



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



LAIS MAYARA MELO DURE

AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE FERMENTAÇÃO E FORMULAÇÃO DE *Bacillus velezensis* PARA USO COMO BIOPROTETOR NA AGRICULTURA

Botucatu

2022

LAIS MAYARA MELO DURE

AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE FERMENTAÇÃO E FORMULAÇÃO DE *Bacillus velezensis* PARA USO COMO BIOPROTETOR NA AGRICULTURA

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Proteção de Plantas (Programa de Pós-Graduação em Agronomia).

Orientador: Wagner Bettiol

BOTUCATU

2022

| | |
|-------|---|
| D955a | <p>Dure, Laís Mayara Melo</p> <p>Avaliação de métodos de fermentação e formulação de <i>Bacillus velezensis</i> para uso como bioprotetor na agricultura / Laís Mayara Melo Dure. -- Botucatu, 2022 70 p. : il., tabs.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu Orientador: Wagner Bettiol</p> <p>1. <i>Bacillus</i> spp.. 2. Controle Biológico. 3. Formulação de bioprodutos. 4. Processos fermentativos. I. Título.</p> |
|-------|---|

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE FERMENTAÇÃO E DE FORMULAÇÃO DE *Bacillus velezensis* PARA USO COMO BIOPROTETOR NA AGRICULTURA

AUTORA: LAÍS MAYARA MELO DURÉ

ORIENTADOR: WAGNER BETTIOL

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. WAGNER BETTIOL (Participação Virtual)
Microbiologia Ambiental / Embrapa Meio Ambiente



Prof. Dr. EDSON LUIZ FURTADO (Participação Virtual)
Proteção de Plantas / Universidade Estadual Paulista - câmpus Botucatu



Pesquisadora Dr.ª LAURA BONONI (Participação Virtual)
Proteção de Plantas / NOOA Ciência e Tecnologia Agrícola



Prof.ª Dr.ª BIANCA OBÉS CORREA (Participação Virtual)
Fitopatologia / Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal



Pesquisadora Dr.ª ZAYAME VEGETTE PINTO (Participação Virtual)
Ballagro Agro Tecnologia Ltda.



Botucatu, 21 de julho de 2022

A todas as pessoas que me incentivaram e apoiaram nesta jornada. Em especial, minha avó

Edla de Faro Valença (*in memoriam*).

Dedico

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Adriana Lara Valença Melo, minha irmã Camila Adriane Melo Duré, por estarem sempre ao meu lado, me apoiando e incentivando.

Ao Prof. Wagner Bettiol, pela orientação, confiança, paciência e, principalmente, pela dedicação e ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Microbiologia Ambiental “Raquel Ghini” da Embrapa Meio Ambiente, em especial à Neusa, Rosely e Carol.

À Embrapa Meio Ambiente, pela oportunidade de desenvolver esta tese e oportunidade para meu aperfeiçoamento profissional.

Aos amigos que fiz nesta jornada e que se mantiveram firmes e fortes ao meu lado nas intermináveis fermentações, sem perder o bom humor.

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

À Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrônômicas, pela oportunidade da realização do doutorado no Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas.

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

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código do Financiamento 001

A todos que contribuíram com o desenvolvimento e finalização desta pesquisa.

RESUMO

Bacillus é um dos gêneros de bactérias com diversidade biotecnológica reconhecidos por secretarem vários metabólitos que promovem o crescimento das plantas e previnem a infecção por patógenos. O presente trabalho teve como objetivo otimizar a produção de endósporos do isolado de *Bacillus velezensis* AP-3 via fermentação líquida e fermentação semi-sólida; produzir uma formulação de fungicida biológico à base de endósporo, bem como avaliar o potencial como agente de controle de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* e como promotor de crescimento em plantas de feijão. Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia Ambiental “Raquel Ghini” e em Casa de Vegetação da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP. Nos ensaios conduzidos em laboratório foram otimizadas combinações entre variáveis que interferem no processo fermentativo, tanto em meio semi-sólido, como líquido. A partir de suspensões destes meios foi estudado o potencial antagonista do isolado por meio da produção de antibióticos e metabólitos contra *S. sclerotiorum* e *F. oxysporum* f. sp. *lycopercisi*. Também foram obtidas formulações em pó utilizando talco e fécula de batata. O ensaio de promoção de crescimento de plantas consistiu em avaliar os formulados em diferentes formas de aplicação (tratamento de semente, aplicação no sulco de semeadura e tratamento de sementes em associação com aplicação em sulco de semeadura). As modificações de variáveis no meio de cultura alteraram a quantidade de endósporos produzidos por *B. velezensis* AP-3. A produção via fermentação em estado sólido com farinha de arroz e fécula de batata foi viável quando fermentadas por 7 dias em meio com 60% de umidade, sendo as maiores medias de concentrações de $2,06 \times 10^8$ e $1,82 \times 10^8$ UFC g⁻¹. Por outro lado, o meio de Melaço + Farelo de Algodão produziu $1,69 \times 10^9$ UFC mL⁻¹ de endósporos de *B. velezensis* via fermentação submersa. As formulações obtidas a partir dos endósporos produzidos via fermentação submersa em mistura com talco e fécula de batata apresentaram viabilidade estável em formulações por até 226 dias (última avaliação). O isolado inibiu o crescimento micelial dos dois patógenos testados, além disso, apresentou potencial para promoção de crescimento de plantas de feijão influenciando positivamente o desenvolvimento do sistema radicular.

Palavras-chave: *Bacillus* spp.; controle biológico; formulação de bioprodutos; processos fermentativos.

ABSTRACT

Bacillus is one of the bacteria genera with biotechnological diversity recognized for secreting several metabolites that promote plant growth and prevent infection by pathogens. The objectives of this study were to optimize endospore production of *Bacillus velezensis* strain AP-3 via liquid fermentation and semi-solid fermentation; to produce an endospore-based biofungicide formulation, as well as to evaluate its potential as a control of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, and as a growth promoter in bean plants. The assays were carried out at the Laboratory of Environmental Microbiology "Raquel Ghini" and at the greenhouse of Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP. In the assays carried out in the laboratory combinations between variables that interfere in the fermentation process were optimized, both in solid and liquid media. From suspensions of these media, the antagonistic potential of the isolate was studied through the production of metabolites against *S. sclerotiorum* and *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Powder formulations were obtained in talc and potato starch. The plant growth promotion assays consisted of evaluating the formulas in several delivery application (seed treatment, application in the sowing furrow and seed treatment associated with application in the sowing furrow). The variables evaluated in the culture medium changed the concentration of endospores produced by *B. velezensis* AP-3. Solid-state fermentation in medium containing rice flour and potato starch was viable when fermented for 7 days in a medium with 60% humidity, with the highest mean concentrations of 2.06×10^8 and 1.82×10^8 UFC g⁻¹. On the other hand, the Molasses + Cotton Bran medium produced 1.69×10^9 CFU mL⁻¹ of *B. velezensis* via submerged fermentation. The formulations obtained from the endospores produced via submerged fermentation in a mixture with talc and potato starch showed stable viability in formulations for up to 226 days (last evaluation). The isolate inhibited the mycelial growth of the two pathogens evaluated, in addition, it showed potential for promoting the growth of bean plants, positively influencing the development of the root system.

Keywords: *Bacillus* spp.; biological control; formulation of bioproducts; fermentation processes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Esquema das principais fases do ciclo de vida de *Bacillus* spp.....28
- Figura 2 - Diagrama de Pareto ($\alpha < 0,05$) com os efeitos padronizados dos fatores na produção de endósporos de *Bacillus* AP-3 em diferentes substratos (UFC g⁻¹) 45

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Variáveis e seus valores codificados e níveis utilizados no planejamento experimental de Plackett-Burman para otimização da produção de unidades formadoras de colônia do isolado de <i>Bacillus velezensis</i> AP-3 em meio sólido | 37 |
| Tabela 2 - Composição dos meios líquidos utilizados para otimização da produção de unidades formadoras de colônia e número de endósporos do isolado de <i>Bacillus</i> AP-3 | 38 |
| Tabela 3 - Rendimento da produção de endósporos de <i>Bacillus velezensis</i> AP-3 obtidos através de fermentação sólida – Desenho experimental do tipo Plackett-Burman 12 com 3 pontos centrais | 40 |
| Tabela 4 - Valores estimados dos efeitos e valores de <i>P</i> para umidade (%), teor de nitrogênio (%), tempo de fermentação (dias) e substrato (farinha de arroz e fécula de batata) na produção de unidades formadoras de colônia do isolado de <i>Bacillus velezensis</i> AP-3 em meio sólido..... | 44 |
| Tabela 5 - Produção das unidades formadoras de colônias (UFC mL ⁻¹) de <i>Bacillus velezensis</i> AP-3 em diferentes meios de culturas sob fermentação líquida. | 45 |
| Tabela 6 - Antibiose pela produção de antibióticos metabólitos por diferentes meios de cultura contra <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. lycopersici | 46 |
| Tabela 7 - Formulação de <i>Bacillus velezensis</i> AP-3 em fécula de batata e talco utilizando meios líquidos | 47 |
| Tabela 8 - Viabilidade de esporos de <i>Bacillus velezensis</i> AP-3 formulados em fécula de batata e talco após 30, 55, 124 e 226 dias (DAF) de armazenamento da formulação..... | 48 |
| Tabela 9 – Efeito dos produtos formulados à base de <i>Bacillus velezensis</i> AP-3 aplicados via tratamento de sementes e no sulco de semeadura no desenvolvimento de feijoeiro. | 49 |

SUMÁRIO

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 19 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA..... | 22 |
| 2.1 | Controle Biológico..... | 22 |
| 2.2 | Gênero <i>Bacillus</i>..... | 24 |
| 2.2.1 | Habitat e Fisiologia..... | 25 |
| 2.2.2 | Esporulação..... | 26 |
| 2.2.3 | Produção de Antibióticos e Metabólitos..... | 28 |
| 2.2.4 | Promoção de Crescimento em Plantas..... | 30 |
| 2.3 | Processos Fermentativos para a Produção de Microrganismos..... | 31 |
| 2.4 | Formulação de Agentes de Controle a Base de <i>Bacillus</i>..... | 34 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 36 |
| 3.1 | Isolados e Manutenção da Cultura..... | 36 |
| 3.2 | Otimização da Fermentação Sólida em Diferentes Substratos..... | 36 |
| 3.3 | Otimização da Fermentação Líquida..... | 39 |
| 3.4 | Antibiose Avaliada pela Produção de Antibióticos e Metabólitos..... | 40 |
| 3.5 | Formulação de <i>Bacillus</i> em Talco e Fécula de Batata..... | 41 |
| 3.6 | Promoção de Crescimento de Feijoeiro..... | 41 |
| 4 | RESULTADOS..... | 43 |
| 5 | DISCUSSÃO..... | 50 |
| 6 | CONCLUSÕES..... | 55 |
| | REFERÊNCIAS..... | 57 |

1 INTRODUÇÃO

As doenças das plantas causadas por bactérias e fungos podem levar a uma redução do potencial de produção na ausência de medidas adequadas de controle. Além disso, o uso excessivo e descontrolado de pesticidas químicos pode levar à diminuição da produção das culturas devido ao desenvolvimento da resistência dos patógenos aos princípios ativos (DIMKIC et al., 2022).

