Petri contendo meio NA. Com auxílio de uma alça de Drigalski foi realizada a uniformização da alíquota na placa aguardando-se 2 minutos para a amostra ser absorvida antes de inverter as placas e incubá-las em BOD a 30 ± 2 °C. Para a contagem de endósporos, os tubos com as diluições a serem plaqueadas (10⁻⁵ e 10⁻⁶) foram tratados termicamente em banho-maria a 80 ± 2 °C por 12 minutos. Após choque térmico em gelo por 10 segundos e o resfriamento das amostras as diluições mencionadas anteriormente foram plaqueadas em meio NA de acordo com o descrito anteriormente. Transcorridas 24 horas de incubação em BOD a 30 ± 2 °C foi realizada a contagem de colônias formadas, sendo as médias submetidas à análise de variância e comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Cada tratamento contou com três repetições. Foram realizadas duas repetições do ensaio no tempo.

3.3. Escolha do volume de meio no Erlenmeyer (50 mL ou 100 mL)

Logo após a obtenção dos dados do ensaio anterior foi realizado um experimento em delineamento inteiramente casualizado combinando os meios 1 ou 4 com os volumes de 50 ou 100 mL avaliando a produção de células totais e endósporos do isolado de *Bacillus velezensis* AP-3. O experimento foi montado com quatro tratamentos e três repetições. Foram realizadas duas repetições no tempo.

O cultivo da pré-cultura foi realizado como descrito anteriormente no item 3.2. O cultivo foi realizado em Erlenmeyers de 250 mL com três defletores basais onde foram adicionados 90

mL ou 45 mL dos meios 1 ou 4 (selecionados anteriormente) esterilizados e em seguida transferidos mais 10 ou 5 mL (10%) da pré-cultura $1 - 4 \times 10^8$ células viáveis de *Bacillus* mL⁻¹ e incubados em Shaker Orbital no escuro, com temperatura constante de 28 ± 2 °C a 250 rpm. Após as 72 horas de fermentação foi retirada uma alíquota de 1 mL para determinação do número de endósporos e células vegetativas que foram expressos em UFC mL⁻¹.

Tabela 2. Composição dos meios líquidos em estudo para otimização da produção de endósporos do isolado de *Bacillus velezensis* AP-3.

Sigla	Tratamentos	Composição
T1	Meio de cultura quimicamente definido para bactérias. Adaptado de Moraes; Capalbo; Moraes (1991)	20 g de glicose; 1 g de KH ₂ PO ₄ ; 0,4 g de MgSO ₄ .7H ₂ O; 0,04 g de CaCl ₂ .2H ₂ O, 0,002 g de FeSO ₄ .7H ₂ O; 0,0004 g ZnSO ₄ .7H ₂ O; 0,0004 g de CuSO ₄ .5H ₂ O; 0,0004 g de MnSO ₄ .H ₂ O; 3 g de (NH ₄)H ₂ PO ₄ ; 4 g de C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .2H ₂ O; 37,76 g de Na ₂ HPO ₄ e 1000 mL de água destilada. pH 7.
T2	Meio Líquido EMBRAPA (MONNERAT et al., 2020)	1 g de extrato de levedura; 1 g de KH ₂ PO ₄ ; 3,75 g de extrato de carne; 6,25 g de peptona; 10 mL de solução de sais minerais (10 g de CaCO ₃ , 10 g de MgSO ₄ .7H ₂ O, 1 g de FeSO ₄ .7H ₂ O, 1 g de MnSO ₄ .H ₂ O, 1 g de ZnSO ₄ .7H ₂ O e 1000 mL de água destilada) e 1000 mL de água destilada. pH 7.
T3	Meio de cultivo de bactérias entomopatogênicas Adaptado de COUCH (2000)	20 g de glicose; 2 g de extrato de levedura; 1 g de KH ₂ PO ₄ ; 1 g de K ₂ HPO ₄ ; 0,02 g de FeSO ₄ .7H ₂ O; 0,3 g de MgSO ₄ .7H ₂ O; 0,02 g de MnSO ₄ .7H ₂ O; 2 g de ZnSO ₄ .7H ₂ O; 2 g de (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0,005 g de CuSO ₄ .5H ₂ O; 1,25 g de CaCO ₃ ; 50 mg de C ₁₀ H ₁₈ N ₂ Na ₂ O ₁₀ e 1000 mL de água destilada. pH 7.

T4	Meio líquido semi-definido completo Adaptado de SLININGER et al. (2007)	2 g K ₂ HPO ₄ ; 2 g KH ₂ PO ₄ ; 0,1 g de MgSO ₄ .7H ₂ O; 10 mg NaCl; 10 mg FeSO ₄ .7H ₂ O; 4,4 mg ZnSO ₄ .7H ₂ O; 11 mg CaCl ₂ .2H ₂ O; 10 mg MnCl ₂ .4H ₂ O; 2 mg (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ (4H ₂ O); 2,4 mg H ₃ BO ₃ ; 50 mg de C ₁₀ H ₁₈ N ₂ Na ₂ O ₁₀ . Fatores de crescimento: 0,5 mg de cada vitamina: tiamina, riboflavina, pantotenato de cálcio, niacina, piridoxamina, ácido tióico e 0,05 mg de cada: ácido fólico, biotina e vitamina B12. 40 g de glicose e 60 g de caseína ácida hidrolisado e 1000 mL de água destilada. pH 7.
T5	DSM – Meio Difco para esporulação (NICHOLSON; SETLOW, 1990)	3 g de extrato de carne; 5 g de peptona; 1 g de KCl; 0,25 g de MgSO ₄ ; 1000 mL de água destilada; 1 mL de Ca(NO ₃) ₂ 1 M; 1 mL de MnCl ₂ 10 mM e 1 mL de FeSO ₄ 1 mM. pH 7.

Fonte: Da autora (2023).

3.4. Otimização das condições físicas de fermentação

As condições físicas como aeração, temperatura, densidade de inóculo e sonicação durante o início da fermentação podem interferir no processo fermentativo dos microrganismos e foram avaliadas algumas condições físicas de fermentação visando maior produção de endósporos pelo isolado de *B. velezensis* AP-3.

3.4.1. Efeito da aeração por meio da agitação a 150, 200 e 250 rotações por minuto

Após a seleção do meio de cultura que apresentou maior produção de endósporos as condições de aeração, por meio da agitação - velocidade de rotações por minuto do Shaker - foram avaliadas para verificar a interferência na formação de endósporos. Para isso foi montado experimento em delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos e três repetições, repetido duas vezes no tempo, sendo os tratamentos estudados: 150, 200 e 250 rpm. Cada tratamento foi representado por um Shaker Orbital com as rotações pré-estabelecidas,

temperatura de 28 °C, no escuro, com período de fermentação de 72 horas. A pré-cultura foi cultivada por um dia a 28 °C em Shaker Orbital com 250 rpm e escuro utilizando o meio GPL (10 g de glicose, 10 g de peptona, 5 g de extrato de levedura, 3 g de NaCl, 1 g de KH₂PO₄, 0,5 g de MgSO₄*7H₂O, 1000 mL de água e pH ajustado para 6).

O experimento foi realizado em Erlenmeyers de 250 mL contendo 40,8 mL do meio de cultura quimicamente definido para bactérias (MORAES; CAPALBO; MORAES, 1991) e, após esterilizado em autoclave por 20 minutos a 121 °C, foi acrescido de 4,2 mL de glicose (240 g de glicose em 1000 mL de água destilada e autoclavada) e 5 mL (10%) de pré-cultura contendo de $1 - 4 \times 10^8$ células viáveis de *Bacillus* mL⁻¹. Os Erlenmeyers foram mantidos nos Shakers conforme relatado acima. Após 72 horas foi retirada uma alíquota de 1 mL de cada Erlenmeyer para a determinação das UFC mL⁻¹.

3.4.2. Efeito da temperatura de incubação a 22, 28 e 34 °C na produção de endósporos

Para este ensaio foi utilizado o meio de cultura quimicamente definido para bactérias (MORAES; CAPALBO; MORAES, 1991). Este experimento foi reproduzido em delineamento inteiramente casualizado, sendo avaliadas as temperaturas de 22, 28 e 34 °C. Para tanto, foram utilizados três Shakers Orbital nas diferentes temperaturas a 250 rpm sem fotoperíodo. Cada tratamento contou com três repetições e o ensaio foi repetido duas vezes no tempo. Para este ensaio, a pré-cultura foi cultivada conforme especificado no item 3.4.1. Em Erlenmeyers de 250 mL com defletores basais foram acrescentados 40,8 mL do meio de cultura; 4,2 mL de glicose (240 g de glicose em 1000 mL de água destilada e autoclavada) e 5 mL de pré-cultura (10%). Após 72 horas foi retirada uma alíquota de 1 mL para a determinação do número das UFC mL⁻¹.

3.4.3. Efeito do estresse de oxigênio durante o processo fermentativo na produção de endósporos

Neste teste foi utilizado o meio de cultura quimicamente definido para bactérias (MORAES; CAPALBO; MORAES, 1991), onde foi avaliada a influência do estresse por falta de oxigênio na produção de endósporos por *B. velezensis* AP-3. O delineamento foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos e três repetições, sendo o ensaio repetido duas vezes no tempo. A pré-cultura foi cultivada como descrito no item 3.4.1.

Em Erlenmeyers de 250 mL com defletores basais foram acrescentados 40,8 mL do meio de cultura; 4,2 mL de glicose (240 g de glicose em 1000 mL de água destilada e autoclavada) e 5 mL (10%) de pré-cultura contendo de $1 - 4 \times 10^8$ células viáveis de *Bacillus* mL⁻¹. Os tratamentos foram a fermentação por 72 horas sem interrupção e os outros tratamentos foram a retirada dos Erlenmeyers da rotação do Shaker após 1 dia de fermentação por 8, 16 ou 24 horas e mantidos estáticos dentro do Shaker para continuarem nas mesmas condições anteriores, exceto a aeração. Após este período os Erlenmeyers foram recolocados no Shaker até completarem as 72 horas desde o início do processo. Em seguida foi retirada uma alíquota de 1 mL para a determinação do número de UFC mL⁻¹.

