

Desenvolvimento De Meio De Cultura Para Multiplicação De Bactérias On-Farm

Letícia Germano Tomé¹
Ismail Teodoro de Souza Júnior²

RESUMO

O aumento da demanda por alimentos, aliado à necessidade de uma produção agrícola que utiliza menos fertilizantes químicos e pesticidas sintéticos, tem impulsionado o desenvolvimento de novas ferramentas para a agricultura. Neste cenário, o controle biológico tem sido visto como uma potencial ferramenta para reduzir custos e aumentar a produtividade. Para a multiplicação de microrganismos o meio de cultura é um fator importante à ser considerado, seja na multiplicação industrial ou *On Farm*. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo desenvolver um meio de cultura para a multiplicação *On Farm*. Para isso foram testados 4 tipos de meio de cultura: Meio 1 – Peptona, Água Destilada, ½ dose do Meio MultiBacter, Açúcar e Antiespumante; Meio 2 – Peptona, Água Destilada, Levedura, Bagaço de cana-de-açúcar e antiespumante; Meio 3 – Levedura, Bagaço de cana-de-açúcar, Sal, Açúcar e Antiespumante e Meio 4 meio de cultura MultiBacter (comercial). Para a multiplicação no meio, foi utilizado o *Bacillus pumilus*, mensurando a quantidade de colônias produzidas em cada meio, por até 24 horas, mensurando as colônias, nos tempos, 2,4,6,8 e 24 horas. diferentes concentrações. Na fermentação de *B. pumilus* todas as concentrações dos meios alternativos permitiram atingir o crescimento semelhante ao do meio comercial, sendo que o melhor meio de crescimento foi o 1, o qual também se mostrou o mais viável economicamente. Frente a isso, este estudo mostrou que o meio de cultura alternativo é uma opção para a multiplicação das bactérias Gram-positivas, de interesse agrícola.

Palavras-Chave: *Bacillus pumilus*; crescimento de microrganismos, controle biológico

Development Of Culture Media For On-Farm Bacteria Multiplication

ABSTRACT

The increased demand for food, combined with the need for agricultural production that uses fewer chemical fertilizers and synthetic pesticides, has driven the development of new tools for agriculture. In this scenario, biological control has been seen as a potential tool to reduce costs and increase productivity. For the multiplication of microorganisms, the culture medium is an important factor to be considered, whether in industrial or *On Farm* multiplication. Thus, the present study aimed to develop a culture medium for *On Farm* multiplication. For this, 4 types of culture medium were tested: Medium 1 – Peptone, Distilled Water, ½ dose of MultiBacter Medium, Sugar and Antifoam; Medium 2 – Peptone, Distilled Water, Yeast, Sugarcane Bagasse and antifoam; Medium 3 – Yeast, Sugarcane Bagasse, Salt, Sugar and Antifoam and Medium 4 MultiBacter culture medium (commercial). For multiplication, an isolate of

¹Letícia Germano Tomé – Discente do curso de Agronomia do UNIVAG - Centro Universitário.

²Ismail Teodoro de Souza Júnior – Docente do curso de Agronomia do UNIVAG - Centro Universitário.
E-mail: teodoro.junior@univag.edu.br

Bacillus pumilus bacteria was used, measuring the number of colonies produced in each medium, for up to 24 hours, at times 2, 4, 6, 8 and 24 hours. In the fermentation of *B. pumilus*, all the concentrations of the alternative media allowed achieving growth similar to that of the commercial medium, and the best growth medium was 1, which also proved to be the most economical. Therefore, this study showed that the alternative culture medium is an option for the multiplication of Gram-positive bacteria, of agricultural interest.

Keywords: *Bacillus pumilus*; the growth of microorganisms; Biological Control.