Devido à preocupação da sociedade diante do uso demasiado de agrotóxicos na agricultura e seus potenciais problemas, tanto à saúde pública quanto ao equilíbrio dos sistemas biológicos, tem-se buscado um sistema de produção apoiado em princípios ecológicos (SINDHU et al., 2016; SHARMA et al., 2019). Essas intervenções para o manejo de pragas e doenças reduzem o contato humano com pesticidas químicos e diversas abordagens têm sido utilizadas para minimizar ou reduzir a aplicação de agrotóxicos (SEHRAWAT et al., 2022). Vários microrganismos estão sendo explorados como agentes de biocontrole no sistema de manejo integrado de pragas (MIP) (CUCU et al., 2019; LEYBOURNE et al., 2020).

O controle biológico de doenças surge como uma possibilidade para o manejo de diferentes fitopatógenos, devido ao emprego de diferentes espécies de microrganismos (MORANDI; BETTIOL, 2009; KONG et al., 2016). Além disso, é uma técnica eficaz e segura, reduzindo os impactos negativos dos agroquímicos no ambiente, nos alimentos e na resistência dos patógenos (THAKKAR; SARAFI, 2015). Os agentes microbianos de controle biológico protegem as culturas contra danos por doenças via diferentes mecanismos de ação, tais como: antibiose, parasitismo, competição, predação ou indução de resistência (PIETERSE et al., 2014; CONRATH et al., 2015; FIRA et al., 2018).

Dentre as bactérias com efeito antagonista contra fitopatógenos destacam-se as do gênero *Bacillus* (KOREJO et al., 2017; SENDI et al., 2020). Na busca de agentes de controle biológico para a agricultura sustentável, a descoberta de *Bacillus* spp. é muito significativa, pois estudos indicam que essas bactérias são promissores agentes de biocontrole de fitopatógenos e promoção do crescimento de plantas. *Bacillus* produzem um amplo espectro de moléculas bioativas com atividades antagônicas, e ainda produzem metabólitos secundários, incluindo lipopolipeptídeos e bacteriocinas

entre outros (CAWOY et al., 2011; DEVI et al., 2019; ANDRÍ; MEYER; ONGENA, 2020).

Espécies de *Bacillus* são conhecidas por melhorar o desenvolvimento e o crescimento das plantas. O principal meio e a abordagem para o estímulo do crescimento incluem a produção de fitohormônios estimulantes do crescimento, solubilização e mobilização de fosfato insolúvel presente no solo, produção de componentes proteicos, como sideróforos, e produção de antibióticos (WU et al., 2014; GUPTA et al., 2015; RIBEIRO et al., 2018). Além destas propriedades benéficas, este gênero bacteriano está envolvido na inibição da produção de etileno e estimulação da resistência sistêmica da planta contra fitopatógenos (SANTNER; ESTELLE, 2009).

A produção e comercialização dos produtos biológicos passa pela otimização de sua produção em massa, sendo os processos de produção a partir de fermentações considerado de grande relevância. Neste processo podem ser utilizados resíduos da agroindústria e materiais que tornem a produção eficiente e de baixo custo. Atualmente, diversos produtos são obtidos nos processos fermentativos gerados pelos metabolismos primário e secundário do microrganismo cultivado concomitante à produção de biomassa, enzimas e proteínas (WARD, 1991). Os processos microbianos ocorrem na fermentação submersa (FSM ou fermentação líquida) e na em estado semi-sólido ou sólido (FES). No entanto, para escala industrial a fermentação submersa é a mais utilizada (CASTRO; FERREIRA, 2010). Na fermentação semi-sólida a utilização de água é limitada, a necessidade de energia é pequena, a porção de água perdida é insignificante e a alimentação de oxigênio é por difusão. Na fermentação submersa a utilização de água é ilimitada, a alimentação de oxigênio é por aeração, o volume da mistura de fermentação é amplo, a energia necessária é alta e os investimentos são altos (PANDEY, SOCCOL, LEON, 2001).

Os meios de cultura utilizados para a produção em massa de agentes de biocontrole devem ser projetados de modo a se obter o máximo de produção de biomassa e manter a eficácia das cepas microbianas. Além disso, é necessário maximizar a produtividade e reduzir os custos dos processos. Esses meios tem como base as fontes de carbono, nitrogênio e outros nutrientes, o pH e as condições ambientes como temperatura, agitação e taxa de oxigênio dissolvido (LEWIS, 1991). O uso de produtos e subprodutos como fontes de carbono e nitrogênio é uma maneira promissora de reduzir o custo para fornecer um meio de cultura econômico. Mas, a

presença de alguns materiais indesejáveis nesses produtos ou subprodutos e também a heterogeneidade do material pode limitar seu uso em um processo industrial (ZABRISKIE et al., 1980; YÁNEZ-MENDIZÁBAL et al., 2011). Portanto, a seleção e a otimização dos componentes mais significativos do meio de cultura são fundamentais para alcançar uma melhor fermentação (YÁNEZ-MENDIZÁBAL et al., 2011).

Visando ao desenvolvimento de meio de cultura econômico e a otimização das variáveis que interferem no processo de multiplicação, esse trabalho teve como objetivos otimizar a produção de endósporos de *Bacillus velezensis* AP-3 via fermentação líquida e fermentação semi-sólida; produzir uma formulação de biofungicida, em pó, contendo endósporos de *B. velezensis*; e avaliar o seu potencial no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* e na promoção de crescimento de plantas de feijão.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Controle Biológico

Controle biológico pode ser conceituado como o uso de um organismo para reduzir a densidade populacional de outro organismo. Entretanto, o conceito de controle biológico de doenças de plantas mais aceito pela comunidade é a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença, provocada por um patógeno, realizada por um ou mais organismos que não o homem (COOK; BAKER, 1983). O organismo utilizado é chamado de agente de controle biológico (JENSEN et al., 2016; TRONSMO et al., 2020). Também podem ser incluídos os metabólitos produzidos pelos agentes de biocontrole, como substâncias com atividades de sinalização e antibióticos. Frequentemente, os produtos à base dos agentes de biocontrole e/ou seus metabólitos são denominados biopesticidas (ROBERTS; TAYLOR, 2016).

O uso de agentes biocontrole vem aumentando consideravelmente, em parte, devido às mudanças no pensamento da sociedade (VEJAN et al., 2016). Os microrganismos antagônicos protegem as culturas por meio de diversos mecanismos de ação, sendo um deles a indução da resistência contra infecções por um patógeno nos tecidos vegetais sem interação antagônica com o patógeno (PIETERSE et al., 2014; CONRATH et al., 2015). Além disso, os bioagentes também podem agir por parasitismo, competição e antibiose (COOK; BAKER, 1983).

As rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPRs) também podem ser utilizadas como agentes de biocontrole e sua demanda está aumentando constantemente (LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009). Estudos abrangentes abriram caminho para a comercialização e seleção de vários isolados de *Bacillus* que podem ser empregadas como agentes de biocontrole (SYRANIDOU et al., 2016). A utilização de *Bacillus* está crescendo extensivamente, pois esses organismos possuem propriedades únicas (GAGNÉ-BOURQUE et al., 2015). Eles podem se multiplicar rapidamente, a maioria é resistente a diferentes condições ambientais e possuem um amplo espectro de ação (SHAFI; TIAN; JI, 2017; BAHADIR et al., 2018).

Plantas e patógenos interagem com uma grande variedade de microrganismos. Essas interações podem afetar significativamente a saúde da planta de várias

maneiras. Alguns microrganismos promovem a saúde das plantas direta ou indiretamente (ODUM, 1953; BUKHAT et al., 2020; ELNAHAL et al., 2022). Os mecanismos de ação mais conhecidos no controle de fitopatógenos são: antibiose, parasitismo, competição e indução de resistência (ROMEIRO, 2007; KUMAR et al., 2012; JI et al., 2013).

A antibiose confere aos microrganismos um amplo espectro de ação, de forma a inibir fitopatógenos (RAO et al., 2016). A ação antimicrobiana, comumente demonstrada pelo desenvolvimento de uma zona de inibição entre os dois organismos quando cultivados juntos em um meio sólido de crescimento, é a base para a seleção de microrganismos produtores de antibióticos (DEMAIN, 2006; ISLAM et al., 2012; CAWOY et al. 2015). Antagonistas que agem por competição podem modular condições de crescimento para o patógeno no nicho alvo, não apenas através da depleção de nutrientes, mas também por outros mecanismos. A competição por espaço ocorre principalmente pelo apoderamento dos sítios de colonização e a competição por nutrientes, por meio de elementos como carbono (C), nitrogênio (N) e ferro, indispensáveis para a maioria dos patógenos (PAULITZ, 1990; KÖHL; ROGIER; RAVENSBERG, 2019). A competição por nutrientes exsudados pelas raízes das plantas ocorre na maioria das interações entre bactérias e fitopatógenos radiculares (WELLER, 1988). Algumas rizobactérias que apresentam elevada afinidade por Fe exibem potencial em reduzir o crescimento de microrganismos fitopatogênicos nos solos com a restrição desse elemento (BRUNETTA, 2006). A competição por ferro pode ser mediada por substâncias produzidas por organismos biocontroladores e promotores de crescimento vegetal, quelantes deste elemento denominadas sideróforos (DAS et al., 2007; RAO et al., 2016). Alguns fungos causadores de doenças em plantas produzem compostos fitotóxicos que também agem como quelantes de ferro, sendo o sequestro de ferro uma vantagem competitiva de um microrganismo sobre outro (HAAS; EISENDLE; TURGEON, 2008).

Parasitismo é considerado um fenômeno em que determinado microrganismo se nutre das estruturas vegetativas e/ou reprodutivas do outro (BETTIOL; MORANDI, 2009). Os termos hiperparasitismo, micoparasitismo e parasitismo são utilizados em referência ao mesmo fenômeno. Os hiperparasitas atacam hifas, estruturas de resistência e de reprodução dos fitopatógenos (MELO, 1998). Para dar início ao parasitismo é necessário que ocorra o encontro e o reconhecimento dos fungos (JI et al., 2013). Observações das reações de tubos germinativos de fungos numa mistura

de hospedeiro e parasita indicam fortemente que contato entre hifas de dois organismos não ocorre ao acaso e sim mostram tropismo positivo em direção ao hospedeiro e a penetração ocorre rapidamente. Assume-se que substâncias são secretadas pelas células hospedeiras em pequenas quantidades, porém suficientes para atuarem como atrativo (PEREIRA, RAMALHO, ABREU, 2009).