3.4.4. Efeito da sonicação em banho ultrassom na produção de endósporos

Nesse estudo foi avaliada a influência do estresse por raios ultrassom na produção de endósporos por *B. velezensis* AP-3. Neste estudo foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e três repetições, repetido duas vezes no tempo. A pré-cultura foi cultivada conforme expresso no item 3.4.1. Para a realização do estudo, em Erlenmeyers de 250 mL com defletores basais foram acrescentados 45,55 mL do meio quimicamente definido para bactérias (MORAES; CAPALBO; MORAES, 1991); 4,2 mL de glicose (240 g de glicose em 1000 mL de água destilada e autoclavada) e 250 µL (0,5%) de inóculo. Os Erlenmeyers foram incubados em Shaker Orbital com 250 rpm, 34 °C, no escuro. Os tratamentos foram a fermentação por 72 horas sem interrupção e os outros tratamentos foram submetidos à exposição dos Erlenmeyers em banho ultrassom a 40 Hertz por 10, 20 ou 30 minutos, após 4 horas de fermentação. Transcorrido os períodos de exposição os Erlenmeyers foram recolocados no Shaker até completarem 72 horas de fermentação. Em seguida foi retirada uma alíquota de 1 mL para determinar o número de UFC mL⁻¹.

3.4.5. Efeito do volume de pré-cultura na produção de endósporos

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com três repetições, sendo estudadas as concentrações de 0,5%; 1%; 1,5% e 10% de pré-cultura contendo de $1 - 4 \times 10^8$ células viáveis de *Bacillus* mL⁻¹. O experimento foi repetido duas vezes no tempo. A pré-cultura foi cultivada conforme descrito no item 3.4.1. Em Erlenmeyers de 250 mL com defletores basais foram acrescentados 45,55 mL; 45,30 mL; 45,05 mL ou 40,8 mL do meio de cultura quimicamente definido para bactérias (MORAES; CAPALBO; MORAES, 1991), 4,2

mL de glicose (240 g de glicose em 1000 mL de água destilada e autoclavada) e os diferentes volumes de pré cultura. Os Erlenmeyers foram incubados em Shaker Orbital com 250 rpm, 34 °C, no escuro por 72 horas. Após incubação foi retirada uma alíquota de 1 mL para determinar o número de UFC mL⁻¹.

3.5. Otimização das condições nutricionais

Após a otimização das condições físicas da fermentação (agitação, temperatura, estresse pela falta de oxigênio, estresse com banho ultrassom e densidade de pré-cultura) foi retomado o processo de otimização da fermentação com enfoque na demanda nutricional do isolado visando a obtenção de opções de meio de cultivo baratos e com produção de, pelo menos, 1×10^9 UFC mL⁻¹.

3.5.1. Avaliação de meios de cultivo de menor custo na produção de endósporos

Quatro meios de cultura foram avaliados neste ensaio conforme apresentados na Tabela 3. O experimento foi repetido duas vezes no tempo e ambas com três repetições. Todos os meios foram preparados e autoclavados por 20 minutos a 120 °C e, posteriormente, acrescidos da fonte de carbono (sacarose, açúcar cristal ou glicose, conforme explicitado na Tabela 3). O tratamento 5 não foi autoclavado, pois a desinfestação acompanhou o utilizado por produtores *on farm*.

Para o preparo do tratamento 5 foram seguidas as condições do produtor, onde o meio foi preparado em dois béqueres, sendo que em um foi colocado 100 mL de água, o açúcar e 0,015g l⁻¹ de hipoclorito de cálcio e a dissolução foi realizada com o auxílio de imã dentro da câmara de fluxo. Em outro béquer foi colocado o restante da água e os demais ingredientes, após dissolução, o primeiro béquer foi acrescido ao segundo e ficou em agitação por 3 horas. Após este período o pH do meio foi calibrado para 7 com carbonato de sódio. Após ser transferido 49,75 mL do meio para cada Erlenmeyer de 250 mL foram acrescidos 250 µL de pré-cultura e os Erlenmeyers foram incubados em Shaker Orbital junto com os outros tratamentos.

Tabela 3. Composição de meios líquidos com menor custo para otimização da produção de endósporos do isolado de *Bacillus velezensis* AP-3.

Sigla	Tratamentos	Composição
T1	Meio de cultura quimicamente definido para bactérias. Adaptado de Moraes; Capalbo; Moraes (1991).	20 g de glicose; 1 g de KH_2PO_4 ; 0,4 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,04 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,002 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,0004 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,0004 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,0004 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 3 g de $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$; 4 g de $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 37,76 g de Na_2HPO_4 e 1000 mL de água destilada. pH 7.
T2	Meio utilizado por agricultor	10 g de açúcar, 4 g de proteína isolada de soja (90% de proteína bruta), 6 g de levedura Hilyses [®] (6% de N e com Tiamina B1), 0,6 g de Sulfato de Magnésio (9% de Mg e 13% de S), 1 g de monofosfato de potássio (22% de P e 28% de K), 2 g de NaCl (39% de Na e 41% de Cl), 1 g de Nitrato de Cálcio (14,5% de N – 1,5% de NH_4 e 13% de NO_3 e 19% de Ca), 0,7 g de Carbonato de cálcio (cal de pintura), 0,2 a 0,5 g de Carbonato de sódio (23% de Na), 0,7 mL de anti espumante siliconado, 0,01 g de Sulfato de Zn (20% de Zn), 0,02 g de Sulfato de manganês (31% de Mn), 0,04 g de Sulfato de Ferro (26% de Fe), 0,005 g de sulfato de Cobalto (20% de Co), 0,005 g de sulfato de Cu (25% de Cu), 1000 mL de H_2O destilada.
T3	Meio comercial para produção <i>on farm</i> de bactérias	10 g do meio comercial, 10 g de sacarose, 1000 mL de H_2O destilada.

	(BAC IN [®] da Top Bio)	
T4	Meio melaço + farelo de algodão desenvolvido por Dure (2022).	20 g de melaço; 10 g de farelo de algodão (Pharmamedia) (49,3% de carbono e 9,92% de nitrogênio); 1000 mL de H ₂ O destilada.
T5	Meio utilizado por agricultor sem autoclavar	Meio utilizado por agricultor mais 0,015 g de hipoclorito de cálcio.

Fonte: Da autora (2023).

3.5.2. Substituição da fonte de carbono no meio quimicamente definido para bactérias para a produção de endósporos

Neste ensaio foi avaliado o uso de açúcar cristal em comparação à glicose (padrão utilizado no meio de cultura) como fonte de carbono do meio quimicamente definido para bactérias (MORAES; CAPALBO; MORAES, 1991) na produção de endósporos pelo isolado de *Bacillus*. O estudo foi realizado com a finalidade de diminuição dos custos. Os cálculos foram realizados tendo como base a porcentagem de carbono presente na glicose e no açúcar cristal de uso caseiro. Este experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, sendo avaliado os dois meios de cultura apresentados na Tabela 4. Para tanto, cada tratamento contou com três repetições e o ensaio foi repetido duas vezes no tempo. Para este ensaio, a pré-cultura foi cultivada conforme especificado no item 3.4.1. Em Erlenmeyers de 250 mL com defletores basais foram acrescentados 45,55 mL ou 44,75 mL do meio de cultura; 4,2 mL de glicose (240 g de glicose em 1000 mL de água destilada e autoclavada) ou 5 mL de açúcar (190 g de açúcar cristal em 1000 mL de água destilada autoclavada) e 0,5% de pré-cultura e incubados em Shaker Orbital a 250 rpm, temperatura de 34°C, no escuro. Após 72 horas foi retirada uma alíquota de 1 mL para a determinação do número de endósporos em UFC mL⁻¹.

Tabela 4. Composição do meio líquido quimicamente definido para bactérias de Moraes, Capalbo e Moraes (1991) e do mesmo substituindo a glicose por açúcar cristal para otimização da produção de endósporos do isolado de *Bacillus velezensis* AP-3.

Siglas	Tratamentos	Composição
T1	Meio de cultura quimicamente definido para bactérias	20 g de glicose; 1 g de KH_2PO_4 ; 0,4 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,04 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,002 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,0004 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,0004 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,0004 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 3 g de $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$; 4 g de $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 37,76 g de Na_2HPO_4 e 1000 mL de água destilada. pH 7.
T2	Meio de cultura quimicamente definido para bactérias com a substituição da glicose por açúcar cristal	19 g de açúcar cristal em substituição à glicose e mantendo os demais componentes semelhantes ao T1 desta tabela. pH 7.

Fonte: Da autora (2023).

3.5.3. Substituição da fonte de nitrogênio no meio melaço + farelo de algodão na produção de endósporos

Neste ensaio foi avaliada a mistura da proteína isolada de soja e do extrato de levedura hilyses[®] como substitutos para o farelo de algodão (Pharmamedia) no meio de Dure (2022) (Tabela 5). Este experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, sendo avaliado os dois meios de cultura apresentados na Tabela 5. Para tanto, cada tratamento contou com três repetições e o ensaio foi repetido duas vezes no tempo. Para este ensaio, a pré-cultura foi cultivada conforme especificado no item 3.4.1. Para o ensaio, em Erlenmeyers de 250 mL com defletores basais foram acrescentados 49,75 mL dos diferentes meios de cultura e 0,5% de pré-cultura e incubados em Shaker Orbital a 250 rpm, temperatura de 34°C, no escuro. Após 72 horas foi retirada uma alíquota de 1 mL para a determinação do número de endósporos em UFC mL^{-1} .

Tabela 5. Composição do meio melão + farelo de algodão de Dure (2022) e do meio melão + proteína isolada de soja + levedura hilyses[®] para otimização da produção de endósporos do isolado de *Bacillus velezensis* AP-3.