1 INTRODUÇÃO

Tendo em vista as exigências de mercado e dos órgãos ambientais, busca-se o desenvolvimento de produtos biológicos com o objetivo de minimizar o impacto ambiental na cadeia produtiva, além de reduzir os custos de produção e aumentar a eficiência do manejo agrícola. Em uma era denominada de “nova era da agricultura”, muitos produtores estão realizando o chamado “*On Farm*”, que consiste na realização de multiplicação de microrganismos em meios biológicos na propriedade, visando diminuição nos custos com controle de pragas e doenças e na adubação (GABRIEL, et al., 2020).

Segundo o engenheiro agrônomo Rafael Garcia Netto, diretor executivo da Agrobiológica Soluções Naturais, a multiplicação de um meio de cultura biológico (bactérias) nas fazendas ganhou força entre 2012 e 2013. Esse aumento ocorreu, pois, nessa época houve um surto de lagarta *Helicoverpa armigera*. em lavouras de milho, algodão e soja. Além disso, os produtos químicos não estavam sendo eficientes no controle desta praga. Contudo, produtos desenvolvidos com a bactéria *B. thuringiensis* foram eficientes no controle de *Helicoverpa* spp. Esse cenário fez com que a multiplicação de bactérias produzidas de forma sustentável nas fazendas começasse a se expandir.

Com o passar dos anos, a multiplicação *On Farm* tem conquistado cada vez mais espaço devido à redução nos custos de produção, alta viabilidade e eficiência, aliados ao menor impacto ambiental. Soma-se a multiplicação biológica nas fazendas, que apontam para benefícios em prol do controle químico, o qual têm perdido eficiência em razão das resistências das pragas e estes produtos (HARDOIM et al., 2020).

De acordo com Hardoim e colaboradores (2020), para aumentar ainda mais a multiplicação das bactérias dentro das propriedades, o Ministério da Agricultura, no dia 27 de maio de 2020, criou o Programa Nacional de Bioinsumos, responsável por ampliar o uso de microrganismos na agricultura voltado ao desenvolvimento sustentável do sistema agropecuário brasileiro. Uma de suas vertentes é a de facilitar a regulamentação desse tipo de produção, impulsionando-os, reduzindo impactos ambientais, custos de produção e promovendo alimentos de forma mais segura.

Atualmente, as bactérias do gênero *Bacillus* são um dos organismos mais utilizados para controle biológico. Sua difusão ocorre em virtude de suas características de formação de endósporos, capazes de se manterem viáveis por longos anos no ambiente e resistirem a diferentes fatores, ocorrência cosmopolita, isto é, eventualmente encontradas em todo o mundo; fácil adaptabilidade por serem, em sua grande maioria, aeróbias e capazes de crescer facultativamente em anaerobiose, lhes permitindo desenvolver-se muito bem em substratos como o solo (EMBRAPA, 2020).

Os propósitos de se estudar a produção *On Farm* são, minimizar os impactos ambientais causados por produtos químicos; otimizar o manejo integrado; reduzir os custos de produção; maximizar e otimizar o efeito do controle químico por meio de aplicações dos produtos biológicos, os quais auxiliam os químicos no combate de pragas e doenças.

Desta forma, são necessárias novas pesquisas relacionadas à produção de meios biológicos, visando tanto uma otimização para o produtor quanto para colaborar com a comunidade científica em relação ao assunto abordado. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi desenvolver um meio de cultura para avaliar o crescimento de bactérias biocontroladoras (*Bacillus pumilus*) no sistema de produção *On Farm*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Fitopatologia da UNIVAG - Centro Universitário, localizada no município de Várzea Grande - MT, entre junho e dezembro de 2022. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, tendo quatro tratamentos e quatro repetições.

Primeiramente, a bactéria *B. pumilus* foi isolada em um tubo de ensaio com caldo de triptona-soja (TSB) a partir do produto comercial, onde realizou-se a deposição da mesma em cima do meio solidificado para a inoculação e, foi mantida sob refrigeração (4°C) caso fosse necessário utilizar o inóculo novamente.

Os tratamentos testados neste estudo são quatro formulações de meio de cultura biológicos, utilizados com o objetivo de analisar o crescimento da bactéria *B. pumilus* (Quadro 1).