A indução de resistência ocorre quando há um aumento na capacidade de defesa de uma planta por estímulos adequados (GARBEVA; WEISSKOPF, 2020). Segundo Manoussopoulos et al. (2019), para que o processo seja iniciado é preciso que um sinal externo (elicitador) esteja ligado a um receptor na superfície da célula, ativando os mensageiros secundários, com isso aumentam os sinais e regulam a expressão de genes específicos, desenvolvendo as relações de compatibilidade (doença) ou incompatibilidade (resistência). O estímulo de resistência ocorre em consequência de uma infecção localizada ou por tratamentos com compostos ou produtos de origem microbiana ou através de componentes orgânicos ou inorgânicos (BONALDO; PASCHOLATI; ROMEIRO, 2005; JABER; OWNLEY, 2018).

2.2 Gênero *Bacillus*

O gênero *Bacillus* foi descrito pela primeira vez por Cohn em 1872 (CLAUS; BERKELEY, 1986; KOKCHA et al., 2012) e compreende bactérias Gram-positivas, aeróbicas obrigatórias ou facultativas (ISLAN; RAHMAN; PANDEY, 2019) que se desenvolvem em diversas fontes de carbono, além de formarem endósporos como estrutura de sobrevivência em períodos de estresse ambiental (calor, radiação e dessecação entre outros) (MADIGAN et al., 2016).

Bacillus é um importante gênero bacteriano que é frequentemente isolado do solo. O gênero, atualmente, é composto por cerca de 300 espécies descritas (ALCARAZ et al., 2010; DUNLAP, 2019). A heterogeneidade taxonômica do gênero é conhecida há muito tempo e reforçada com os primeiros estudos de 16S rRNA do gênero (STACKEBRANDT et al., 1987; ASH et al., 1991). Porém, Fox, Wisotzkey e Jurtshuk Jr (1992) perceberam que o gene 16S rRNA era insuficiente para a resolução absoluta de algumas espécies do gênero. O grupo *Bacillus subtilis*, que inicialmente era composto por *B. subtilis*, *B. licheniformis* e *B. pumilus*, é um dos mais importantes (GIBSON, 1944). O número de espécies pertencentes a este grupo aumentou

rapidamente nos últimos anos, englobando 22 espécies e três subespécies descritas (DUNLAP et al., 2016c; LIU et al. 2016).

A genômica permite identificar mais facilmente novas espécies, além de contribuir na correção de muitos erros taxonômicos nesta área. O erro mais comum está em descrever a mesma espécie mais de uma vez (DUNLAP et al., 2017). *Bacillus velezensis* é um exemplo deste equívoco, sendo descrita quatro vezes com nomenclaturas diferentes. Uma vez que os genomas dessas cepas foram sequenciados ficou evidente que essas espécies eram todas pertencentes aos mesmos táxons tornando *B. methylotrophicus*, *B. oryzicola* e *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* sinônimos de *B. velezensis* (DUNLAP et al., 2016b). *Bacillus vanillea* foi considerado sinônimo de *Bacillus siamensis* (DUNLAP, 2015). *Bacillus malacitensis* e *B. axarquiensis* foram reclassificados como *B. halotolerans* (DUNLAP et al., 2016a) e *B. invictae* é sinônimo de *B. altitudinis* (LIU et al., 2015).

2.2.1 Habitat e Fisiologia

Bacilli estão amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados em diversos nichos ecológicos. As espécies deste gênero estão entre as mais amplamente distribuídas, comumente encontrados no solo e associados a ambientes com presença de plantas e fontes de água, como rios, estuários e águas costeiras (KOKCHA et al., 2012). A maioria das espécies são inofensivas para humanos e animais, e apenas alguns foram identificados como patógenos, incluindo *B. anthracis*, o agente causador do antraz e *B. cereus*, que causa intoxicação alimentar e vários patógenos de insetos (ALCARAZ et al., 2010).

Diferentes espécies foram isoladas de variados habitats terrestres, marinhos e aquáticos (SIEFERT et al., 2000; MIRANDA; MARTINS; CLEMENTINO, 2008; SHUAIB et al., 2021), tanto em ambientes de elevada temperatura quanto em temperatura amena (LOGAN et al., 2000), como também no interior de tecidos de diversas culturas (RIJAVEC et al., 2007; LIU et al., 2009; KAMPFER et al., 2015). Também foram isoladas espécies de *Bacillus* em várias plantas terrestres e halófitas, e algumas demonstraram ser endofíticas (BIBI et al., 2012).

As características fisiológicas como parede celular multicamadas, formação de endósporos que são resistentes ao estresse, excreção de antibióticos peptídicos

variados, moléculas de peptídeo e enzimas extracelulares são onipresentes em *Bacillus* spp., e esses atributos ajudam na proliferação e sobrevivência das células bacterianas sob várias condições climáticas adversas (AIZAWA et al. 2010; FAN et al. 2011).

A formação de endósporos ocorre quando níveis de nitrogênio, carbono e fósforo estão abaixo do limite ideal para o crescimento (EARL; LOSICK; KOLTER, et al., 2008). Essas estruturas, ambientalmente resistentes e metabolicamente inativas, permitem sua sobrevivência sob condições ambientais deficientes e extremas, incluindo altas temperaturas, radiação ionizante, pH desfavorável e dessecação do solo, não germinando até que as condições ambientais se tornem favoráveis ao crescimento e ao desenvolvimento (HIGGINS; DWORKIN, 2011; BAHADIR et al., 2018). Os endósporos são transportados pelo ar e podem ser disseminados pelo vento (MERRILL et al., 2006).

Bacillus apresentam extraordinária diversidade metabólica e estilos de vida que incluem termófilos, psicrófilos, alcalófilos e acidófilos (CLAUS; BERKELEY, 1986; PRIEST et al., 1993), sendo metabolicamente quimiorganotróficos, isto é, dependentes de compostos orgânicos como fontes de carbono e energia (PRIEST et al., 1989; HAMDACHE et al. 2011).

O grupo *B. subtilis* inclui muitos dos mais conhecidos *Bacillus* e incluem anaeróbios facultativos, como *B. licheniformis*, que crescem na ausência de aceptores de elétrons exógenos, e aeróbios, como *B. subtilis* que crescem fracamente na ausência de oxigênio, exceto na presença de nitrato, que eles podem usar como alternativa acceptor de elétrons (HOFFMAN et al., 1995). O grupo *B. sphaericus* é estritamente oxidativo, usando acetato ou aminoácidos em vez de açúcares como fontes de carbono e energia. Os membros deste grupo são os únicos entre os *Bacillus* por ter o ácido meso diaminopimélico que geralmente está presente nas paredes celulares substituído por lisina ou ornitina (RUSSELL; JELLY; YOUSTEN, 1989).

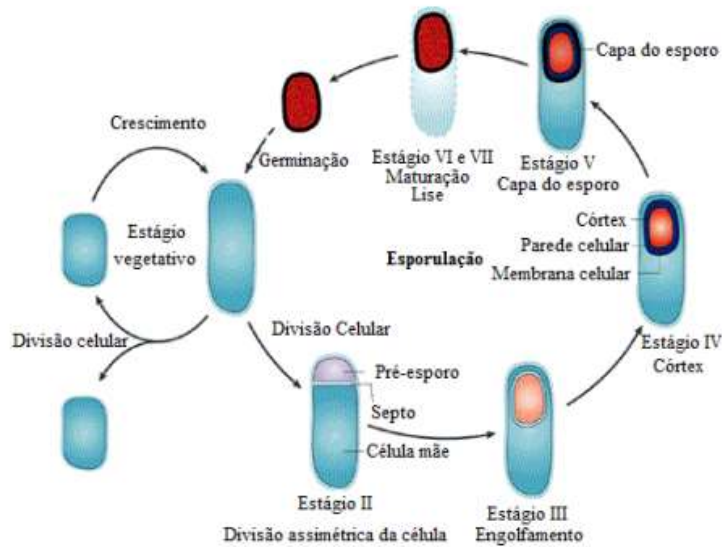
2.2.2 Esporulação

A esporulação é um processo de desenvolvimento no qual os *Bacillus* sobrevivem em condições de estresses, como os químicos e físicos (STRAGIER; LOSICK, 1996). Sua transição de dormência das células vegetativas envolve a germinação e o crescimento. Sob condições de laboratório a 37°C, a esporulação

demora aproximadamente 8 horas. O processo foi dividido em uma série de etapas que são definidas principalmente com base de sua morfologia. Esses estágios, rotulados como 0, II, III, ... a VII, onde o estágio I não é mais reconhecido, estão amplamente correlacionados com o tempo (em horas) após a indução da esporulação (Figura 1). A esporulação só é iniciada no final do ciclo celular vegetativo quando a célula tem duas cópias completas do cromossomo e é induzida em resposta à privação de nutrientes e só é iniciada após a falha de transição processos de fase (por exemplo, motilidade e quimiotaxia, produção de hidrolases macromoleculares, desenvolvimento de competência) para restaurar o crescimento vegetativo (REAL; HENRIQUES, 2001).

O primeiro estágio morfologicamente distinto é o estágio II, que é definido pela formação de um evento de divisão celular assimétrica que divide a célula em dois compartimentos, o esporângio maior (ou célula mãe) e o pré-esporo. Durante o estágio II o pré-esporo é completamente envolvido pelo esporângio de modo que, no estágio III os dois compartimentos são separados por um sistema de membrana dupla. Durante a fase IV o peptidoglicano é estabelecido entre as duas membranas para formar o córtex do esporo e a parede da célula germinativa. Durante esta fase, o pré-esporo torna-se refratário à luz. Nos estágios V e VI as proteínas do revestimento dos esporos são depositadas na superfície da membrana interna e externa do pré-esporo. À medida que estes amadurecem o esporo torna-se cada vez mais resistente a produtos químicos e calor. No estágio final, estágio VII, o esporo, agora desidratado, é liberado do esporângio por lise celular. O esporo totalmente maduro é metabolicamente inativo e capaz de sobreviver como tal por dezenas, e possivelmente centenas, de anos (REAL; HENRIQUES, 2001).

Figura 1 - Esquema das principais fases do ciclo de vida de *Bacillus* spp.



Fonte: Adaptado de Errington (2005).

A esporulação é um processo rigidamente controlado que requer a expressão diferencial de genes nos cromossomos em cada um dos dois compartimentos, bem como pontos de verificação de desenvolvimento para garantir a sincronia entre seus padrões de desenvolvimento (STRAGIER; LOSICK, 1996).

A germinação é desencadeada por uma variedade de agentes químicos e estímulos físicos e os esporos de *B. subtilis* germinam em resposta à L-alanina ou a uma mistura de asparagina, glicose, frutose e KCl. A germinação é acompanhada por rápidas mudanças químicas e fisiológicas, incluindo a degradação do córtex do esporo, revestimento de esporos, reidratação e inchaço. Essas mudanças são acompanhadas por perda de calor e resistência química, e durante o crescimento a célula começa a aumentar em massa e replicar seu DNA, formando um cilindro, alongando a célula, que só posteriormente é reduzida a um tamanho normal por uma divisão celular retardada (STRAGIER; LOSICK, 1996).