Siglas	Tratamentos	Composição
T1	Meio melão + farelo de algodão (DURE, 2022)	20 g de melão, 10 g de farelo de algodão (Pharmamedia) e 1000 mL de água destilada. pH 7.
T2	Meio Melão + proteína isolada de soja + levedura hilyses [®]	20 g de melão, 4 g de proteína isolada de soja (90% de proteínas), 6 g de levedura hilyses [®] e 1000 mL de água destilada. pH 7.

Fonte: Da autora (2023).

3.5.4. Substituição da fonte de nitrogênio nos melhores meios testados com hidrolisado proteico para a produção de endósporos

Neste ensaio foi avaliada a substituição da fonte de nitrogênio nos meios que apresentaram maior produção de endósporos. A fonte de nitrogênio de cada um dos meios foi substituída por hidrolisado proteico (75% de proteína bruta). No meio de cultura quimicamente definido para bactérias além da substituição da fonte de nitrogênio, o valor de nitrogênio total utilizado foi o dobro do valor utilizado no meio original (Tabela 6). Este experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, sendo avaliado os três meios de cultura apresentados na Tabela 6. Para tanto, cada tratamento contou com três repetições e o ensaio foi repetido duas vezes no tempo. Para este ensaio, a pré-cultura foi cultivada conforme especificado no item 3.4.1. Para o ensaio, em Erlenmeyers de 250 mL com defletores basais foram acrescentados os diferentes meios de cultura, suas respectivas fontes de carbono e 0,5% de pré-cultura e incubados em Shaker Orbital a 250 rpm, temperatura de 34°C, no escuro. Após 72 horas foi retirada uma alíquota de 1 mL para a determinação do número de endósporos em UFC mL⁻¹.

Tabela 6. Composição dos meios líquidos que tiveram as maiores produções de endósporos substituindo a fonte de nitrogênio original do meio por hidrolisado proteico.

Siglas	Tratamentos	Composição
T1	Meio melão + Hidrolisado proteico	20 g de melão, 10 g de hidrolisado proteico (75% de proteínas) e 1000 mL de água destilada. Ajustar pH para 7.
T2	Meio de cultura quimicamente definido para bactérias + sacarose + Hidrolisado Proteico	19 g de açúcar; 1 g de KH_2PO_4 ; 0,4 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,04 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,002 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,0004 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,0004 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,0004 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 8,33 g de hidrolisado proteico (75% de proteínas); 4 g de $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 37,76 g de Na_2HPO_4 e 1000 mL de água destilada. Ajustar pH para 7.
T3	Meio utilizado por agricultor + HP	10 g de açúcar, 8,33 g de hidrolisado proteico (75% de proteínas), 0,6 g de Sulfato de Magnésio (9% de Mg e 13% de S), 1 g de monofosfato de potássio (22% de P e 28% de K), 2 g de NaCl (39% de Na e 41% de Cl), 1 g de Nitrato de Cálcio (14,5% de N – 1,5% de NH_4 e 13% de NO_3 e 19% de Ca), 0,7 g de Carbonato de cálcio (cal de pintura), 0,2 a 0,5 g de Carbonato de sódio (23% de sódio), 0,7 mL de anti espumante siliconado, 0,01 g de Sulfato de Zn (20% de Zn), 0,02 g de Sulfato de manganês (31% de Mn), 0,04 g de Sulfato de Ferro (26% de Fe), 0,005 g de sulfato de Cobalto (20% de Cobalto), 0,005 g de sulfato de Cu (25% de Cu), 1000 mL de H_2O destilada.

3.6. Cinética de crescimento do isolado de *Bacillus velezensis* AP-3

Neste ensaio foi avaliada a curva de crescimento do isolado de *B. velezensis* por cinco dias em dois meios selecionados (Meio melaço + farelo de algodão e meio quimicamente definido para bactérias + açúcar + hidrolisado proteico). O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, cada tratamento contou com três repetições e o ensaio foi repetido duas vezes no tempo. Para este ensaio, a pré-cultura foi cultivada conforme especificado no item 3.4.1. Para o ensaio, em Erlenmeyers de 250 mL com defletores basais foram acrescentados os diferentes meios de cultura, suas respectivas fontes de carbono e 0,5% de pré-cultura e incubados em Shaker Orbital a 250 rpm, temperatura de 34°C, no escuro. A cada 24 horas foi retirada uma alíquota de 1 mL para a determinação do número de células totais e endósporos em UFC mL⁻¹ e determinação do pH.

3.7. Formulação do agente de biocontrole em pó-molhável (WP)

Ao meio quimicamente definido para bactérias (MORAES; CAPALBO; MORAES, 1991) fermentado com o isolado de *B. velezensis* AP-3, conforme descrito no item 3.4.2. foram misturados fécula de batata e amido solúvel na proporção 1:1. A mistura foi colocada em bandejas em uma câmara de secagem. As umidades das formulações foram de 12% para fécula de batata e 9% para amido solúvel após uma secagem lenta por 7 dias. Após a secagem, os substratos colonizados foram misturados com 5% de agente dispersante (lecitina de soja). Em seguida as misturas foram peneiradas e os pó-molháveis obtidos foram armazenados em tubos de criopreservação e acondicionados em sacos escuros em temperatura ambiente e em BOD a 40 °C para avaliar a vida de prateleira da formulação, bem como a sua suspensibilidade.

A viabilidade dos endósporos das formulações foi avaliada no tempo 0 (logo após a formulação) e mensalmente. Para essa análise foram coletadas amostras de 1 g dos produtos formulados e determinados os números de UFC g⁻¹, em triplicata, de acordo com o descrito no item 3.2.

O teste de suspensibilidade das formulações foi realizado de acordo com a norma ABNT NBR 13313, na qual 2,5 g da amostra foram dispersos em 100 mL de água dura (20 ppm de carbonato de cálcio) a 30 ± 2 °C. Após a homogeneização, a suspensão foi transferida para uma proveta de 250 mL e completado o volume com água dura. Na sequência a proveta foi tampada e invertida a 180° por 30 vezes durante 90 segundos, e mantida em repouso por 30 minutos.

Posteriormente, por meio de vácuo, a suspensão foi aspirada até a marca de 25 mL, sendo esse remanescente transferido para uma placa de Petri, previamente pesada. A placa de petri com o remanescente foi levada a estufa a 60 ± 2 °C até peso constante. A suspensão foi calculada pela diferença do peso do resíduo e da amostra inicial. Foram utilizados 2 tratamentos (Amido solúvel e Fécula de batata) e 6 repetições para cada tratamento.

3.8. Análise dos dados

Todos os dados obtidos foram submetidos ao teste de Shapiro Wilk para avaliar quanto à normalidade dos resíduos e ao teste de Bartlett para avaliar quanto a homogeneidade de variâncias. Os dados foram submetidos a análise de variância de médias (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a $P < 0,05$. As análises foram realizadas no ambiente estatístico RStudio (<https://cran.r-project.org/>).

4. RESULTADOS

4.1. Teste com cinco meios recomendados para *Bacillus*

As produções de endósporos e células vegetativas do isolado de *B. velezensis* AP-3 em unidades formadoras de colônias/mL são apresentadas na Tabela 7. Dentre os meios líquidos utilizados, o T1 diferiu estatisticamente de todos os outros apresentando a maior produção de endósporos, com produção de $2,83 \times 10^8$ UFC mL⁻¹. O T2 também diferiu estatisticamente de todos os outros, apresentando o menor rendimento na contagem de endósporos, enquanto os demais meios de cultura utilizados apresentaram valores medianos para a variável endósporos (Tabela 7). Com relação às células vegetativas o T2 novamente apresentou a menor média de produção como a de endósporos. Os meios T1, T3 e T5 foram os que apresentaram a maior produção de células vegetativas (Tabela 7).

4.2. Escolha do volume de meio no Erlenmeyer (50 ou 100 mL)

Com relação aos dois diferentes meios (Meio 1 referente ao T1 e o Meio 4 referentes ao T4 do experimento anterior) e aos dois diferentes volumes utilizados (50 ou 100 mL) não foram observadas diferenças estatísticas. Porém, a condição T1 foi selecionada para prosseguir os experimentos, pois apresentou a maior média (Tabela 8).

Tabela 7 – Produção de endósporos e células vegetativas totais de *Bacillus velezensis* AP-3 expressos em unidades formadoras de colônias por mL (UFC mL⁻¹) em diferentes meios de cultura sob fermentação líquida.

Sigla	Tratamento	Endósporos (UFC mL⁻¹)	Células Totais (UFC mL⁻¹)
T1	Meio de cultura quimicamente definido para bactérias	2,83x10 ⁸ a	2,56x10 ⁸ a
T2	Meio Líquido Embrapa	3,10x10 ⁶ c	1,99x10 ⁶ c
T3	Meio de cultivo de bactérias entomopatogênicas	2,02x10 ⁸ b	2,04x10 ⁸ a
T4	Meio líquido semi-definido completo	1,87x10 ⁸ b	2,23x10 ⁸ a
T5	DSM	1,76x10 ⁸ b	8,91x10 ⁷ b
CV		21,71%	27,4%

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível 5% de probabilidade. **Fonte:** Da autora (2023).

Tabela 8 – Produção de endósporos de *Bacillus velezensis* AP-3 expressos em unidades formadoras de colônias por mL (UFC mL⁻¹) em diferentes meios de cultura e diferentes volumes sob fermentação líquida.

Sigla	Tratamento	UFC mL⁻¹
T1	Meio 1 (Meio de cultura quimicamente definido para bactérias) / 50mL	3,48x10 ⁸ a
T2	Meio 1 (Meio de cultura quimicamente definido para bactérias) / 100mL	2,32x10 ⁸ a
T3	Meio 4 (Meio líquido semi- definido completo) / 50mL	2,31x10 ⁸ a
T4	Meio 4 (Meio líquido semi- definido completo) / 100mL	1,68x10 ⁸ a
CV		53,34%

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível 5% de probabilidade. **Fonte:** Da autora (2023).