Os meios a seguir foram definidos a partir da inspiração de “formulações caseiras” já utilizada por produtores rurais do estado do Mato Grosso, a nível laboratorial foram feitos alguns ajustes de concentração.

Quadro 1- Formulações de meios de cultura para crescimento de *Bacillus pumilus*. Várzea Grande, 2023.

Meios	Ingredientes
PepMult (Meio1)	Peptona – 0,01Kg; Água destilada – 1L; Meio Comercial MultiBacter – 0,01Kg; Açúcar – 0,03Kg; Antiespumante – 1mL.
ExtraPep (Meio2)	Antiespumante – 1mL; Açúcar – 0,03Kg; Extrato Levedura – 0,017Kg; Bagaço de cana-de-açúcar – 0,030Kg; Peptona – 0,01Kg; Água destilada – 1L.
LevConc (Meio3)	Antiespumante – 1mL; Sal – 0,012kg; Bagaço de cana-de-açúcar – 0,03Kg; Açúcar – 0,06kg; Extrato de Levedura – 0,025kg.
Comercial (Meio 4)	Meio Comercial – 0,02kg; Água Destilada – 1L; Açúcar – 0,0075kg.

Fonte: TOMÉ L., 2023

Para o preparo das diluições foi utilizada Água salina (NaCl 0,85g) e na sequência, levado ao aparelho autoclave e realizada a esterilização (EMBRAPA, 2012). O meio de cultura utilizado nas placas foi o TSB (30g), misturado com Água destilada 1000mL e Agar 20g. A mistura foi adicionada em um Erlenmeyer e levada a uma fonte de calor, onde a homogeneização ocorreu.

Em seguida, realizou-se a esterilização na autoclave, o líquido foi vertido nas placas de Petri estéreis. Após o meio se solidificar na placa, estas foram invertidas e incubadas a uma temperatura de 28°C, por 24 horas, para certificar se não houve contaminações aparentes (EMBRAPA, 2012).

Seguindo as orientações das metodologias do Manual de Produção da Embrapa (2020), a multiplicação dos meios testes foi feita a partir de um recipiente de 1L, colocado a uma temperatura de 28°C (em estufa) com o auxílio de uma mesa agitadora. Esse processo ocorreu por um tempo limite de 24 horas, em que os meios foram incubados. Os tratamentos foram retirados e conduzidos em recipientes fechados estéreis, e destinados até a câmara de fluxo laminar.

Imediatamente após o ajuste para OD₆₀₀ 0,01, os Erlenmeyers foram novamente incubados sob mesmas condições do overnight. A cada 2 horas, 1 mL da cultura foi retirado, diluído em 9 mL de solução salina (0,85%) e agitados em agitador vórtex (Phoenix AP56). Foram plaqueadas em meio ágar triptona de soja (TSA) alíquotas de 100 µL retirados de pelo menos três diluições distintas de cada réplica de toda a série para cada tratamento, totalizando pelo menos 12 placas para cada tratamento (2 Erlenmeyers x 2 séries x 3 diluições). Após, foi realizado o plaqueamento das suspensões bacterianas nos seguintes tempos: 0h, 2h, 4h, 6h, 8h e 24 horas. As placas foram então incubadas em incubadora de demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D.) a 28 °C por 24 horas, e depois foi realizada a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

Depois de todo esse processo inicial, foram transferidos das diluições selecionadas, com auxílio de uma pipeta, 100 µL da suspensão de cada tubo para a superfície de 2 placas de Petri. A suspensão bacteriana foi espalhada uniformemente na placa com auxílio de uma alça de Drigasliki estéril (flambada com álcool 98%). Esperou-se o tempo de 2 minutos para que o meio absorvesse a amostra e então estas foram invertidas e vedadas com parafilme, alocadas em uma B.O.D. com temperatura média regulada em 28°C ±2° e incubadas até 24 horas (EMBRAPA, 2012).