2.2.3 Produção de Antibióticos e Metabólitos

De modo geral, membros do gênero *Bacillus* são considerados fábricas microbianas eficientes para a produção de inúmeras moléculas bioativas e pela síntese de metabólitos com notável diversidade tanto na estrutura quanto na função e

atividade contra uma variedade de microrganismos (COCHRANE; VEDERAS, 2016). Algumas espécies de *Bacillus* produzem diferentes tipos de compostos antibióticos, como fenazinas, pirrolnitrina e pioluteorinas, bem como lipopeptídeos, como fengicina, iturina ou surfactina, tornando-se conveniente para a indústria agrícola por inibirem o crescimento de fitopatógenos (FRIKHA-GARGOURI et al., 2017).

Todos os membros do grupo das iturinas têm forte atividade antifúngica contra uma série de fitopatógenos de importância agrícola, e conseqüentemente, cepas produtoras desses compostos apresentam potencial de biocontrole e agentes promotores de crescimento de plantas (MIHALACHE et al., 2017). Sua fungitoxidade está relacionada à interação com a membrana citoplasmática das células-alvo, resultando na formação de poros condutores de íons e o aumento da permeabilidade K^+ . Tanto a composição lipídica da membrana alvo, como a estrutura do peptídeo cíclico, determinam a sua eficiência (CAWOY et al. 2011; RASHAD et al., 2020). Outros lipopeptídeos pertencentes à família das iturinas e produzidas por espécies de *Bacillus* incluem bacilomicina D (GU et al., 2017), bacilomicina DC (JIN et al., 2017) e micosubtilina (WU et al., 2018). As bacteriocinas atuam como mecanismos de defesa contra microrganismos competidores (BERINI et al. 2018) e não são letais para as cepas que produzem o metabólito, mas letal para outros microrganismos (AYED et al. 2015).

Comparada às iturinas e surfactinas, as fengicinas são menos hemolíticas, mas apresentam forte atividade antifúngica, sendo um elicitador da defesa de plantas, exibindo atividade antagônica contra fungos fitopatogênicos filamentosos como *Rhizoctonia solani* e *Paecilomyces varioti* (FARZAND, et al., 2020). No entanto, sua ação é ineficiente no controle de bactérias e leveduras (MONDOL; SHIN; ISLAM, 2013). O modo de ação das fengicinas é pouco conhecido comparado aos demais lipopeptídeos, entretanto, sabe-se que o seu efeito é dependente da sua concentração (ROMEIRO et al., 2007). Em altas concentrações essas moléculas alteram a estrutura e a permeabilidade da membrana celular (ZHANG; SUN, 2018; ATHANASOPOULOS et al., 2020).

A surfactina provavelmente não está envolvida contra o crescimento de fungos, mas auxilia a bactéria em colonizar tecidos radiculares e se estabelecer na rizosfera de plantas através da formação de uma camada de biofilme (CAWOY et al., 2015).

As iturinas e fengicinas inibem o crescimento de uma vasta gama de microrganismos patogênicos, e apresentam estruturas semelhantes, apesar de

diferirem em alguns aspectos biológicos em relação a sua atividade. As surfactinas, somente na presença de iturina A, apresentam efeito sinérgico contra fungos fitopagênicos (KULIMUSH et al., 2017) e baixa ação antimicrobiana contra fitobactérias (LANNA FILHO; FERRO; PINHO et al., 2010).

2.2.4 Promoção de Crescimento em Plantas

Considerado uma das principais rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR), os *Bacillus* são capazes de promover o crescimento vegetal de forma direta ou indiretamente (FANNING; GRIESHOP; ISAACS, 2018). As estirpes das espécies deste gênero são mais estudadas na agricultura por auxiliar no crescimento e apresentar potencial para atuar como agente de controle biológico de doenças e pragas, bem como estimular mecanismos capazes de aumentar a resistência de plantas a diversos estresses ambientais como seca, metais pesados e escassez nutricional do solo (CLEMENTE et al., 2016; RIBEIRO et al., 2018).

As rizobactérias promovem o crescimento das plantas através da mobilização de nutrientes nos solos; produzindo numerosos compostos que exibem atividade no controle do crescimento e desenvolvimento da planta; protegendo-as do ataque de fitopatógenos através do controle ou inibição dos mesmos; melhorando a estrutura do solo e biorremediando os solos poluídos, sequestrando espécies tóxicas de metais pesados e degradando compostos xenobióticos (como pesticidas) (HAYAT et al., 2010; RAJKUMAR et al., 2010; AHMED, 2012). As PGPR podem atuar de forma direta ou indireta favorecendo o crescimento por intervenção de diversos mecanismos, os quais podem agir individualmente ou em sinergia, porém, alguns modos de ação não respondem de forma independente (SPAEPENEN; VANDERLEYDEN, 2011).

Um dos mecanismos diretos para promover o crescimento das plantas é a produção de fitohormônios que incluem auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e ácido abscísico (ABA). Os mecanismos indiretos incluem a produção de substâncias inibidoras, que atuam contra fitopatógenos, aumentando a resistência natural e liberando sideróforos. Portanto, muitas PGPR aumentam o número e/ou comprimento raízes laterais. Alguns desses efeitos, incluindo aumento da biomassa de raízes e brotações, também são documentados para plantas inoculadas com PGPR crescendo

no solo. As rizobactérias modificam a arquitetura do sistema radicular através de sua capacidade de interferir com o equilíbrio hormonal da planta. O equilíbrio hormonal inclui citocinina, etileno, giberelina, auxinas e ácido abscísico (VEJAN et al., 2016).

2.3 Processos Fermentativos para a Produção de Microrganismos

A capacidade de isolados selecionados de *Bacillus* para produzir e secretar grandes quantidades de enzimas extracelulares estão entre os mais importantes produtores industriais de enzimas (MANABE et al., 2013). Este gênero bacteriano tem grande atrativo industrial por disporem de muitas características vantajosas, tais como: sua elevada taxa de crescimento, o que leva a um curto tempo para a fermentação; sua habilidade de secretar proteínas para um meio extracelular, além de elaborar muitas classes de antibióticos, alguns produtos com uso industrial, tais como: endotoxinas, biopesticidas, purinas, nucleotídeos, entre outros (CORRÊA, 2009).

Para a produção comercial, a seleção cuidadosa de fontes de carbono e nitrogênio, bem como suplementos minerais, são necessários para o crescimento e esporulação ideais do microrganismo. Além disso, a relação carbono/nitrogênio (C:N) também é de grande importância na otimização do suprimento médio de nutrientes (FISHER, 1993; CARVALHO et al., 2010).

O meio empregado e as condições do processo desempenham um papel crítico na fermentação industrial, para a obtenção da concentração adequada na elaboração de um determinado produto. Assim sendo, para um processo econômico é necessário considerar o aperfeiçoamento do meio de fermentação e as condições do processo, a fim de potencializar os lucros (SCHIMIDT, 2005). Na otimização dos processos fermentativos, distintas associações e sequências de condições de processo e de elementos do meio necessitam ser investigadas para determinar o sucesso do processo (STANBURY; WHITAKAR; HALL, 1996).

A produção de *Bacillus* pode ser por meio de fermentação submersa ou líquida (FSm ou FL) ou semi-sólida ou sólida (FSS). No entanto, para escala industrial a fermentação líquida é a mais utilizada (CASTRO; FERREIRA, 2010).

O método de cultivo utilizado pode impedir ou facilitar a produção de certas enzimas e metabólitos de interesse, como por exemplo as quitinases, que podem ser produzidas através da FSm e da FSS (BERINI et al. 2018). De acordo com Shen et al. (2016), o cultivo em batelada está entre os métodos mais utilizados para a produção de metabólitos, pois envolve o cultivo de células em um volume específico de meio e substratos, permitindo o controle de diferentes parâmetros como temperatura, pH, disponibilidade de nutrientes, entre outros, durante todo o período de incubação (MAIER, 2009).

A temperatura na qual as culturas bacterianas são incubadas é de extrema importância para que haja produção ideal de metabólitos ou enzimas hidrolíticas (CHEBA et al., 2018). O pH e a disponibilidade de oxigênio também podem afetar a produção de metabólitos. Processos celulares importantes, como a regulação da biossíntese de metabólitos primários e secundários, podem ser afetados por flutuações no pH inicial do meio (AYED et al., 2015). A produção de surfactina depende do pH, enquanto o oxigênio influencia a expressão da micosubtilina (MONGKOLTHANARUK, 2012).

O termo fermentação em estado sólido (FSS) ou fermentação em meio semi-sólido é definido como o processo de crescimento de microrganismos realizado na ausência de líquido de fluxo livre (embora contenha água suficiente para permitir o crescimento os microrganismos), usando um material não solúvel que atua como suporte sólido e fonte de nutrientes (RAIMBAULT, 1998; PANDEY, 2003; SANTOS, 2007). Segundo Palma (2003), esta técnica consiste no crescimento de microrganismos sobre partículas porosas úmidas. Deste modo, o teor de água na FSS varia de 30% a 85% e funciona como um solvente para fornecer nutrientes, eliminar resíduos metabólicos e manter as estruturas biológicas organizadas nos níveis molecular e celular.

Para Pandey (2003), na fermentação sólida os substratos utilizados são em geral, resíduos ou subprodutos agroindustriais com capacidade em fornecer os nutrientes essenciais requeridos pelos microrganismos, além de servir como suporte para o crescimento celular. Os substratos oriundos de resíduos agroindustriais têm a celulose, hemicelulose, lignina, amido, pectina e proteínas como principais componentes que servem como fonte de carbono para o crescimento dos

microrganismos e são considerados materiais extremamente heterogêneas (PANDEY, 2003).

O controle dos parâmetros fermentativos tais como controle de pH, temperatura, agitação, água e homogeneização são tidos como os maiores problemas durante o processo de fermentação. Diante disto, o uso de câmara fluidizada onde o ar é insuflado com ar esterilizado foi recomendado para solucionar tais problemas (RODRIGUES; SANTANA, 2001).

A fermentação submersa tem como característica principal a utilização de um meio de cultura líquido sob agitação constante, com nutrientes solúveis (ALONSO, 2001; FAHEINA JUNIOR, 2012), no qual, os microrganismos ou mesmo outras células, desenvolvem-se em meio de cultivo com excesso de água sob agitação, sendo mais utilizado na produção comercial/escala industrial de bioprodutos microbianos (GIBBS; SEVIOUR; SCHIMID, 2000). Esta técnica foi mais estudada e, portanto, as instrumentações para o controle do processo são disponíveis em maior escala, tornando-o mais acessível que a FSS. Além disso, apresenta maior facilidade de monitoramento (KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002) e exige menos espaço.