4.3. Otimização das condições físicas da fermentação

Entre as condições físicas de fermentação testadas: rotações por minuto, temperatura, manter os Erlenmeyers estacionários após 1 dia de fermentação, a sonicação em banho ultrassom após 4 horas do início da fermentação e o volume de pré-cultura, o fator que mais influenciou na produção de endósporos pela bactéria foi a temperatura (Tabelas 9, 10 e 11).

4.3.1. Efeito da aeração por meio da agitação a 150, 200 e 250 rotações por minuto

Não houve diferença entre as rotações avaliadas, inferindo dizer que a rotação de 150, 200 ou 250 rpm não influencia na produção de endósporos pelo isolado AP-3 (Tabela 9).

Tabela 9 – Produção de endósporos de *Bacillus velezensis* AP-3 expressos em unidades formadoras de colônias por mL (UFC mL⁻¹) sob diferentes condições de agitação (150 rpm, 200 rpm e 250 rpm) sob fermentação líquida no meio de cultura quimicamente definido para bactérias (MORAES; CAPALBO; MORAES, 1991).

Tratamento	UFC mL ⁻¹
150 rpm	3,39x10 ⁸ a
200 rpm	3,53x10 ⁸ a
250 rpm	3,80x10 ⁸ a
CV	47,75%

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível 5% de probabilidade. **Fonte:** Da autora (2023).

4.3.2. Efeito da temperatura de incubação a 22, 28 e 34 °C na produção de endósporos

A temperatura é um fator que influencia na produção de endósporos do isolado AP-3 de *Bacillus* (Tabela 10). Na temperatura de 22 °C foi observada a menor produção de endósporos (4,17x10⁷ UFC mL⁻¹). Por outro lado, a 34°C, a maior temperatura avaliada, foi observada a maior produção de endósporos (7,30x10⁸ UFC mL⁻¹) e 28 °C resulta em produção intermediária (2,43x10⁸ UFC mL⁻¹).

Tabela 10 – Produção de endósporos de *Bacillus velezensis* AP-3 expressos em unidades formadoras de colônias por mL (UFC mL⁻¹) sob diferentes temperaturas (22 °C, 28 °C e 34 °C) sob fermentação líquida no meio de cultura quimicamente definido para bactérias (MORAES; CAPALBO; MORAES, 1991).

Tratamento	UFC mL ⁻¹
22 °C	4,17x10 ⁷ c
28 °C	2,43x10 ⁸ b
34 °C	7,30x10 ⁸ a
CV	30,19%

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível 5% de probabilidade. **Fonte:** Da autora (2023).

4.3.3. Efeito do estresse de oxigênio durante o processo fermentativo na produção de endósporos

Com relação ao estresse de oxigênio, avaliado mantendo os Erlenmeyers em repouso por 8, 16 ou 24 h após 1 dia do início da fermentação, não houve diferença estatística (Tabela 11).

Tabela 11 – Produção de endósporos de *Bacillus velezensis* AP-3 expressos em unidades formadoras de colônias por mL (UFC mL⁻¹) sob estresse de aeração de 8, 16 ou 24 h após um dia de fermentação no meio de cultura quimicamente definido para bactérias (MORAES; CAPALBO; MORAES, 1991).

Tratamento	UFC mL ⁻¹
Testemunha (em agitação contínua por 72 horas)	6,97x10 ⁸ a
8 horas estacionário	6,77x10 ⁸ a
16 horas estacionário	3,76x10 ⁸ a
24 horas estacionário	5,12x10 ⁸ a
CV	35,36%

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível 5% de probabilidade. **Fonte:** Da autora (2023).

4.3.4. Efeito da sonicação em banho ultrassom na produção de endósporos

A sonicação por 10, 20 ou 30 minutos após 4 horas do início da fermentação não interferiu estatisticamente no número de unidades formadoras de colônias (UFC mL⁻¹) de endósporos pelo isolado de *Bacillus* (Tabela 12).

Tabela 12 – Produção de endósporos de *Bacillus velezensis* AP-3 expressos em unidades formadoras de colônias por mL (UFC mL⁻¹) sob estresse com ondas ultrassônicas por 10, 20 ou trinta minutos após 4 horas do início da fermentação no meio de cultura quimicamente definido para bactérias (MORAES; CAPALBO; MORAES, 1991).

Tratamento	UFC mL⁻¹
Testemunha (continuou no Shaker)	7,52x10 ⁸ a
10 min em banho ultrassom	7,05x10 ⁸ a
20 min em banho ultrassom	6,62x10 ⁸ a
30 min em banho ultrassom	7,18x10 ⁸ a
CV	10,51%

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível 5% de probabilidade. **Fonte:** Da autora (2023).

4.3.5. Efeito do volume de pré-cultura na produção de endósporos

Não houve diferença estatística entre os diferentes volumes de pré-cultura (0,5%; 1%; 1,5% e 10%), o que é algo muito positivo, tendo em vista que pode-se usar 0,5% de inóculo, gastando menor volume da pré-cultura produzindo a mesma quantidade de endósporos ao final do processo fermentativo (Tabela 13).

Tabela 13 – Produção de endósporos de *Bacillus velezensis* AP-3 expressos em unidades formadoras de colônias por mL (UFC mL⁻¹) em diferentes volumes de pré-cultura (0,5%; 1%; 1,5% e 10%) sob fermentação líquida no meio de cultura quimicamente definido para bactérias (MORAES; CAPALBO; MORAES, 1991).

Tratamento	UFC mL⁻¹
0,5%	7,19x10 ⁸ a
1%	7,13x10 ⁸ a
1,5%	7,02x10 ⁸ a
10%	6,93x10 ⁸ a
CV	11,91%

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível 5% de probabilidade. **Fonte:** Da autora (2023).

4.4. Otimização das condições nutricionais

Testando diferentes meios indicados para a produção de *Bacillus* e substituindo alguns ingredientes com os objetivos de aumentar a produção de esporos e reduzir os custos, foi possível obter alguns meios de cultura que propiciaram a produção de endósporos de ao menos 1×10^9 UFC mL⁻¹.

4.4.1. Avaliação de meios de cultivo de menor custo na produção de endósporos

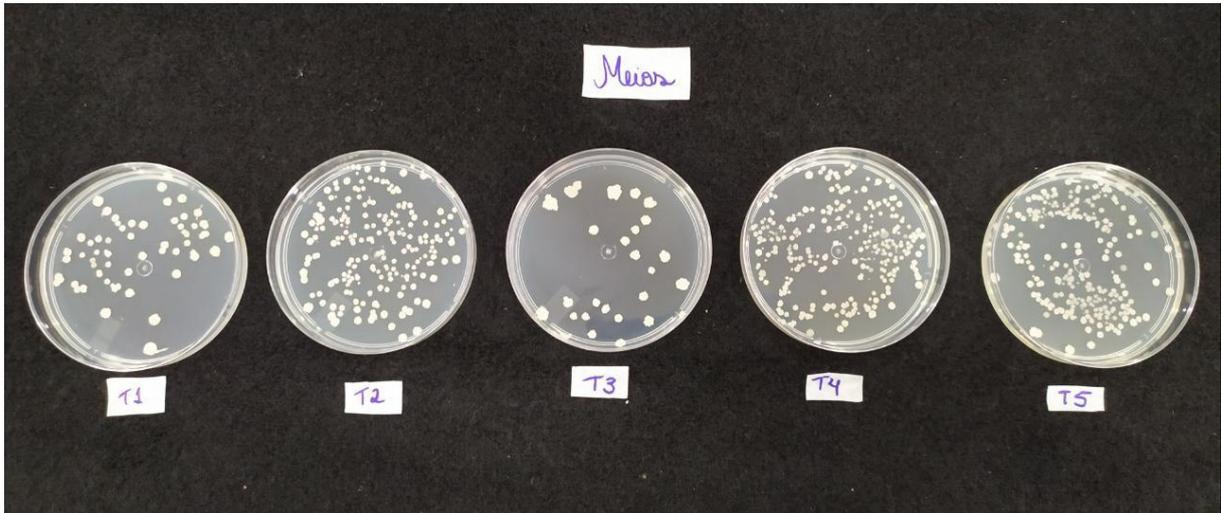
O meio melação + farelo de algodão (Pharmamedia) e o meio utilizado por agricultor autoclavado ou sem autoclavar não diferiram estatisticamente entre si na produção de endósporos, sendo que as maiores médias de produção de endósporos neste ensaio foram de $2,60 \times 10^9$; $2,18 \times 10^9$ e $2,34 \times 10^9$, respectivamente, as quais diferiram estatisticamente dos demais tratamentos (Tabela 14). Entretanto, o meio de cultura quimicamente definido para bactérias não diferiu estatisticamente do meio comercial BAC IN[®] da empresa Top Bio, com médias de $6,59 \times 10^8$ e $2,61 \times 10^8$, respectivamente.

Tabela 14 – Produção de endósporos de *Bacillus velezensis* AP-3 expressos em Unidades formadoras de colônias por mL (UFC mL⁻¹) em diferentes meios de cultura sob fermentação líquida.

Sigla	Tratamento	UFC mL ⁻¹
T1	Meio de cultura quimicamente definido para bactérias	$6,59 \times 10^8$ b
T2	Meio utilizado pelo agricultor autoclavado	$2,18 \times 10^9$ a
T3	Meio comercial BAC IN [®]	$2,61 \times 10^8$ b
T4	Meio melação + farelo de algodão	$2,60 \times 10^9$ a
T5	Meio utilizado pelo agricultor sem autoclavar	$2,34 \times 10^9$ a
CV		19,92%

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível 5% de probabilidade. **Fonte:** Da autora (2023).