A contagem das colônias bacterianas foi realizada após 24 horas de incubação das placas, tendo como parâmetro a seguinte fórmula:

$$\text{UFC/mL} = \text{número médio de colônias na placa} \times \text{diluição escolhida da amostra} \times 10^*$$

**O valor 10 refere-se ao fato de terem sido plaqueado apenas 100 µL de suspensão.*

Cada curva de crescimento foi determinada a partir do número de UFCs bacterianas após 0, 2, 4, 6, 8 e 24 horas de cultivo. Os resultados foram apresentados como crescimento (UFC.mL⁻¹ ou log UFC.mL⁻¹). Os dados também foram submetidos

a diferentes ajustes de modelos de curvas representativas do crescimento bacteriano em variados tratamentos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com dados coletados, verificou-se uma variação no número de colônias para cada meio testado. A partir disso, foram avaliadas as quantidades de colônias mensuradas com base na curva de crescimento bacteriano; e o seu respectivo desenvolvimento, que teve como comparação os demais tratamentos. (Figuras 1A, 1B, 1C, 1D).

Observa-se que o PepMult proporcionou um crescimento que, na fase exponencial (log), chegando ao período de 24 horas a 10^{10} , o que equivale aproximadamente a $3,035 \times 10^{10}$ bactérias por mL. A reta obteve um r^2 de 0.99. Além disso, também é possível verificar um arranque inicial muito eficiente e crescente pelo uso da concentração 4 vezes maior de açúcar e adição de peptona e bagaço, tendo uma maior concentração de aminoácidos e carboidratos. Estes dados corroboram com resultados encontrados por Podpora *et al.* (2016), enfatizando a multiplicação mais acentuada (Figura 1A) quando comparada ao meio comercial.

Diferentes meios de cultura são empregados corriqueiramente em laboratório para crescimento de microrganismos e, comumente se utilizam carboidratos simples, por exemplo glicose e frutose, como fonte de carbono e, peptona e extrato de levedura como fonte de nitrogênio (ERKMEN, 2021; WEN *et al.*, 2021).

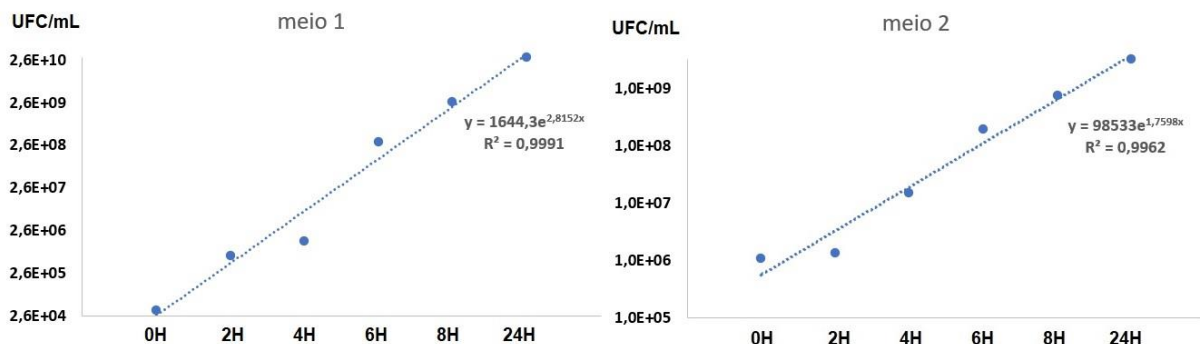
Ao analisar a Figura 1B, observa-se um arranque inicial lento até as primeiras 2 horas. Entretanto, ao atingir 8 horas, verifica-se um crescimento notável. Essa alta população inicial se dá pela grande concentração de extrato levedura que aumenta a síntese enzimática e o crescimento bacteriano, resultado constatado por Santiago e *et al.* (2004). Com isso, o consumo energético do meio aumentou até ter seu decréscimo, que também teve ligação com a concentração de nitrogênio (nutriente que dá aporte para o crescimento dos microrganismos), além dos carbonos e açúcares (KOBORI *et al.*, 2015). Ainda segundo Kobori *et al.* (2015), ao variar concentrações da relação C/N tendo carbono mais concentrado, obteve-se uma maior multiplicação.