A fermentação submersa apresenta considerável facilidade de cultivo em grande quantidade, devido a possibilidade de controlar parâmetros físico-químicos, como temperatura em razão da elevada porção de água, além de garantir homogeneidade do meio (COUTO; SANROMÁN, 2006; CASTRO; FERREIRA, 2010). O cultivo líquido é bastante utilizado e adequado para as bactérias (CHENG et al., 2003), sendo este, o sistema mais utilizado industrialmente para a obtenção de metabólitos (GIBBS; SEVIOUR; SCHIMID, 2000). Esse tipo de fermentação acaba sendo bastante utilizado pelas indústrias por causa da facilidade de escalonamento, manuseio e de controle de parâmetros de bioprocessos (NIGAM, 2009).

Entre as vantagens de se utilizar a fermentação submersa está a possibilidade do total controle do processo, além da facilidade da recuperação de biomassa, sendo realizada por filtração simples ou centrifugação (LIMA et al., 2003). E, comparando à FSS é mais fácil de controlar os parâmetros de fermentação, como pH e temperatura, além de permitir um melhor controle da contaminação e requerer menos espaço e trabalho (MASCARIN et al., 2015).

2.4 Formulação de Agentes de Controle à Base de *Bacillus*

Em uma formulação microbiana, o principal foco é preservar o microrganismo para aumentar sua eficiência contra os patógenos alvo. A formulação microbiana é dependente do isolado microbiano, embora possam ocorrer problemas físicos e necessidades nutricionais do microrganismo para permanecer ativo por mais tempo (KESWANI et al., 2016). Além disso, a formulação dos bioagentes é fundamental para a tecnologia de aplicação do produto, bem como para a vida de prateleira do produto.

As espécies de *Bacillus* são reconhecidas como bactérias seguras por produzir compostos industriais e substâncias benéficas para as plantas (STEIN, 2005). Este gênero bacteriano, é mais extensivamente estudado e formulado comercialmente (CAWOY et al. 2011). A diversidade genética, a capacidade de esporular e sobreviver em ambientes hostis, a colonização rápida e a ampla gama de ação contra fungos fitopatogênicos, auxiliados por diversos modos de ação, são algumas das razões pelas quais o gênero constitui na maioria das formulações de biocontrole disponíveis no mercado (CHALIVENDRA; HAM, 2019).

Inúmeros estudos têm discutido as etapas do processo de comercialização: isolamento e seleção de cepas antagonistas, determinação dos métodos de produção em massa, estudos toxicológicos, preparação de formulação, controle de qualidade e eficiência de campo (HU et al., 2011; RAMYABHARATHI; MEENA; RAGUCHANDER, 2012; LASTOCHKINA, 2019). O sucesso comercial de microrganismos requer viabilidade econômica, segurança e estabilidade, longa vida de prateleira, baixo custo e fácil disponibilidade de materiais para uma produção, além de facilidade de aplicação nas plantas (TEIXIDÓ et al.; 2011; GOTOR-VILA et al., 2017).

A disponibilidade de formulações de agentes de biocontrole eficazes e a sobrevivência ao armazenamento e rápida multiplicação e colonização pós-inoculação, são fatores que importantes para o sucesso do controle biológico para doenças de plantas (SALAZAR et al., 2022), no entanto, um dos principais obstáculos nas aplicações de campo da formulação de organismos a base de *Bacillus* como agentes de biocontrole é que seu desempenho em diferentes zonas agroclimáticas é inconsistente (GAO et al., 2016).

A diminuição da variabilidade e aumento da consistência dos resultados dos produtos biológicos estão entre alguns desafios no preparo de formulações. No

entanto, a necessidade contínua de produtos microbiológicos que apoiem a produção agrícola sustentável fará com que a descoberta e a comercialização de produtos à base de *Bacillus* seja uma busca atraente e lucrativa. Porém, a otimização desses organismos benéficos depende também de pesquisas sobre multiplicação, formulação e métodos de aplicação (RAHMAN; MOCCALDI, 2019).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Isolados e Manutenção das Culturas

O isolado de *Bacillus velezensis* AP-3 utilizado nos estudos foi obtido no Laboratório de Microbiologia Ambiental “Raquel Ghini” da Embrapa Meio Ambiente (Jaguariúna/SP, Brasil). Para a preservação, fragmentos de das colônias esporuladas foram colocados em tubos de criopreservação, contendo 1,5 mL de uma solução esterilizada de glicerol a 20% (v/v) e armazenados a -80 °C. O inóculo foi obtido a partir da transferência das culturas estoque para placas de Petri (90 x 10 mm) contendo nutriente ágar (NA) e incubado por dois dias a 28 ± 2 °C.

Os fungos fitopatogênicos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi*, pertencentes ao Laboratório de Microbiologia Ambiental “Raquel Ghini” da Embrapa Meio Ambiente, foram utilizados no estudo. Os isolados foram previamente cultivados em placas de Petri contendo meio de batata-dextrose-ágar (BDA) e incubados por sete dias a 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 12 h em BOD para produção de inóculo.

3.2 Otimização da Fermentação Semi-Sólida em Diferentes Substratos

A otimização da fermentação do isolado de *B. velezensis* AP-3 em diferentes substratos foi realizada utilizando o delineamento experimental de Plackett-Burman, o qual foi aplicado para estudar o efeito da umidade do substrato (%), teor de nitrogênio (% peso/peso), tempo de fermentação (dias) e substratos (farinha de arroz e fécula de batata) (Tabela 1).

Tabela 1 - Variáveis e seus valores codificados e níveis utilizados no planejamento experimental de Plackett-Burman para otimização da produção de unidades formadoras de colônias do isolado de *Bacillus velezensis* AP-3 em meio sólido.

| Fatores | Código | Níveis | | |
|-----------------------------|--------|---------|---------------|----|
| | | -1 | 0 | 1 |
| Umidade (%) | X1 | 30 | 45 | 60 |
| Teor de N (%) | X2 | 0 | 1 | 2 |
| Tempo de fermentação (dias) | X3 | 3 | 5 | 7 |
| Substratos | X4 | 10 g Fa | 5 g Fa:5 g Fb | Fb |

*Legenda: Fa: Farinha de arroz; Fb: Fécula de batata.

O delineamento foi composto por 12 ensaios + 3 pontos centrais, totalizando 15 ensaios, os quais foram repetidos por três vezes (Tabela 3). A fermentação foi realizada em Erlenmeyers de 250 mL, os quais foram preenchidos com 10 g de substrato e autoclavados a 121 °C e 1,1 kgf cm⁻² de pressão por 15 minutos. Na sequência, em cada tratamento, foi adicionado farinha de algodão esterilizada, ajustada a 1 e 2% do peso do substrato em nitrogênio e a umidade do substrato ajustada a 30, 45 e 60% (Tabela 1). A matriz do planejamento experimental com desenho do tipo Plackett-Burman para otimização da produção de unidades formadoras de colônias de *B. velezensis* AP-3 em meio sólido está apresentada na Tabela 2, juntamente no item resultados.

Tabela 2 - Rendimento da produção de endósporos de *Bacillus velezensis* AP-3 obtidos por meio de fermentação sólida – Desenho experimental do tipo Plackett-Burman 12 com 3 pontos centrais.

| Ensaio | X1 | X2 | X3 | X4 |
|--------|----|----|----|----|
| 1 | 1 | -1 | 1 | -1 |
| 2 | 1 | 1 | -1 | 1 |
| 3 | -1 | 1 | 1 | -1 |
| 4 | 1 | -1 | 1 | 1 |
| 5 | 1 | 1 | -1 | 1 |
| 6 | 1 | 1 | 1 | -1 |
| 7 | -1 | 1 | 1 | 1 |
| 8 | -1 | -1 | 1 | 1 |
| 9 | -1 | -1 | -1 | 1 |
| 10 | 1 | -1 | -1 | -1 |
| 11 | -1 | 1 | -1 | -1 |
| 12 | -1 | -1 | -1 | -1 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 0 |

X1: Teor de umidade; X2: Teor de nitrogênio; X3: Tempo de fermentação; X4: Substratos (Farinha de arroz e Fécula de batata).

O inóculo foi obtido a partir de colônias desenvolvidas em placas de Petri durante 24 horas. Dessas placas foi retirada camadas espessas da bactéria com auxílio de alça de Drigalski, as quais foram transferidas para Erlenmeyers com três defletores basais de 250 mL contendo meio de cultura GPL (10 g de glucose; 10 g de peptona; 5 g de extrato de levedura; 3 g de NaCl; 1 g de KH₂PO₄; 0,5 g de Mg SO₄.7H₂O; 1000 mL de água destilada, pH-6,0) e incubados em Shaker Orbital com temperatura de 28 °C por 48 horas a 180 rpm. As suspensões de inóculos foram

padronizadas em espectrofotômetro NanoQuant (Infinite M200PRO, TECAN) a 540 nm e calibradas na concentração de 1×10^6 células totais/mL.

A avaliação da produção de endósporos viáveis foi realizada no 3^o, 5^o e 7^o dia de incubação à 28 ± 2 °C. As amostras testadas foram colocadas em temperatura ambiente por 35 minutos antes do início da análise. Transcorrido esse tempo, a diluição 10^{-1} foi colocada em ultrassom sem aquecimento por 5 minutos, seguida de agitação na intensidade máxima do agitador magnético por 1 minuto e, posteriormente os tubos foram submersos em banho-maria a 80 ± 2 °C por 12 minutos. Após o resfriamento, foram transferindo 1 mL da suspensão de cada um dos tubos tratados termicamente para 9 mL de água destilada até alcançar a diluição de 10^{-7} . A partir das diluições decimais, uma alíquota de 100 µL da suspensão de cada um dos meios foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio NA, aguardando 2 minutos para a amostra ser absorvida antes de inverter as placas. A incubação das placas foi em BOD a 28 ± 2 °C. Cada tratamento contou com três repetições e transcorridos 24 horas de incubação foi realizada a contagem de colônias/endósporos.

3.3 Otimização da Fermentação Líquida

Em Erlenmeyers de 250 mL com três defletores basais foram adicionados 90 mL dos diferentes meios esterilizados, mais 10 mL de suspensão contendo o inóculo e incubados em Shaker Orbital com temperatura de 28 °C a 180 rpm por 48 horas. As composições dos meios de cultivo utilizados estão apresentadas na Tabela 3. O inóculo foi obtido a partir do crescimento do isolado de *B. velezensis* em meio de cultura GPL por 48 horas. Cada tratamento foi composto por três repetições. De cada Erlenmeyer foram retiradas uma alíquota de 10 mL para determinar o número de unidades formadoras de colônia, conforme descrito anteriormente.