Figura 3. Placas com a produção de endósporos de *Bacillus velezensis* AP-3 (UFC mL⁻¹) nos meios de cultura da Tabela 14.



Fonte: Da autora (2023).

4.4.2. Substituição da fonte de carbono no meio quimicamente definido para bactérias para a produção de endósporos

O meio de cultura quimicamente definido para bactérias com sacarose comercializada como açúcar cristal diferiu estatisticamente do mesmo meio com a glicose como fonte de carbono, apresentando maior produção de endósporos em UFC ml⁻¹ (Tabela 15).

Tabela 15 – Produção de endósporos de *Bacillus velezensis* AP-3 expressos em unidades formadoras de colônias por mL (UFC mL⁻¹) no meio de cultura quimicamente definido para bactérias e no mesmo meio com substituição da glicose por sacarose obtida de açúcar cristal em fermentação líquida.

Tratamento	UFC mL ⁻¹
Meio de cultura quimicamente definido para bactérias	7,56x10 ⁸ b
Meio de cultura quimicamente definido para bactérias + sacarose	9,70x10 ⁸ a
CV	12,81%

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível 5% de probabilidade. Fonte: Da autora (2023).

4.4.3. Substituição da fonte de nitrogênio no meio melaço + farelo de algodão na produção de endósporos

O meio de cultura melaço + farelo de algodão com substituição do farelo de algodão por proteína isolada de soja e levedura hilyses[®] diferiu estatisticamente do meio melaço + farelo de algodão, apresentando menor produção de endósporos em UFC mL⁻¹ (Tabela 16).

Tabela 16 – Produção de endósporos de *Bacillus velezensis* AP-3 expressos em Unidades formadoras de colônias por mL (UFC mL⁻¹) no meio de cultura melaço + farelo de algodão e no meio melaço + proteína isolada de soja + levedura hilyses[®] sob fermentação líquida.

Tratamento	UFC mL ⁻¹
Meio melaço + farelo de algodão	2,31x10 ⁹ a
Meio melaço + proteína isolada de soja e levedura hilyses [®]	1,13x10 ⁹ b
CV	27,45%

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível 5% de probabilidade. **Fonte:** Da autora (2023).

4.4.4. Substituição da fonte de nitrogênio nos melhores meios testados com hidrolisado proteico para a produção de endósporos

Neste ensaio os meios testados não diferiram estatisticamente entre si e apresentaram médias de produção de endósporos superiores a 1x10⁹ UFC mL⁻¹.

Tabela 17 – Produção de endósporos de *Bacillus velezensis* AP-3 expressos em unidades formadoras de colônias por mL (UFC mL⁻¹) nos meios testados substituindo as fontes de nitrogênio por hidrolisado proteico.

Tratamento	UFC mL ⁻¹
Meio de cultura quimicamente definido para bactérias + sacarose + hidrolisado proteico	1,06x10 ⁹ a
Meio utilizado por agricultor + hidrolisado proteico	1,17x10 ⁹ a
Meio melaço + hidrolisado proteico	1,07x10 ⁹ a
CV	8,93%

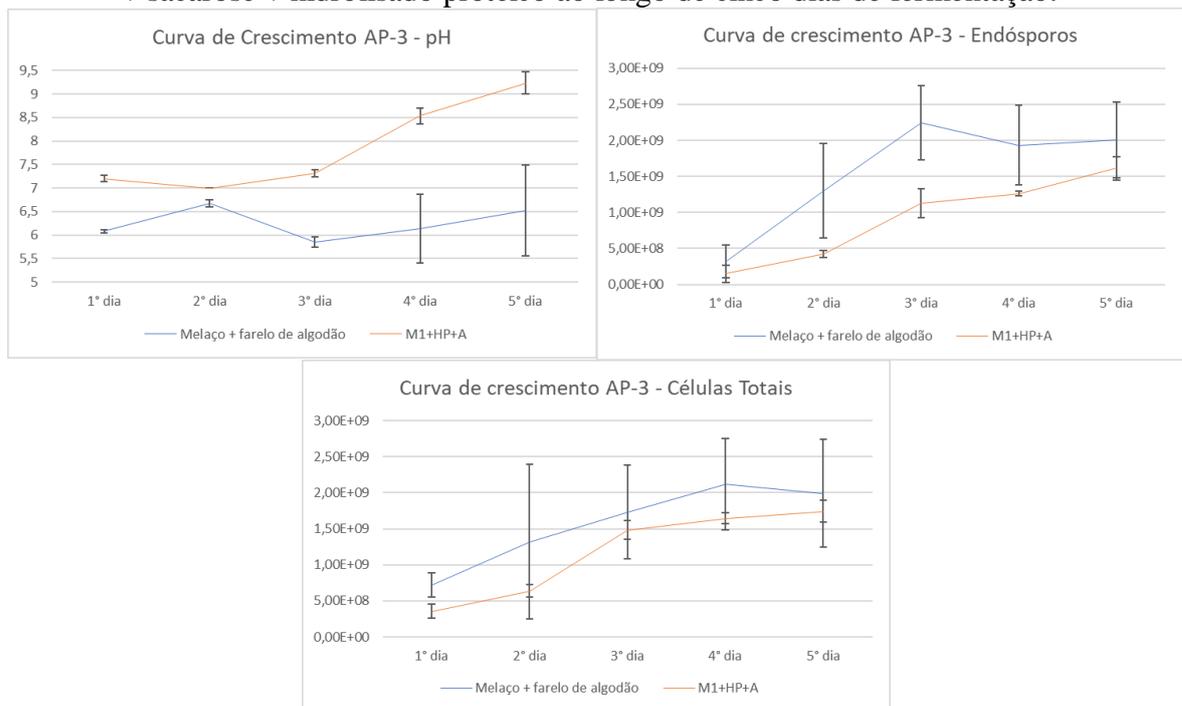
Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível 5% de probabilidade. **Fonte:** Da autora (2023).

4.5. Cinética de crescimento do isolado de *Bacillus velezensis* AP-3

Na Figuras 4 são observados os comportamentos do isolado AP-3 no meio quimicamente definido para bactérias modificado com hidrolisado proteico e sacarose (meio 1 + sacarose + hidrolisado proteico) e no contendo meio melação + farelo de algodão para as variáveis pH, produção de endósporos e de células vegetativas totais ao longo de cinco dias.

Na Figura 4 observa-se que ao longo dos dias o meio 1 + sacarose + hidrolisado proteico apresentou as médias de pH mais elevadas. Contudo, para as variáveis endósporos e células totais o meio melação + farelo de algodão apresentou as maiores médias ao longo de todos os dias.

Figura 4. Valores de pH, produção de endósporos e células vegetativas de *Bacillus velezensis* no meio melação + farelo de algodão e no meio quimicamente definido para bactérias + sacarose + hidrolisado proteico ao longo de cinco dias de fermentação.



Fonte: Da autora (2023).

4.6. Formulação do agente de biocontrole em pó-molhável (WP)

Com relação a vida de prateleira das formulações pôde-se observar que o tratamento com amido solúvel como inerte armazenado em temperatura ambiente diferiu estatisticamente de todos os demais tratamentos ao longo dos meses com menor perda de viabilidade de germinação dos endósporos. A formulação com fécula de batata como inerte armazenada a 40 °C diferiu estatisticamente dos demais com maior perda de viabilidade de germinação dos endósporos ao longo do tempo. A formulação com fécula de batata armazenada em temperatura ambiente não diferiu estatisticamente da formulação com amido solúvel armazenado a 40 °C com valores médios de germinação de endósporos ao longo do tempo (Tabela 18). A formulação em amido solúvel apresentou maior suspensibilidade do que a em fécula de batata (Tabela 19).

Tabela 18 – Viabilidade de endósporos de *Bacillus velezensis* AP-3 formulados em amido solúvel e fécula de batata após 26, 63, 86 e 114 dias após a formulação (DAF).

Tratamento	Endósporos (UFC g-1)					
	Antes de Formular	Formulação	26 DAF	63 DAF	86 DAF	114 DAF
Amido solúvel temperatura ambiente	4,85x10 ⁸	5,54x10 ⁸	5,24x10 ⁸ a	4,30x10 ⁸ a	3,86x10 ⁸ a	3,83x10 ⁸ a
Fécula de batata temperatura ambiente		3,59x10 ⁸	2,85x10 ⁸ b	2,28x10 ⁸ b	1,86x10 ⁸ b	1,94x10 ⁸ b
Amido solúvel a 40°C			1,94x10 ⁸ b	1,71x10 ⁸ b	1,5x10 ⁸ b	1,45x10 ⁸ b
Fécula de batata a 40°C			7,02x10 ⁷ c	6,04x10 ⁷ c	4,18x10 ⁷ c	6,34x10 ⁷ c
CV			14,26%	13,37%	17,15%	14,29%

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível 5% de probabilidade. **Fonte:** Da autora (2023).

Tabela 19 – Suspensibilidade de formulações à base de *Bacillus velezensis* AP-3

Tratamento	Suspensibilidade
Amido solúvel	62,64% a
Fécula de batata	31,24% b
CV	2,68%

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível 5% de probabilidade. **Fonte:** Da autora (2023).

5. DISCUSSÃO

No presente estudo foram investigadas formas de aumentar a produção de endósporos de *Bacillus velezensis* AP-3 por meio de ensaios visando melhorar fatores físicos e nutricionais da fermentação em fermentação líquida ou submersa. Neste estudo claramente foram observadas influências da composição do meio de cultura, das fontes de C e N e da temperatura entre outras (Tabelas 2 a 19). Estes efeitos estão de acordo com os descritos por Carvalho et al. (2019), Rezende et al. (2020), Dure (2022), Mascarin et al. (2022). A viabilidade do uso da fermentação líquida com meios de baixo custo para produzir altas concentrações de endósporos de *B. velezensis* AP-3 ficou evidenciado (Tabelas 2 a 19).