Embora o LevConc tenha se expressado levemente maior que o ExtraPep no final das 24 horas, mesmo com sal e 47% a mais de extrato de levedura, não obteve um resultado esperado, pois envolveu um alto custo e um baixo retorno, levando a acreditar que o diferencial dos demais meios tenha sido a concentração de extrato de levedura e açúcares totais. Esse resultado remete novamente a relação de carboidratos na solução.

Um diferencial presente nos meios alternativos PepMult, ExtraPep e LevConc é a presença de tecido vegetal (bagaço de cana-de-açúcar), que se mostram necessários para a multiplicação, corroborando com os resultados encontrados por Eevers *et al.* (2015) que obteve resultados que a adição de extrato vegetal aumenta significativamente a multiplicação de bactérias em meio de cultura.

A respeito do meio comercial (Figura 1D), verifica-se um desenvolvimento homogêneo, sem queda de multiplicação nas diferentes horas avaliadas e com um resultado parecido se comparado aos meios ExtraPep e LevConc, mostrando-se eficiente e com baixo custo. A avaliação da curva de crescimento mostrou-se muito eficiente do PepMult quando comparado ao Comercial, que foi tomado como base por se tratar de um meio comercializado (Figura 2).

Tendo o PepMult uma multiplicação de quase 10x mais que o meio *Multibacter* padrão comercial, esse resultado sugere que os componentes a mais do PepMult como peptona; meia dose do meio de cultura comercial e açúcar 4x a recomendação de fábrica da Multibacter, têm efeito direto na multiplicação do *B. pumillus*, fazendo com que seu arranque inicial se sobressaísse em relação aos demais meios utilizados como teste.



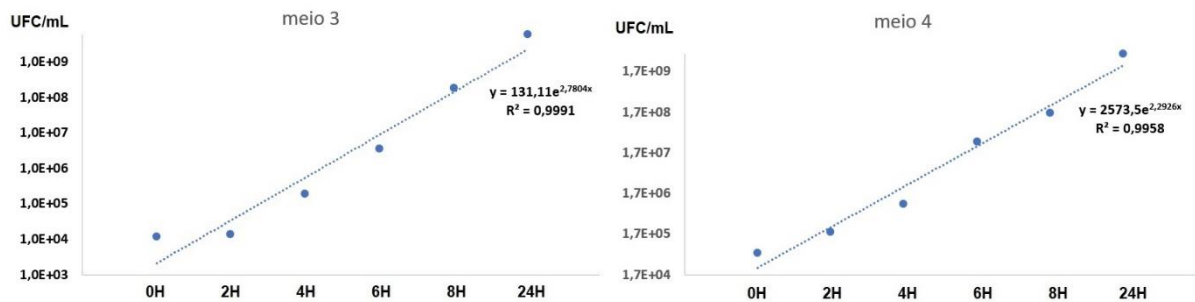


Figura 1. Curvas de crescimento de *Bacillus pumilus* crescido em meio alternativo de peptona, açúcar, bagaço e meia dose de Multibacter (A); meio alternativo de antiespumante, açúcar, bagaço de cana-de-açúcar, peptona (B); Curvas de crescimento de *B. pumilus* crescido em meio alternativo de antiespumante, sal, bagaço de cana-de-açúcar, açúcar, extrato de levedura (C); Curvas de crescimento de *B. pumilus* crescido em meio comercial *MultiBacter* (D).

Percebe-se alterações na intensidade de multiplicação a cada intervalo de tempo, tendo em vista que variados fatores podem influenciar o crescimento bacteriano, a exemplo da relação direta do oxigênio na multiplicação (LUNA et al., 2002, CARVALHO, 2005; OLIVEIRA, 2006). Todavia, a curva de crescimento se caracteriza por uma boa adaptação dos microrganismos que se encontram na última amostragem ainda na fase exponencial, mediante isso essas diferenças não impactaram o máximo crescimento dos meios.