Tabela 3 - Composição dos meios líquidos utilizados para otimização da produção de unidades formadoras de colônia e número de endósporos do isolado de *Bacillus* AP-3.

| Tratamento | Identificação | Composição |
|------------|---------------------------------|---|
| Meio 1 | Sacarose + extrato de levedura | 15 g de sacarose; 8 g de extrato de levedura; 1000 mL de H ₂ O destilada. |
| Meio 2 | Melaço + extrato de levedura | 20 g de melaço; 10 g de extrato de levedura; 1000 mL de H ₂ O destilada. |
| Meio 3 | Melaço + ureia | 25 g de melaço; 5 g de ureia; 1000 mL de H ₂ O destilada. |
| Meio 4 | Melaço + farelo de algodão | 20 g de melaço; 10 g farelo de algodão; 1000 mL de H ₂ O destilada. |
| Meio 5 | Farelo de algodão + glicose | 10 g de farelo de algodão; 15 g de glicose; 1000 mL de H ₂ O destilada. |
| Meio 6 | DSM (meio difco de esporulação) | 3 g de extrato de carne; 5 g de peptona; 1 g de KCl; 0,25 g de MgSO ₄ ; 1000 mL H ₂ O deionizada; 1 mL de Ca (NO ₃) ₂ 1 M; 1mL de MnCl ₂ 10 mM; 1 mL de FeSO ₄ 1 mM. |

Para determinação do número de esporos viáveis foi utilizada a metodologia citada no item 3.2 no qual o substrato fermentado é submetido a diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} ... 10^{-7}) e posteriormente plaqueadas alíquotas de 100 μ L em placas de Petri contendo NA. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por grama de substrato (UFC g⁻¹). Cada tratamento contou com três repetições e transcorridos 24 horas de incubação foi realizada a contagem de colônias/endósporos, sendo as médias submetidas a análise de variância e comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.4 Antibiose Avaliada pela Produção de Antibióticos e Metabólitos Termotolerantes

A atividade antagonista por meio da produção de antibióticos e metabólitos termotolerantes do isolado de *B. velezensis* AP-3 foi testada contra os fungos *S. sclerotiorum* e *F. oxysporum* f. sp. *lycopercisi*. Para tanto, 10 mL de cada um dos meios obtidos, conforme descrito no item 3.3, foram adicionadas em Erlenmeyers contendo 90 mL de BDA e autoclavados a 121 °C por 15 minutos. Em seguida, 10 mL

do meio de cultura foram transferidos para placas de Petri (90 x 10 mm). Posteriormente, um disco de micélio de 5 mm do fungo fitopatogênico foi transferido para o centro da placa. Placas contendo somente meio de cultura BDA foram utilizadas como testemunhas. As placas foram incubadas a 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 12 h.

O delineamento foi inteiramente casualizado com cinco repetições. Foram realizadas avaliações diárias do crescimento micelial, medindo o crescimento em linha vertical e horizontal, até que as testemunhas cobrissem toda a superfície das placas. As avaliações das placas foram qualitativas (presença de halos de inibição do crescimento dos fungos fitopatogênicos) e quantitativa (crescimento micelial), sendo as medições feitas com paquímetro digital.

3.5 Formulação de *Bacillus* em Talco e Fécula de Batata

Bacillus foi formulado utilizando os meios no qual foram utilizados substratos que mostraram maior estabilidade no ensaio de fermentação líquida. Para tanto, em placas de Petri (100 x 20 mm) foram adicionados 45 mL de suspensão de cada meio fermentado e, separadamente, misturado homogeneamente com 60 g de talco e 36 g de fécula de batata. As misturas foram mantidas em BOD com temperatura de 38 ± 2 °C até secagem. Após o período de secagem os produtos obtidos foram triturados e os grânulos obtidos armazenados em embalagem plásticas e mantidos em temperatura ambiente. A viabilidade da formulação em pó-molhável foi avaliada até 226 dias após a obtenção da formulação em diferentes intervalos de tempo.

3.6 Promoção de Crescimento de Feijoeiro

Para avaliar a promoção de crescimento, três sementes de feijão da cultivar TAA-DAMA foram semeadas em rizotrons construídos em tubos de PVC de 17,5 cm de diâmetro e 100 cm de comprimento, cortados longitudinalmente ao meio, contendo mistura de substrato Cal Terra® (Artur Nogueira, SP) e solo na proporção de 1:3 (v/v). O solo foi coletado de uma profundidade de 0-20 cm na área da fazenda experimental

da Embrapa Meio Ambiente (Jaguariúna/SP) apresentando os seguintes atributos químicos e físicos: MO = 32,3 g kg⁻¹; P = 9,36 mg dm⁻³; K = 128,55 mg dm⁻³; Ca = 3,09 cmolc dm⁻³; Mg = 1,48 cmolc dm⁻³; H+Al = 6,10 cmolc dm⁻³; t = 4,99 cmolc dm⁻³; SB = 4,95 cmolc dm⁻³; V% = 44,54; e pH em H₂O = 4,3.

O ensaio consistiu em avaliar os bioprodutos formulados em talco e fécula de batata descritos no item 3.5 em diferentes formas de aplicação. Os tratamentos estudados no ensaio de inoculação foram: T1 - Testemunha; T2 - Tratamento de sementes com formulado em talco; T3 - Tratamento de sementes com formulado em fécula de batata; T4 - Aplicação no sulco de semeadura com formulado em talco; T5 - Aplicação no sulco de semeadura com formulado em fécula de batata; T6: Tratamento de sementes + Aplicação no sulco de semeadura com formulado em talco; T7: Tratamento de sementes + Aplicação no sulco de semeadura com formulado em fécula de batata.

Em Erlenmeyer de 1000 mL, 100 g dos formulados foram diluídos em 900 mL de água destilada, obtendo a concentração de 1 x10⁸ UFC mL⁻¹, sendo essa concentração confirmada pelo método da diluição seriada. Para o tratamento de semente, as mesmas foram embebidas por 5 minutos em suspensão de cada formulado separadamente. O volume aplicado no sulco de semeadura foi de 10 mL da suspensão de cada formulado a ser testado por semente. O meio de cultura de melaço + farelo de algodão foi utilizado na produção dos formulados em talco e fécula de batata.

O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições e sete tratamentos. Dez dias após a semeadura (DAS) foi realizado o desbaste deixando duas plantas por rizotron. Semanalmente foi avaliada a clorofila utilizando um clorofilômetro (SPAD- 502 Plus) e a altura das plantas. Após 42 dias da semeadura foram determinados a massa fresca da parte aérea e do sistema radicular (g), o volume do sistema radicular (mL) e o comprimento da raiz (cm). Em seguida, as amostras acondicionadas em sacos de papel foram levadas para estufa de ventilação de ar para secagem e obtenção da massa seca da parte aérea e do sistema radicular (g). Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS

4.1 Otimização da fermentação sólida em diferentes substratos

A fermentação sólida de *B. velezensis* AP-3 em farinha de arroz e fécula de batata apresentou grande variação de rendimentos na produção de endósporos em função dos diferentes fatores e níveis avaliados. As maiores médias da produção de endósporos obtidas foram de $2,06 \times 10^8$ UFC g⁻¹ no ensaio 4 (inóculo inicial de 1×10^6 UFC g⁻¹, umidade 60%, 0% de teor de N, 7 dias de fermentação e fécula de batata como substrato) e $1,82 \times 10^8$ UFC g⁻¹ no ensaio 6 (60% de umidade, pré-inóculo de 1×10^6 UFC g⁻¹, 2% de teor de nitrogênio, 7 dias de fermentação utilizando farinha de arroz como substrato, respectivamente) (Tabela 4).

Tabela 4 - Rendimento da produção de *Bacillus velezensis* AP-3 obtidos por meio de fermentação sólida – Desenho experimental do tipo Plackett-Burman 12 com 3 pontos centrais.

| Ensaio | Umidade (%) | Teor de N (%) | Tempo de Fermentação (dias) | Substratos (g) | UFC g ⁻¹ |
|--------|-------------|---------------|-----------------------------|----------------|------------------------|
| 1 | 60 | 0 | 7 | 10 g Fa | 2,4 x 10 ⁷ |
| 2 | 60 | 2 | 3 | 10 g Fb | 2,1 x 10 ⁶ |
| 3 | 30 | 2 | 7 | 10 g Fa | 1,8 x 10 ⁶ |
| 4 | 60 | 0 | 7 | 10 g Fb | 2,06 x 10 ⁸ |
| 5 | 60 | 2 | 3 | 10 g Fb | 1,2 x 10 ⁷ |
| 6 | 60 | 2 | 7 | 10 g Fa | 1,82 x 10 ⁸ |
| 7 | 30 | 2 | 7 | 10 g Fb | 1,6 x 10 ⁷ |
| 8 | 30 | 0 | 7 | 10 g Fb | 1,11 x 10 ⁶ |
| 9 | 30 | 0 | 3 | 10 g Fb | 1,6 x 10 ⁶ |
| 10 | 60 | 0 | 3 | 10 g Fa | 1,11 x 10 ⁶ |
| 11 | 30 | 2 | 3 | 10 g Fa | 1,11 x 10 ⁶ |
| 12 | 30 | 0 | 3 | 10 g Fa | 0,7 x 10 ⁶ |
| 13 | 45 | 1 | 5 | 5 g Fa:5 g Fb | 1,13 x 10 ⁶ |
| 14 | 45 | 1 | 5 | 5 g Fa:5 g Fb | 1,19 x 10 ⁶ |
| 15 | 45 | 1 | 5 | 5 g Fa:5 g Fb | 1,06 x 10 ⁶ |

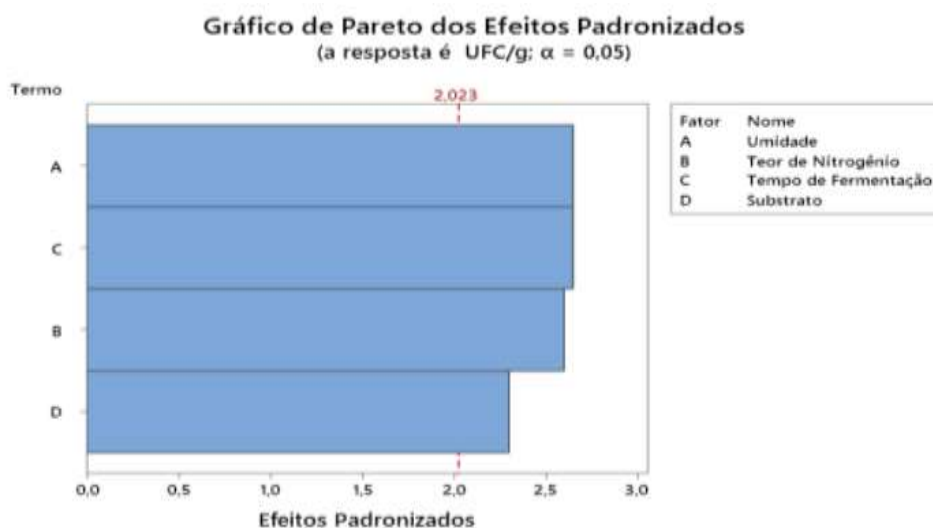
Substratos (Farinha de arroz e Fécula de batata).