O efeito das condições físicas bem como das nutricionais depende da espécie e também de cada isolado. Assim, os resultados obtidos no presente estudo com *B. velezensis* AP-3 diferem dos obtidos por Jonk et al. (2014) trabalhando com *B. subtilis* CCT 516 em relação ao efeito da temperatura na produção de endósporos. Jonk et al. (2014) não verificaram efeito da temperatura na faixa de 28 a 34 °C, enquanto que no presente estudo o efeito foi significativo das temperaturas variando de 22, 28 e 34 °C. Por outro lado, apesar de Ajilogba e Babalola (2012) demonstrarem a importância do oxigênio dissolvido no meio de fermentação de espécies de *Bacillus*, visto que as mesmas são aeróbias obrigatórias, no presente estudo o aumento da agitação de 150 para 250 rpm (Tabela 9) não interferiu na produção de endósporos. Esse fato pode ser devido à suficiente aeração obtida com a menor agitação do meio de cultura. Também a estática dos Erlenmeyers por 8, 16 ou 24 horas após um dia de fermentação não diminuiu significativamente a produção de endósporos com relação aos Erlenmeyers que continuaram em agitação, uma hipótese que pode explicar é o fato do oxigênio que estava dissolvido no meio não ter sido totalmente consumido (Tabela 11). A não agitação dos Erlenmeyers não significa uma condição de anaerobiose imediata. A quantificação do oxigênio dissolvido nesse caso seria importante para que isto seja extrapolado para biorreator, ou seja, que seja medido o mínimo

de oxigênio dissolvido que não diminui a multiplicação de *Bacillus*. Com relação à variável volume de pré-cultura, isto é, a quantidade de inóculo transferida para os fermentadores em relação ao volume de meio de cultura, foi observado que a produção de endósporos não diferiu utilizando a relação de 0,5% a 10%, mantendo as mesmas condições e tempo de fermentação (Tabela 13). Esse resultado foi interessante pois o que naturalmente se espera é que quanto maior o volume de pré-cultura mais rápido se atinja a fase log (exponencial) e a fase estacionária. Outro detalhe importante que vale ressaltar é quanto ao tempo de fermentação da pré-cultura, pois se a cultura for inoculada com mais endósporos a fase logarítmica tende a demorar um pouco mais a ser iniciada do que quando se inocula a cultura com pré-cultura onde predomina-se células vegetativas. Com 24 horas de fermentação da pré-cultura predomina-se células vegetativas, entretanto com 72 horas ou mais predomina-se endósporos, estruturas de resistência que demoram mais tempo pra germinar e começar a multiplicar. Contudo observando o resultado do presente trabalho, onde não houve diferença estatística na produção de endósporos usando de 0,5% a 10% de pré cultura, quanto menor for o volume utilizado para inocular um biorreator industrial mais barato e mais fácil de fazer esse procedimento será. Ainda em relação às condições físicas da fermentação, Li et al. (2022) verificaram incremento de biomassa para *B. velezensis* CICC 23571 com a sonicação de 40 Hz por 15 minutos. Contudo, no presente estudo não foram encontradas diferenças ao expor ou não os Erlenmeyer em banho ultrassom entre 10 e 30 minutos após 4 horas do início da fermentação (Tabela 12). Possivelmente, devido às características de cada isolado os resultados podem apresentar variações.

Em relação à composição nutricional dos meios para a fermentação em estado líquido foi verificado que a produção de endósporos apresentou variação de até 1000 vezes dependendo do meio utilizado (Tabelas 7 e 14). No meio líquido da Embrapa (Tabela 2) foram obtidas $3,1 \times 10^6$ UFC mL⁻¹, enquanto no meio à base de melaço + farelo de algodão (Tabela 5) foram obtidas $2,6 \times 10^9$ UFC mL⁻¹ (Tabela 14) e no meio de cultivo quimicamente definido para bactérias a produção foi de $2,83 \times 10^8$ UFC mL⁻¹, mostrando a importância da composição dos meios na produção de endósporos. Dure (2022) também observou a importância da composição do meio líquido na produção de endósporos por *B. velezensis* AP-3. Outro resultado que chama a atenção foi a produção de endósporos no meio quimicamente definido para bactérias, mas adaptado por um produtor utilizando componentes de baixo custo (Tabela 3). Utilizando este meio foram verificadas as produções de $2,18 \times 10^9$ UFC mL⁻¹ e $2,34 \times 10^9$ UFC mL⁻¹ quando o

meio foi autoclavado e não autoclavado (mas desinfestado com a introdução de cloro no meio de cultura), respectivamente (Tabela 14). Fato interessante é que o meio utilizado por agricultor sem autoclavar não diferiu estatisticamente do meio utilizado por agricultor autoclavado. De acordo com o observado na Figura 3, visualmente não houve contaminação, entretanto para confirmação seria necessário a constatação através de análise molecular.

Na Tabela 15 pode ser observado que a substituição de glicose por sacarose no meio quimicamente definido para bactérias aumentou a produção de endósporos. Esse aspecto é importante, pois o custo a sacarose apresenta custo menor. Também foi observado que a substituição do farelo de algodão por proteína isolada de soja mais levedura hilyses[®] apesar de diferir estatisticamente na produção de endósporos do meio de cultura, manteve entre 1 e 2 x 10⁹ UFC mL⁻¹ em ambos os meios (Tabela 16). A importância deste resultado está na obtenção destes materiais que servem como fonte de nitrogênio, pois o farelo de algodão é importado enquanto as outras fontes são de origem nacional. Ainda em relação à fonte de nitrogênio, observa-se na Tabela 17 que a substituição por hidrolisado proteico contendo 75% de proteína e 19 aminoácidos não alterou a produção de esporos pela bactéria.

Cada nutriente fornecido pelo meio de cultura tem uma função no metabolismo de *Bacillus* e vai servir para o funcionamento das rotas metabólicas que resultam em rápida multiplicação das células e na expressão dos genes, como por exemplo influir na produção ou não de um determinado metabólito (MOON; PARULEKAR, 1991). Geralmente fermentações fúngicas tendem a necessitar de uma relação C:N maior, enquanto que para *Bacillus* essa relação geralmente é mais baixa (MASCARIN et al., 2022; SABERI et al., 2020).

Os resultados evidenciam que a otimização dos processos fermentativos é fundamental para o sucesso da produção de um bioagente (STANBURY et al., 1997). Conforme demonstrado no presente estudo, a composição do meio de cultivo desempenhou papel básico na produção de endósporos por *B. velezensis* AP-3. Portanto, para um processo econômico é importante realizar a otimização do meio de fermentação e das condições do processo, com a finalidade de maximizar os lucros do processo de fermentação (SCHIMIDT, 2005), conforme resultados obtidos neste estudo para o isolado AP-3 de *B. velezensis*.

Como observado na Figura 3, o pH durante o período fermentativo está intrinsecamente relacionado a produção de endósporos e células totais. Como pode ser observado o tamponamento do pH mais baixo fez com que o meio melão + farelo de algodão atingisse a

fase estacionária mais rápido. Para manter o pH baixo, em biorreatores pode ser empregado a injeção de ácido.

Outro aspecto importante na obtenção de produtos à base de agentes de biocontrole é a sua formulação. De uma forma muito simplificada foram estudadas as formulações obtidas com a mistura do caldo fermentado com amido solúvel e com fécula de batata, ambos selecionados devido à baixa granulometria e solubilidade em água (Tabela 18). Apesar da fécula de batata ter apresentado baixa suspensibilidade, este resultado pode ser otimizado utilizando-se fécula de batata com tamanho de partícula menor. A granulometria e a densidade do inerte interfere diretamente na suspensibilidade (MEDUGNO, 2007). Se atentando a este detalhe, ressalta-se a importância de não descartar um inerte apenas em função de suspensibilidade, outros aspectos como custo e disponibilidade regional devem ser observados, podendo as características do inerte serem melhoradas para formulação. Para os dois materiais foi observada diferença estatística na última avaliação, onde a vida de prateleira da formulação com amido solúvel se manteve inalterada até 114 dias após a formulação (Tabela 18), contudo, possivelmente, a vida de prateleira é superior se realizar nova avaliação. Precisa ser considerado que a suspensibilidade em amido solúvel foi praticamente o dobro do que a em fécula de batata. Esse estudo necessita ser repetido considerando também a mistura com alguns aditivos para manter a suspensibilidade dos endósporos, além das condições de armazenamento, haja vista que os materiais foram mantidos em condições ambientes e sem um adequado empacotamento.

Finalmente, precisa considerar que *B. velezensis* é uma bactéria que por produzir endósporos e atuar sobre diversos patógenos de plantas e promover o crescimento vegetal (Tabela 1) poderá se constituir em um princípio ativo adequado para o desenvolvimento de produtos biológicos.

6. CONCLUSÃO

- ✓ A agitação dos meios de cultura, o estresse de oxigenação, o estresse em banho ultrassom e o volume de pré-cultura testados não interferem na produção de endósporos de *B. velezensis* AP-3.
- ✓ A melhor temperatura para a produção de endósporos de *B. velezensis* AP-3, foi de 34 °C.
- ✓ Os meios de cultura quimicamente definido para bactérias + sacarose + hidrolisado proteico, o utilizado por agricultor, o utilizado por agricultor + hidrolisado proteico, o de melaço + farelo de algodão, o de melaço + proteína isolada de soja + levedura hilyses[®] e o de melaço + hidrolisado proteico produziram pelo menos 1×10^9 endósporos mL⁻¹.
- ✓ A formulação em pó-molhável à base de amido solúvel apresentou vida de prateleira superior a 114 dias quando armazenada em temperatura ambiente e também apresentou suspensibilidade adequada.