Conforme Singh, Ratuela e Cameotra (2014) o açúcar simples é rapidamente utilizado pelo gênero *Bacillus* para sua multiplicação, levando a um rápido acréscimo na biomassa, assim, explicando a rápida exploração desta fonte de carbono neste caso pelo *B. pumilus*.

Analisando os gráficos demonstrados nas figuras Figuras 1A, 1B, 1C, 1D é possível avaliar a qualidade e confiabilidade do trabalho, pois quanto mais próximo da reta estiverem os pontos, menor é o desvio padrão, o que demonstra não haver contaminação nas avaliações. Além disso, nos quatro meios avaliados durante o período de 24 horas, todos estavam na fase de crescimento exponencial, na qual os microrganismos se encontram na plenitude de suas capacidades, num meio cujos suprimentos de nutrientes são superiores às necessidades do microrganismo (NITZKE J.A.; BIEDRYCKI A. 2023).

O meio alternativo utilizado que resultou em uma boa multiplicação contém 400% a mais de açúcar que o meio comercial, sendo a glicose a fonte carbono do meio de cultura e a peptona a fonte de nitrogênio, resultados esses similares aos

encontrados por Erkmem (2021) e Wen *et al* (2021). Portanto, constatou-se que o meio alternativo PepMult teve eficiência na multiplicação de *B. pumilus* e custos mais vantajosos de multiplicação.

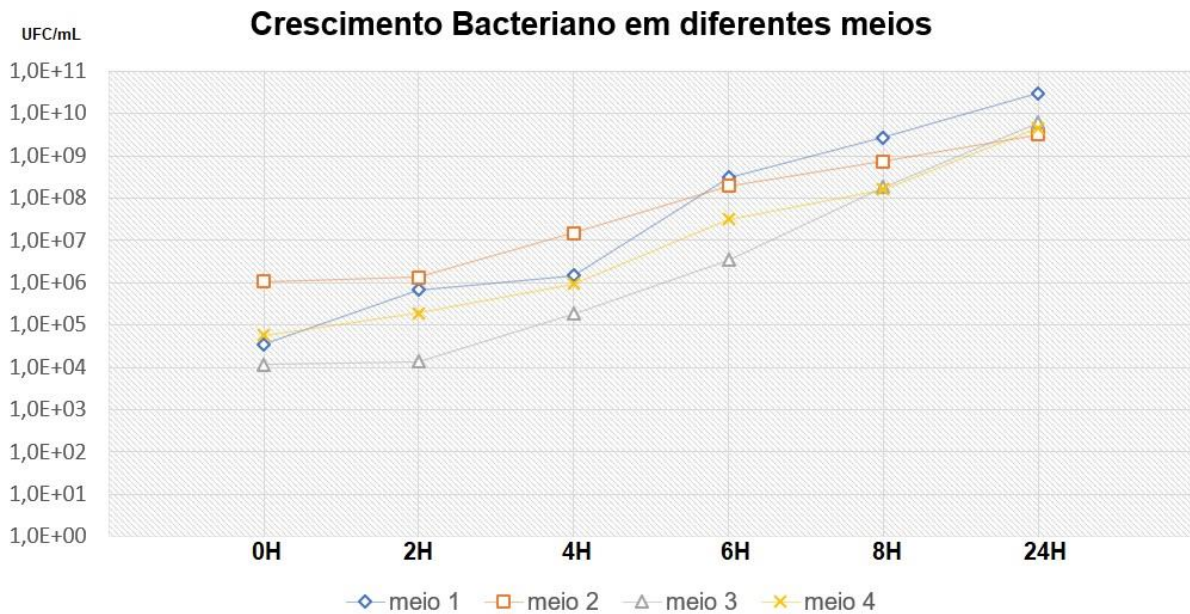


Figura 5 – Curva de crescimento de *B. pumilus* multiplicado em diferentes meios de cultura, Várzea Grande, 2023.