Todos os fatores avaliados apresentaram diferenças significativas com valores de P variando entre $P < 0,0012$ à $< 0,0027$, indicando que todos os fatores exerceram influência na produção de endósporos (Tabela 5). Esses resultados também são ilustrados no diagrama de Pareto (Figura 2), onde a barra que se estende além da linha de referência são consideradas significativas.

Tabela 5 - Valores estimados dos efeitos e valores de *P* para umidade (%), teor de nitrogênio (%), tempo de fermentação (dias) e substrato (farinha de arroz e fécula de batata) na produção de unidades formadoras de colônias do isolado de *Bacillus velezensis* AP-3 em meio sólido.

| Fator | Efeito | Valor-p |
|-----------------------------|-----------|---------|
| Umidade (%) | 114259287 | 0,012 |
| Teor de N (%) | 112125358 | 0,013 |
| Tempo de Fermentação (dias) | 114211187 | 0,012 |
| Substrato | -99156113 | 0,027 |

Figura 2 - Diagrama de Pareto ($\alpha < 0,05$) com os efeitos padronizados dos fatores na produção de endósporos de *Bacillus velezensis* AP-3 em diferentes substratos (UFC g⁻¹).



4.2 Otimização da Fermentação Líquida

As contagens da produção de unidades formadoras de colônia e do número de endósporos viáveis do isolado *B. velezensis* AP-3 são apresentados na Tabela 6. Dentre os meios líquidos utilizados, os compostos por Melaço + Farelo de Algodão e Farelo de Algodão + Glucose apresentaram as maiores produções com $1,69 \times 10^9$ e $1,66 \times 10^9$ de UFC mL⁻¹, respectivamente (Tabela 6). O meio Sacarose + Extrato de

Levedura apresentou o menor rendimento na contagem de colônias, enquanto os demais meios de cultura utilizados apresentaram valores medianos (Tabela 6).

Tabela 6 - Unidades formadoras de colônias (UFC mL⁻¹) de *Bacillus velezensis* AP-3 multiplicado em diferentes meios de culturas sob fermentação líquida.

| Tratamento | UFC mL ⁻¹ |
|--------------------------------|--------------------------|
| Sacarose + Extrato de Levedura | 4,4 x 10 ⁷ c |
| Melaço + Ureia | 4,1 x 10 ⁸ b |
| Melaço + Farelo de Algodão | 1,69 x 10 ⁹ a |
| Farelo de Algodão + Glucose | 1,66 x 10 ⁹ a |
| Melaço + Extrato de Levedura | 3,5 x 10 ⁸ bc |
| DSM | 3,5 x 10 ⁸ bc |
| CV | 16,31% |

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível 5% de probabilidade.

4.3 Antibiose avaliada pela produção de antibióticos e metabólitos

A atividade antagonista da produção de metabólitos do *B. velezensis* AP-3 foi testada contra os fungos *S. sclerotiorum* e *F. oxysporum* (Tabela 7). *Bacillus velezensis* AP-3, produzido em todos os meios de culturas testados, inibiu tanto *S. sclerotiorum* como *F. oxysporum*. O meio líquido composto de melaço e extrato de levedura destacou-se por apresentar maior inibição *in vitro* contra os dois isolados fúngicos (Tabela 7).

Tabela 7 – Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* por *Bacillus velezensis* AP-3 fermentado em diferentes meios de cultura.

| Meios de cultura | <i>S. sclerotiorum</i> | <i>F. oxysporum</i> |
|-------------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | Crescimento micelial (mm) | Crescimento micelial (mm) |
| Controle | 7,76 a | 7,73 a |
| Meio sacarose e extrato de levedura | 4,3 b | 5,05 b |
| Meio melaço e ureia | 2,9 b | 3,17 d |
| Farelo de algodão e glicose | 1,8 b | 4,07 c |
| Meio melaço e extrato de levedura | 1,3 b | 3,09 d |
| Meio DSM | 3,2 b | 5,09 b |
| CV (%) | 18,47% | 4,47% |

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível 5% de probabilidade.

4.4 Formulação de *Bacillus velezensis* AP-3 em talco e fécula de batata

A Tabela 8 apresenta os resultados em UFC g⁻¹ de *B. velezensis* AP-3 quando formulado em fécula de batata e em talco as formulações a partir dos diferentes meios líquidos utilizados na sua fermentação. A maior concentração inicial de endósporos (1 DAF) foi obtida nas formulações em que os inertes foram misturados ao meio de melaço + farelo de algodão, com 1,3 x 10⁹ UFC g⁻¹ e 1,4 x 10⁹ UFC g⁻¹ em fécula de batata e talco, respectivamente (Tabela 8).

A viabilidade foi avaliada aos 1, 30, 55, 124 e 226 dias após o armazenamento da formulação (Tabela 8). As concentrações de endósporos nos meios de melaço + farelo de algodão e o meio de farelo de algodão + glucose mantiveram constantes até 226 dias após a obtenção da formulação em talco e fécula de batata, enquanto que o meio melaço + ureia e meio sacarose + extrato de levedura permaneceram viáveis até 124 dias após a formulação em ambos inertes.

Tabela 8 - Viabilidade de esporos de *Bacillus velezensis* AP-3 formulados em talco e fécula de batata após 5, 30, 55, 124 e 226 dias de armazenamento da formulação (DAF).

| Meios de cultivo | UFC g ⁻¹ - TALCO | | | | |
|-------------------------------------|-----------------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|
| | 1 DAF | 30 DAF | 55 DAF | 124 DAF | 226 DAF |
| Meio Melaço + Farelo de Algodão | 1,4 x 10 ⁹ | 1 x 10 ⁹ | 1,9 x 10 ⁹ | 3 x 10 ⁹ | 1,6 x 10 ⁹ |
| Meio Melaço + Extrato de Levedura | 2,6 x 10 ⁸ | 1 x 10 ⁸ | 3 x 10 ⁸ | 1 x 10 ⁸ | 2 x 10 ⁸ |
| Meio Melaço + Ureia | 2,1 x 10 ⁸ | 3 x 10 ⁸ | 1 x 10 ⁸ | 4 x 10 ⁸ | 0 |
| Meio Farelo de Algodão + Glucose | 1,3 x 10 ⁸ | 1 x 10 ⁸ | 1 x 10 ⁸ | 3 x 10 ⁸ | 2 x 10 ⁸ |
| Meio Sacarose + Extrato de Levedura | 2,8 x 10 ⁷ | 1 x 10 ⁷ | 1 x 10 ⁷ | 0 | 0 |

| Meios de cultivo | UFC g ⁻¹ - FÉCULA DE BATATA | | | | |
|-------------------------------------|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | 1 DAF | 30 DAF | 55 DAF | 124 DAF | 226 DAF |
| Meio Melaço + Farelo de Algodão | 1,3 x 10 ⁹ | 1,3 x 10 ⁹ | 1,4 x 10 ⁹ | 1,1 x 10 ⁹ | 1,3 x 10 ⁹ |
| Meio Melaço + Extrato de Levedura | 1,9 x 10 ⁸ | 1 x 10 ⁸ | 3 x 10 ⁸ | 1 x 10 ⁸ | 0 |
| Meio Melaço + Ureia | 1,8 x 10 ⁸ | 3 x 10 ⁸ | 2 x 10 ⁸ | 1,6 x 10 ⁸ | 0 |
| Meio Farelo de Algodão + Glucose | 1,6 x 10 ⁸ | 1 x 10 ⁸ | 1 x 10 ⁸ | 3 x 10 ⁸ | 1 x 10 ⁸ |
| Meio Sacarose + Extrato de Levedura | 2,4 x 10 ⁷ | 2 x 10 ⁷ | 2 x 10 ⁷ | 1 x 10 ⁷ | 0 |

4.5 Promoção de Crescimento

Em relação ao ensaio de promoção de crescimento, não foram observadas diferenças significativas para nenhum dos parâmetros avaliados (Tabela 9) com os produtos e formas de aplicação testados. No entanto, observa-se que o volume e as massas frescas e secas do sistema radicular foram sempre superiores nos tratamentos que receberam o produto formulado à base de *B. velezensis* AP-3 (Tabela 9). A aplicação via tratamento de semente e no sulco de semeadura do produto formulado com fécula de batata aumentou em 87% e 67% as massas frescas e secas do sistema radicular do feijoeiro em relação ao controle.

Tabela 9 – Efeito dos produtos formulados à base de *Bacillus velezensis* AP-3 aplicados via tratamento de sementes e no sulco de semeadura no desenvolvimento de feijoeiro.

| Tratamento | Massa fresca da parte aérea | Massa seca da parte aérea | Diâmetro da haste | Massa fresca do sistema radicular | Massa seca do sistema radicular | Volume do sistema radicular |
|--|------------------------------------|----------------------------------|--------------------------|--|--|------------------------------------|
| T1-Controle | 253,2 | 40,6 | 5,5 | 44,6 | 4,9 | 4,8 |
| T2-Tratamento de sementes com formulado em talco | 269,8 | 41,0 | 5,3 | 57,9 | 5,2 | 8,8 |
| T3-Tratamento se sementes (TS) com formulado em fécula de batata | 264,4 | 42,4 | 5,5 | 69,6 | 6,8 | 9,8 |
| T4-Aplicação no sulco de semeadura do formulado em talco | 250,6 | 36,2 | 5,2 | 63,8 | 5,9 | 8,6 |
| T5- Aplicação no sulco de semeadura do formulado em fécula de batata | 263,8 | 34,7 | 5,8 | 83,8 | 8,2 | 8,2 |
| T6-TS + aplicação no sulco de semeadura do formulado em talco | 233,2 | 37,3 | 5,2 | 58,7 | 5,8 | 7,5 |
| T7-TS + aplicação no sulco de semeadura do formulado em fécula de batata | 250,4 | 39,4 | 5,7 | 67 | 5,4 | 7,8 |

Os valores das massas são em g, o diâmetro em mm e o volume em mL por planta. Não foram verificadas diferenças estatísticas entre os tratamentos para nenhum dos parâmetros avaliados.

5 DISCUSSÃO

A fermentação utilizando microrganismos nos processos biotecnológicos para uso na agricultura é uma alternativa viável empregada nos últimos anos, devido às suas inúmeras vantagens, tais como a elevada capacidade fisiológica de reprodução e a produção de diversas substâncias sob diferentes temperaturas, pHs e meios de cultivo (SILVA et al., 2012).

No presente estudo, foi evidenciado que a fermentação sólida pode ser usada para produzir altas concentrações de endósporos de *B. velezensis* AP-3 em meios de cultivo de baixo custo como fécula de batata e farinha de arroz (Tabela 4). Rayhane et al. (2020) pontuaram que os resíduos agrícolas são excelentes substratos para o processamento e produção na fermentação em estrado sólido, pois contém nutrientes que permitem que os microrganismos cresçam. Além disto, a escolha de um substrato apropriado depende também de preço e acessibilidade.