REFERÊNCIAS

- AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 13 dez. 2022.
- AJLOGBA, C. F.; BABALOLA, O. O. Integrated management strategies for tomato Fusarium wilt. **Biocontrol Science**, v. 18, n. 3, p. 117-127, 2013. DOI: <https://doi.org/10.4265/bio.18.117>
- ALVES, H. M. R. et al. Características ambientais e qualidade da bebida dos cafés do estado de Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, v. 32, n. 261, p. 18-29, 2011.
- ALVES, S. B., LOPES, R. B. **Controle Microbiano de Pragas na América Latina: Avanços e Desafios**. Piracicaba-SP: FEALQ, 2008.
- ANDRADE, D. E. G. et al. Controle da queima das folhas de inhame com produtos à base de *Bacillus subtilis*. **Summa Phytopathologica**, v. 21, n. 3/4, p. 202-205, 1995.
- ANDRADE, D. E. G. et al. Efeito de diferentes formulações de *Bacillus subtilis* sobre a queima das folhas do inhame. In: XXVI CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 1993, Aracaju-SE. **Resumo apresentado em Fitopatologia Brasileira**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 1993. v. 18. p. 307-307.
- ARAÚJO, F. F.; AIRES, A.; FARINA, F. Lodo industrial como alternativa de meio de cultura para *Bacillus subtilis*. **Colloquium Agrariae**, v. 2, n. 1, p. 1-5, 2006. DOI: <https://doi.org/10.5747/ca.2006.v02.n1.a16>
- ARAÚJO, F. F.; HENNING, A. A.; HUNGRIA, M. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p. 1639–1645, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-005-3621-x>
- ARAÚJO, F. F.; HUNGRIA, M. Soybean nodulation and yield when co-inoculated with *Bacillus subtilis* and *Bradyrhizobium japonicum* / *Bradyrhizobium elkanii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 9, p. 1633-1643, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X1999000900014>
- ARAÚJO, F. F.; SILVA, J. F. V., ARAÚJO, A. S. F. Influência de *Bacillus subtilis* na eclosão, orientação e infecção de *Heterodera glycines* em soja. **Ciência Rural**, v. 32, n. 2, p. 197-202, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782002000200003>
- ASH, G. J. The science, art and business of successful bioherbicides. **Biological Control**, v. 52, n. 3, p. 230-240, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.08.007>

AULD, B. A.; HETHERINGTON, S. D.; SMITH, H.T. E. Advances in bioherbicide formulation. **Weed Biology and Management**, v. 3, n. 2, p. 61-67, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1445-6664.2003.00086.x>

BATISTA, B. D. et al. The auxin-producing *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9 promotes the growth and modifies the root architecture of tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom). **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 7, p. 3869-3882, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02361-z>

BAVARESCO, L. G. et al. *Bacillus subtilis* can modulate the growth and root architecture in soybean through volatile organic compounds. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 32, n. 6, p. 99-108, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s40626-020-00173-y>

BAVARESCO, L. G.; ARAÚJO, F. F. Aplicação de *Bacillus subtilis* no controle de nematoides das galhas em tomateiro. **Colloquium Agrariae**, v. 13, n. especial, p. 41-46, 2017. DOI: <https://doi.org/10.5747/ca.2017.v13.nesp.000169>

BERNARDO, E. R. A.; BETTIOL, W. Controle da pinta preta dos frutos cítricos em cultivo orgânico com agentes de biocontrole e produtos alternativos. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, n. 1, p. 37-42, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1982-56762010000100006>

BETTIOL, W. **Seleção de microrganismos antagônicos a *Pyricularia oryzae* Cav. para o controle da brusone do arroz (*Oryza sativa* L.)**. 1988, 140 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Programa de Pós-Graduação, Faculdade de Agronomia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, 1988.

BETTIOL, W., VARZEA, V. M. P. Controle biológico da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) do cafeeiro com *Bacillus subtilis* em condições controladas. **Fitopatologia brasileira**, v. 17, n. 1, p. 91-95, 1992.

BETTIOL, W.; BRANDÃO, M. S. B.; SAITO, M. L. Controle da ferrugem do feijoeiro com extratos e células formuladas de *Bacillus subtilis*. **Summa Phytopathologica**, v. 18, p. 153-159, 1992.

BETTIOL, W.; GARIBALDI, A.; MIGHELI Q. *Bacillus subtilis* for the control of powdery mildew on cucumber and zucchini squash. **Plant Protection**, v. 56, n. 2, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0006-87051997000200007>

BETTIOL, W.; GHINI, R. Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. In: CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. (org.). **Métodos alternativos de Controle Fitossanitário**. 1. ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2003. p. 79-95. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/11706/1/CampanholaMetodos.pdf>>. Acesso em: 03 dez. 2022.

BETTIOL, W.; KIMATI, H. Efeito de *Bacillus subtilis* sobre *Pyricularia oryzae* agente causal da brusone do arroz. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 25, n. 8, p. 1165-1174, 1990.

BETTIOL, W.; KIMATI, H. Seleção de microrganismos antagônicos a *Pyricularia oryzae* para o controle da brusone do arroz. **Summa Phytopathologica**, v. 15, n. 3/4, p. 257-266, 1989.

BETTIOL, W.; SAITO, M. L.; BRANDÃO, M. S. B. Controle da ferrugem do cafeeiro com produto à base de *Bacillus subtilis*. **Summa Phytopathologica**, v. 20, n. 2

CARDOZO, R. B.; ARAÚJO, F. F. Multiplicação de *Bacillus subtilis* em vinhaça e viabilidade no controle da meloidoginose, em cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, n. 12, p. 1283-1288, 2011.

CARVALHO, S. de C. F. **Utilização do quociente de impacto ambiental como indicador para seleção de inseticidas químicos e biológicos no controle de insetos pragas**. 2017. 58 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Biotecnologia e Gestão da Inovação) Programa de Pós-Graduação, Faculdade de Agronomia da Universidade de Sete Lagoas – UNIFEMM, Sete Lagoas-MG, 2017.

CAWOY, H. et al. *Bacillus*-Based Biological Control of Plant Diseases. In: STOYTICHEVA, M. et al. (Org.). **Pesticides in the Modern World – Pesticides Use and Management**. Rijeka: In Tech, 2011.

CHAKRABORTY, U.; CHAKRABORTY, B.; BASNET, M. Plant growth promotion and induction of resistance in *Camellia sinensis* by *Bacillus megaterium*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 186-195, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1002/jobm.200510050>

COUCH, T. L. Industrial fermentation and formulation of entomopathogenic bacteria. In: CHARLES, J. F. (Org.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field applications**. New York: Kluwer Academic Publishers, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-94-017-1429-7>

CROPLIFE BRASIL. **Crescente adoção de produtos biológicos no mundo, e o Brasil é protagonista nesse mercado**. Disponível em: <<https://croplifebrasil.org/produtos-biologicos/crescente-adocao-de-produtos-biologicos-no-mundo-e-o-brasil-e-protagonista-nesse-mercado>>. Acesso em: 03 dez 2022.

DAOUST, R. A.; PEREIRN, R. M. Stability of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on beetle-attracting tubers and cowpea foliage in Brazil. **Environmental Entomology**, v. 15, n. 6, p. 1237-1243, 1986. DOI: <https://doi.org/10.1093/ee/15.6.1237>

DORIGHELLO, D. V et al. Controlling Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) with *Bacillus* spp. and coffee oil. **Crop Protection**, v. 67, p. 59-65, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.09.017>

DURE, L. M. M. **Otimização da fermentação líquida e sólida visando produção de endósporos de *Bacillus velezensis* AP-3**. 2022. 71 f. Tese (Doutorado em Proteção de

Plantas) – Programa de Pós-Graduação, Faculdade de Agronomia da Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu-SP, 2022.

EARL, A. M.; LOSICK, R.; KOLTER, R. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. **Trends in microbiology**, v. 16, p. 269-275, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.03.004>

EHLING-SCHULZ, M.; LERECLUS, D.; KOEHLER, T. M. The *Bacillus cereus* group: *Bacillus* species with pathogenic potential. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 3, p. 7.3. 6, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0032-2018>

FARIA, M. et al. Debilitation in conidia of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and implication with respect to viability determinations and mycopesticide quality assessments. **Journal of invertebrate pathology**, v. 105, n. 1, p. 74-83, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.05.011>

FARIA, M.; WRAIGHT, S. P. Biological control of *Bemisia tabaci* with fungi. **Crop Protection**, v. 20, n. 9, p. 767-778, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(01\)00110-7](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(01)00110-7)

FERREIRA, T. C. et al. Potencial de *Bacillus* spp. em promover o crescimento e controlar *Fusarium verticillioides* em milho. **Summa Phytopathologica**, v. 47, n. 4, p. 195-203, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-5405/241384>

GOMES, N. S. B. **Seleção de antagonistas para o controle de *Cylindrocladium spathulatum*, agente causal da pinta-preta em erva-mate**. 2000. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2000.

HAN, H. S.; SUPANJANI; LEE, K. D. Effect of co-inoculation with phosphate and potassium solubilizing bacteria on mineral uptake and growth of pepper and cucumber. **Plant soil and Environment**, v. 52, n. 3, p. 130-137, 2006. DOI: <https://doi.org/10.17221/3356-pse>

HIGAKI, W. A. ***Bacillus subtilis* e abamectina no controle de *Rotylenchulus sreniformis* e *Pratylenchus brachyurus* e alterações fisiológicas em algodoeiro em condições controladas**. 2012. 44 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-graduação, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente-SP. 2012.

HYNES, R. K; BOYETCHKO, S. M. Research initiatives in the art and science of biopesticide formulations. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, p. 845-849, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.07.003>

IGNOFFO, C. M. et al. Inactivation of representative species of entomopathogenic viruses, a bacterium, fungus, and protozoan by an ultraviolet light source. **Environmental Entomology**, v. 6, n. 3, p. 411-415, 1977. DOI: <https://doi.org/10.1093/ee/6.3.411>

INGLIS, G. D.; GOETTEL, M. S.; JOHNSON, D. L. Persistence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, on phylloplanes of crested wheatgrass and alfalfa. **Biological control**, v. 3, n. 4, p. 258-270, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1006/bcon.1993.1035>

JACKSON, M. A. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 180-187, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900426>

JONK, M. W. et al. Estudo de meio de cultura para *Bacillus subtilis* CCT516 utilizando técnica de planejamento experimental. In CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 2014, Florianópolis. **Resumo apresentado em Florianópolis: Associação Brasileira de Engenharia Química**, 2014. 8 p.