Do ponto de vista econômico, o meio comercial tem o custo mais barato por litro produzido. Tendo em vista que o meio *MultiBacter* já é produzido em larga escala há muitos anos, é possível equiparar os valores, pois as cotações adquiridas para os meios alternativos estão todas com o valor final de consumidor, encarecendo, assim, cerca de 30% o custo para a produção.

Abaixo encontra-se descrita a pesquisa de valores dos meios: Meio 1 (PepMult) – ½ dose Multibacter (R\$1.900,00); 30kg açúcar (R\$174,00); 30kg bagaço (R\$5,10); 10kg peptona (R\$3.360,00) = R\$5.439,10. Meio 2 (ExtraPep) – 30kg açúcar (R\$174,00); 10kg peptona (R\$3.360,00); 17kg levedura (R\$4.253,00); 30kg bagaço (R\$5,10) = R\$7.792,10. Meio 3 (LevConc) – 30kg bagaço (R\$5,10); 25kg levedura (R\$6.254,41); 12kg sal (R\$47,88); 60kg açúcar (R\$348,00) = R\$6.655,39. Meio 4 (Comercial) – meio Multibacter, kit de esterilização com pastilhas de cloro e antiespumante (R\$3.800); 7,5kg açúcar (R\$43,50) = R\$3.843,50.

Levando em conta o fator custo por bactéria produzida, o meio 1 teve um desenvolvimento 10x superior. Esse valor permite concluir que somadas todas as

variáveis, esse se torna o meio mais viável considerando custo-benefício. É importante ressaltar que a dose do Comercial seria para *B. pumilus* de 2L/ha. Contudo, o PepMult consegue entregar a mesma concentração de bactérias com uma dose de 0,2 L/ha.

Considerando esse fator da concentração, o meio *MultiBacter*, ao fazer 1000L tem um custo de R\$3.843,50; utilizando uma dose de 2L/ha, os 1000L rendem 500 ha, tendo um custo médio por há de R\$ 7,60. Já o meio alternativo 1 para fazer 1000L tem o custo de R\$5.439,10, tendo uma dose de 0,2L/ha, rendendo 5.000 ha e tendo o seu custo por hectare de R\$0,919.

O padrão comercial *MultiBacter* se mostrou muito estável e viável economicamente ao analisar Litros produzidos. Todavia, quando calculado o custo por hectare o cenário muda completamente, tendo o Meio PepMult expressado uma multiplicação de *Bacillus* 10x superior ao meio comercial, o que diminuiu sua dose em 10x e, com isso, minimizou o custo por hectare; enquanto o meio alternativo ficou 11,84x mais barato que o meio comercial. Uma alternativa excelente tanto em sustentabilidade quanto na manutenção da conservação de moléculas químicas que, ao longo dos anos, estão se perdendo com uma certa facilidade.

Numa época em que tanto se fala sobre sustentabilidade e sobre os custos da produção agrícola que estão cada vez mais altos, faz-se necessário a busca por alternativas que visem melhorar a atividade biológica do solo, com melhor desenvolvimento das plantas, resultando em conseqüente maior preservação do meio ambiente e aumento da produtividade das culturas.

Nesse trabalho, o objetivo deste estudo foi desenvolver um meio de cultura para avaliar o crescimento de bactérias biocontroladoras (*B. pumilus*) no sistema de produção *On Farm*. E assim verificar a eficiência dessa ferramenta que cresce a cada dia em nosso país, com grande utilização em lavouras comerciais. Sendo assim, novas pesquisas devem continuar sendo realizadas para consolidar os resultados, visando encontrar um meio versátil, de baixo custo e com uma alta eficiência de multiplicação bacteriana.

4 CONCLUSÃO

O meio PepMult que contém *MultiBacter*, Peptona, Açúcar, Água destilada e Antiespumante foi mais eficiente para o crescimento de *B. pumilus* em comparação

aos demais meios, e teve um melhor custo-benefício considerando a concentração UFC/mL.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARVALHO, A.L.U.D. **Fisiologia de *Bacillus subtilis* R14 sob condições restrita e irrestrita de oxigênio: produção de compostos bioativos e esporulação.** 2005. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/1534>. Acesso em: 01 Mar. 2023.