JÚNIOR, A. G., SANTOS, Á. F.; AUER, C. G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. **Floresta**, v. 30, n. 1-2, p. 155-165, 2000. DOI: <http://dx.doi.org/10.5380/ufv.v30i12.2362>

KOBORI, N. N. et al. Liquid culture production of microsclerotia and submerged conidia by *Trichoderma harzianum* active against damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani*. **Fungal Biology**, v. 119, n. 4, p. 179–190, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.12.005>

LAZZARETTI, E.; BETTIOL, W. Tratamento de sementes de arroz, trigo, feijão e soja com um produto formulado à base de células e de metabólitos de *Bacillus subtilis*. **Scientia Agricola**, v. 54, n. 1-2, p. 89-96, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-90161997000100013>

LAZZARETTI, E.; MENTEN J. O. M.; BETTIOL, W. *Bacillus subtilis* antagonísticos aos principais patógenos associados a sementes de feijão e trigo. **Fitopatologia Venezolana**, v. 7, n. 2, p. 42-46, 1994.

LI Y. et al. Ultrasonic modification on fermentation characteristics of *Bacillus* varieties: Impact on protease activity, peptide content and its correlation coefficient. **LWT**, v. 154, p. 112852, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112852>

LIMA, B. C. et al. *Bacillus subtilis* ameliorates water stress tolerance in maize and common bean. **Journal of Plant Interactions**, v. 14, n. 1, p. 432-439, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/17429145.2019.1645896>

LYNGWI, N. A.; JOSHI, S. R. Economically important *Bacillus* and related genera: a mini review. In: ARNAB S (org). **Biology of useful plants and microbes**. Narosa Publishing House, v. 3, p 33-43, 2014.

MADIGAN, M. T. et al. Brock biology of microorganisms. **Pearson Education**, 1155 p., 2016.

MANRIQUE, A. E. R. et al. Conditioning and coating of *Urochloa brizantha* seeds associated with inoculation of *Bacillus subtilis*. **Agricultural Research in the Tropics**, v. 49, 2019. DOI: <http://doi.org/10.1590/1983-40632019v4955536>

MARKETS and MARKETS. **Biopesticides Market by Type (Bioinsecticides, Biofungicides, Bionematicides, and Bioherbicides), Source (Microbials, Biochemicals, and Beneficial Insects), Mode of Application, Formulation, Crop Application, and Region - Global Forecast to 2025**. Disponível em:

<<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biopesticides-267.html>>. Acesso em: 11 dez. 2022.

MASCARIN, G. M. et al. *Clonostachys rosea*: production by submerged culture and bioactivity against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Bemisia tabaci*. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.851000>

MASCARIN, G. M. et al. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of invertebrate pathology**, v. 165, p. 46-53, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.01.001>

MASCARIN, G. M.; ALVES, S. B.; LOPES, R. B. Culture media selection for mass production of *Isaria fumosorosea* and *Isaria farinosa*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 4, p. 753-761, 2010. DOI: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132010000400002>

MASCARIN, G. M.; JARONSKI, S. T. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 11, p. 1-26, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2131-3>

MASSICOTTE, R. A. et al. *Bacillus subtilis* early colonization of *Arabidopsis thaliana* roots involves multiple chemotaxis receptors. **MBio**, v. 7, n. 6, p. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.01664-16>

MAZZUCHELLI, R. C. L.; ARAÚJO, F. F. Eficácia do controle de nematoides por *Bacillus subtilis* em duas variedades de cana-de-açúcar. **Colloquium Agrariae**, v. 7, n. especial, p. 51-58, 2011. DOI: <https://doi.org/10.5747/ca.2013.v09.nesp.000118>

MEDEIROS, C. A. A.; BETTIOL, W. Multifaceted intervention of *Bacillus* spp. against salinity stress and Fusarium wilt in tomato. **Journal of Applied Microbiology**, v. 131, n. 5, p. 2387-2401, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.15095>

MONNERAT, R. et al. Manual de produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero *Bacillus* para uso na agricultura. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Documentos (INFOTECA-E)**, 2020.

MOON, S. H.; PARULEKAR, S. J. A parametric study of protease production in batch and fed-batch cultures of *Bacillus firmus*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, n. 5, p. 467-483, 1991. DOI: <https://doi.org/10.1002/bit.260370509>

MORAES, I. de O.; CAPALBO, D. M. F.; MORAES, R. de O. Multiplicação de agentes de controle biológico. In: BETTIOL, W. **Controle Biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa, 1991. p. 383.

MORGADO, T. D. T. et al. Effectiveness and persistence of biological control of nematodes in sugarcane. **African Journal of Agricultural Research**, v. 10, p. 4490-4495, 2015. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJAR2015.10344>

NAGÓRSKA, K.; BIKOWSKI, M.; OBUCHOWSKI, M. Multicellular behavior and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. **Acta Biochimica Polonica**, v. 54, n. 3, p. 495-508, 2007. DOI: https://doi.org/10.18388/abp.2007_3224

NICHOLSON, W. L.; SETLOW, P. Sporulation, Germination and Outgrowth. In **Molecular Biological Methods for *Bacillus***; Harwood, C. R., Cutting, S. M., Eds.; John Wiley & Sons Ltd.: Chichester, U.K., 1990; p. 391-450.

OLIVEIRA, A. C. C.; ARAÚJO, F. F. Biorremediação de solo contaminado por óleo vegetal utilizando a bioaumentação com *Bacillus subtilis*. **Colloquium Exactarum**, v. 3, n. 1, p. 22-27, 2011. DOI: <https://doi.org/10.5747/ce.2011.v03.n1.e024>

PACIFICO, M. G.; ECKSTEIN, B.; BETTIOL, W. Screening of *Bacillus* for the development of bioprotectants for the control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and *Meloidogyne incognita*. **Biological Control**, v. 164, p. 104-764, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104764>

PARRA, J. R. P. Biological control in Brazil: an overview. **Scientia Agricola**, v. 71, n. 5, p. 345-355, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2014-0167>

PIGNATI, W. A. et al. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, p. 3281-3293, 2017. DOI: [DOI: 10.1590/1413-812320172210.17742017](https://doi.org/10.1590/1413-812320172210.17742017)

PIURI, M.; SANCHEZ-RIVAS, C.; RUZAL, S. M. A novel antimicrobial activity of a *Paenibacillus polymyxa* strain isolated from regional fermented sausages. **Letters in Applied Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 9-13, 1998.

PROBANZA, A. et al. *Pinus pinea* L. Seedling growth and bacterial rhizosphere structure after inoculation with PGPR *Bacillus* (*B. licheniformis* CECT 5106 and *B. pumilus* CECT 5105). **Applied Soil Ecology**, v. 20, n. 2, p. 75-84, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(02\)00007-0](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(02)00007-0)

RABBEE, M. F. et al. *Bacillus velezensis*: a valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. **Molecules**, v. 24, n. 6, p. 1-13, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24061046>

RENSEIGNÉ, N. et al. Rock phosphate-potassium and rock-solubilising bacteria as alternative, sustainable fertilisers. **Agronomy for sustainable development**, v. 26, n. 4, p. 233-240, 2006. DOI: [10.1051/agro:2006020](https://doi.org/10.1051/agro:2006020)

REZENDE, L. C. et al. Optimizing mass production of *Trichoderma asperelloides* by submerged liquid fermentation and its antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 8, p. 113, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02882-7>

RHODES, D. J. Formulation of biological control agents. **Exploitation of Microorganisms**. v. 1, p. 411-439, 1993. DOI: https://doi.org/10.1007/978-94-011-1532-2_16

RUIZ-GARCIA, C. et al. *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Velez in Malaga, southern Spain. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 191-195, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63310-0>

SABERI, F. et al. Optimization of culture media to enhance the ability of local *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 19, p. 468-475, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2020.08.004>

SANTOS, C. C. F. et al. Sensibilidade *in vitro* de urediniósporos de *Puccinia psidii* a *Bacillus subtilis*. **Summa Phytopathologica**, v. 24, n. 2, p. 183-18, 1998.

SAVARY, S. et al. The global burden of pathogens and pests on major food crops. **Nature Ecology & Evolution**, v. 3, n. 3, p. 430–439, 2019. DOI: [10.1038/s41559-018-0793-y](https://doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y).

SILVA-CASTRO et al. Control of coffee leaf rust by chitosan oligomers and propolis. **Agriculture for Life, Life for Agriculture**, v 1, p 311–315, 2018. DOI: [10.2478/alife-2018-0046](https://doi.org/10.2478/alife-2018-0046)

SINGH, J. et al. Belowground fungal volatiles perception in okra (*Abelmoschus esculentus*) facilitates plant growth under biotic stress. **Microbiological Research**, v. 246, p. 126721, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126721>

SLININGER, P. J. et al. Biological control of post-harvest late blight of potatoes. **Biocontrol science and technology**, v. 17, n. 6, p. 647-663, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1080/09583150701408881>

SRIRAM, S.; ROOPA, K. P.; SAVITHA, M. J. Extended shelf-life of liquid fermentation derived talc formulations of *Trichoderma harzianum* with the addition of glycerol in the production medium. **Crop Protection**, v. 30, n. 10, p. 1334-1339, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.06.003>

TERAO et al. Potential Use of Bioagents in the Control of Postharvest Rot in Melon. **Acta Horticulturae**, v. 1053, p. 65-74, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1053.4>

ZHAO, C. et al. Comparison of different fermentation processes for the vitamin K2 (Menaquinone-7) production by a novel *Bacillus velezensis* ND strain. **Process Biochemistry**, v. 102, p. 33-41, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.11.029>