CHOI, S.Y.; LIM, S.; YOON, K.; LEE, J.I.; MITCHELL, R. J. Biotechnological Activities and Applications of Bacterial Pigments Violacein and Prodigiosin. **Journal of Biological Engineering**, v. 15, n. 1, p. 10, 2021.

EMBRAPA. **Quantificação e identificação de *Bacillus subtilis* e *B. licheniformis*.** 25 – 26 de abril de 2012. Disponível em: https://www.cnpma.embrapa.br/down_site/forum/2012/bacillus/ApostilaCursoBacillus2012.pdf. Acesso em: 14 out. 2021.

EEVERS, N., *et al.* **Microbial Biotechnology**, v.8, n. 4, p.707–715, 2015.

FERRAZ, S. *et al.* **Manejo sustentável de fitonematoides**, 1 ed., Viçosa: Editora UFV, 2010. 306 p.

GABRIEL, N.W. *et al.* **Multiplicação biológica: ON FARM x INDUSTRIAL.** Disponível em: https://evento.ufmt.br/download/sub_bc6ee8ce0ae12710e6c9c87a080634a7.pdf Acesso em: 1 de out. de 2021.

HARDOIM, P. *et al.* **Multiplicação de bactérias On Farm.** Disponível em: https://issuu.com/miriam-revistacampoenegocios.c/docs/hf_julho_2020_email/s/10722563 >. Acesso em: 1 de out. de 2021.

KOBORI, N.N.; MASCARIN, G.M.; JACKSON, M. A.; SCHISLER, D. A. Liquid culture production of microsclerotia and submerged conidia by *Trichoderma harzianum* active against damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani*. **Fungal Biology**, v. 119, p. 179-190, 2015.

LUNA, C.L.; MARIANO, R.L.R.; SOUTO-MAIOR, A.M. Production of a biocontrol agent for crucifers black rot disease. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, n. 2, p. 113-140, 2002.

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.** 1 ed. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2020. 47 p.

NITZKE A.J. E BIEDRYCKI A. **Como fazer pão**. Rio Grande do Sul. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/alimentus1/pao/fermentacao/fer_crescimento_curva.htm> Acesso em: 28 de março de 2023.

NETTO, R.G. **O papel da multiplicação de bactérias na agricultura sustentável. Revista Campo e Negócios**. Disponível em: https://issuu.com/miriam-revistacampoenegocios.c/docs/hf_julho_2020_email/s/10722563. Acesso em: 1 de out. de 2021.

PODPORA, B.; ŚWIDERSKI, F.; SADOWSKA, A.; RAKOWSKA, R.; WASIAK-ZYS, G. Spent brewer's yeast extracts as a new component of functional food. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 34, n. 6, p. 554–563, 2016.

OLIVEIRA, F.H.P.C.D. **Fisiologia de *Bacillus subtilis* R14: crescimento e produção de lipopeptídeos em cultivos descontínuos**. 2006. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Produtos Bioativos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006. Disponível em: <<https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/1720>>. Acesso em: 01 nov. 2022.

SANHUEZA, V.M.R.; MELO, S.I. **Métodos usados no Biocontrole de Fitopatógenos**. 1 ed. Bento Gonçalves. Embrapa uva e vinho, 2007. 141 p.

SANTIAGO, A.P. *et al.* **Estudo da produção de beta-galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus***. Uberlândia – 2004. 6 páginas. Tese - Engenharia Química – Universidade de Uberlândia, Minas Gerais, 2004.

WEN, J.; ZHAO, X.; SI, F.; QI, G. Surfactin, a quorum sensing signal molecule, globally affects the carbon metabolism in *Bacillus amyloliquefaciens*. **Metabolic Engineering Communications**, v. 12, 2021.