Na fermentação em estado sólido foi utilizado o desenho experimental de Plackett-Burman que é empregado para otimizar bioprocessos (MONTGOMEY, 2005). Uma vantagem desse delineamento está em avaliar a influência de diferentes variáveis, bem como interações entre eles, o que permite selecionar as melhores condições para otimizar o meio de cultura, favorecendo a máxima produção, com reduções de mão de obra, tempo e custos (MONTGOMEY, 2005). A interação dos fatores comparados nessa pesquisa baseou-se no teor de nitrogênio, tempo do processo fermentativo, substratos e porcentagem de umidade, conforme apresentados na Tabela 1. A umidade inicial e a atividade da água, a natureza e o tamanho das partículas sólidas, o volume do inóculo e nutrientes afetaram a eficácia da fermentação em estado sólido (MENDES et al., 2015; VASSILEB; MENDES, 2018). Contudo, Selo et al. (2021) atestaram que este tipo de processo fermentativo permite que os microrganismos cresçam em um ambiente com baixo teor de água ou até mesmo sem água, diferindo dos dados obtidos neste estudo, onde as maiores concentrações de UFC g⁻¹ foram observadas nos ensaios de fermentação com 60% de umidade (Tabela 3). Estudos conduzidos para avaliar a produção de esporos de *Bacillus atrophaeus* por fermentação em estado sólido usando como substratos o bagaço de cana e melaço de soja mostraram que a esporulação atingiu de 1,7 até 4,7 x 10¹⁰ UFC g⁻¹ com 88 a 93% de umidade inicial (SELLA et al., 2009).

Em relação à fermentação em estado líquido, o meio contendo sacarose e extrato de levedura produziu a menor concentração de esporos de ($4,4 \times 10^7$ UFC mL⁻¹) mostrando-se o menos promissor comparado aos demais meios testados. A maior concentração obtida foi de $1,69 \times 10^9$ UFC mL⁻¹ (meio de melaço com farelo de algodão). No entanto, estudos realizados visando o aumento da produção de esporos, tem descritos concentrações de $1,56 \times 10^{10}$ UFC mL⁻¹ (CHEN et al., 2019) e 7×10^{10} UFC mL⁻¹ (KHARDZIANI et al., 2017) de *Bacillus subtilis* em fermentação submersa. Este modelo de fermentação pode sofrer influência de diversos fatores tais como, o isolado bacteriano, as fontes de carbono e nitrogênio, temperatura, pH e quantidade e idade do inóculo (FATEMEH et al., 2019) entre outros. Um maior rendimento de endósporos pode ser alcançado otimizando as condições de cultura ou fermentação em biorreatores com melhor ventilação e agitação usando um meio otimizado como base (KHARDZIANI et al., 2017). Por conta disto, na otimização dos processos fermentativos, diferentes combinações e sequências de condições de processo e de componentes do meio são necessidades a serem investigadas para determinar o estado de crescimento que produz mais biomassa com o melhor estado fisiológico constituído para a formação do produto (STANBURY et al., 1997). Outro ponto importante a se considerar é a composição do meio de cultivo, pois, este e a condição do processo, desempenham um papel crítico, para a obtenção da concentração final e na produção de um determinado produto. Portanto, para um processo econômico é importante levar em conta a otimização do meio de fermentação e as condições do processo, com a finalidade de maximizar os lucros do processo de fermentação (SCHIMIDT, 2005).

O potencial antagonista de *B. velezensis* AP-3 foi comprovado em todos os tratamentos ao qual foi confrontado com *F. oxysporum* e *S. sclerotiorum*. O gênero *Bacillus* apresenta grande relevância no emprego da proteção das plantas contra fitopatógenos, principalmente pelo complexo arsenal de mecanismos de ação, como a síntese de substâncias antimicrobianas, produção de metabólitos e compostos voláteis e por induzir respostas de resistência sistêmicas (LEELASUPHAKUL et al., 2018; CUCU et al., 2020). O controle e/ou redução no crescimento de *F. oxysporum* apresenta relevância na agricultura, considerando que este patógeno é conhecido pela dificuldade de manejo e capacidade de sobrevivência com a formação de clamidósporos, além de infectar e causar doença mesmo em cultivares com diferentes

genes de resistência (PRIHATNA et al., 2018; SRINIVAS et al., 2019). A inibição do crescimento de espécies de *Fusarium* por *Bacillus* spp. foi relatada em diferentes estudos (KAI et al., 2009; PRASHAR; KAPOOR; SACHDEVA, 2013; ROCHA; MOURA, 2013; MEDEIROS; BETTIOL, 2021; PACIFICO et al., 2021). Em estudos *in vivo*, duas cepas de *Bacillus* proporcionaram redução em 57% e 68% do desenvolvimento fúngico, comparado as plantas não tratadas. A mesma ação antagonista foi comprovada em ensaios *in vitro* (LIMA et al., 2014).

Os ensaios de antagonismo *in vitro* são necessários no processo de seleção de agentes microbianos de biocontrole, pois permitem reconhecer a competência e a variabilidade dos isolados submetidos ao confronto com patógenos. Os resultados deste trabalho, estão em concordância com os obtidos por Grady et al. (2019) e Fazle Rabbee e Baek (2020) sobre a existência de compostos antifúngicos produzidos por *B. velezensis*, incluindo surfactinas (GRADY et al., 2019), fengicinas (ADENIJI et al., 2019) e bacilomicina D (LUNA-BULBARELA et al., 2018). Também com o isolado AP-3 de *B. velezensis* Pacifico et al. (2021) e Medeiros e Bettiol (2021) observaram a inibição de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Embora a maioria das espécies de *Bacillus* produza metabólitos secundários, sua produção nem sempre é conservada entre as espécies de *Bacillus* ou mesmo entre as cepas. Palazzini et al. (2016) construíram uma árvore filogenômica de junção de vizinhos a partir dos genomas centrais de *B. velezensis*, *B. amyloliquefaciens* e *B. siamensis*. Todas as cepas possuíam agrupamentos de genes para a produção de surfactina, bacilibactina, minociclina e um substância semelhante à iturina (iturina ou bacilomicina), além disso, as cepas de *B. velezensis* continham bacilisina, fengicinas (PALAZZINI et al., 2016).

Wang et al. (2019) relataram que *B. velezensis* FKM10, isolado do solo da rizosfera de macieiras, produziu protease e sideróforos e inibiu significativamente o crescimento de *Fusarium verticillioides*. De acordo com Shahid et al. (2021), *B. velezensis* BS1 produziu celulase, protease e sideróforos e inibiu o crescimento micelial de *Botrytis cinerea* isolado de morango, *Rhizoctonia solani* e *S. sclerotiorum* isolados da alface, indicando que a cepa tem um amplo espectro contra patógenos

fúngicos de importância agrícola (SHAHID et al., 2021). A ação sobre *S. sclerotiorum* também foi observada no presente trabalho.

Apesar da importância dos ensaios *in vitro* para avaliar grande número de cepas bacterianas é importante avaliar o potencial de biocontrole em associação com plantas cultivadas em substrato ou solos infestados com os fitopatógenos. Para fazer tais avaliações, uma variedade suscetível e uma densidade adequada do inóculo do patógeno devem ser usadas para que a planta não morra rapidamente (Rocha et al., 2017).

Em relação à formulação de *B. velezensis* AP-3, o tratamento com meio de melaço + farelo de algodão apresentou maior quantidade de esporos, com $1,3 \times 10^9$ UFC g⁻¹ quando formulado em fécula de batata (Tabela 7). Este mesmo meio fermentado mostrou resultado similar quando formulado em talco, proporcionando uma maior quantidade de endósporos quando comparados aos demais tratamentos.

A produção de estruturas de resistência, capacidade biocontroladora de doenças de plantas e diversidade de modos de ação são características de bactérias do gênero *Bacillus* atrativas que facilitam sua utilização na formulação de bioprodutos (CAWOY et al., 2011). O talco e a fécula de batata foram utilizados na formulação como ingredientes inertes devido à baixa granulometria. O uso de ingredientes inertes na formulação em pó deve-se ao fato de atuarem como agentes antiaglomerantes, protetores ultravioletas e como materiais adesivos pra aumentar a adsorção (KESWANI et al., 2016).

Em uma formulação microbiana o principal foco é preservar o microrganismo para aumentar seu antagonismo contra os patógenos alvo. A potência da formulação microbiana é dependente da cepa de microrganismo usada, embora possa haver problemas físicos e necessidades nutricionais do microrganismo para permanecer ativo por mais tempo (KESWANI et al., 2016). Para o sucesso comercial de um produto microbiano em mercado é fundamental que tenha longa vida útil, possa ser armazenado em temperatura ambiente, o microrganismo benéfico seja capaz de sobreviver e proliferar em condição de campo, apresente facilidade de manuseio e aplicação e seja eficiente no controle de patógenos (KESWANI et al., 2016). O interesse da formulação com espécies de *Bacillus* deve-se a sua capacidade de formar esporos que apresentam longa duração, são tolerantes aos estresses, além de

que esses organismos secretam metabólitos que estimulam o crescimento das plantas e prevenem a infecção por patógenos (RADHAKRISHAN et al., 2017). As formulações aqui desenvolvidas apresentaram vida de prateleira de até 226 dias, quando foi realizada a última avaliação, contudo, possivelmente, seja superior a esse tempo.

No estudo para avaliar a promoção de crescimento das formulações contendo *B. velezensis* em feijoeiro não foram observadas diferenças estatísticas entre os parâmetros avaliados. Contudo, *B. velezensis* AP-3, formulado em fécula de batata, estimulou o desenvolvimento do sistema radicular, com aumento de até 87% na sua massa fresca (Tabela 9). Embora não tenham sido observadas diferenças significativas, nota-se que as médias de parte aérea fresca e seca do tratamento de sementes com fécula de batata e tratamento de semente com talco foram superiores ao tratamento controle.

Bahadir et al. (2018) obtiveram potenciais isolados de *Bacillus* para serem utilizados como bioinoculantes de várias fontes, sendo que parte somente promoveram incremento no comprimento de raiz e parte aérea. *Bacillus velezensis* BS1 foi relatado como promotor de crescimento em ensaios conduzidos com plântulas de pimenta malagueta mesmo não diferindo estatisticamente da testemunha (SHIN et al., 2021). Em experimentos em casa de vegetação e campo, a adição da linhagem de *B. velezensis* XT1 aumentou a biomassa da parte aérea entre 37 e 43,8% e a altura em 20,1 e 22,2% de plantas de tomate, respectivamente. Quando aplicada diretamente no solo, esta cepa incrementou significativamente a massa fresca da parte aérea das plantas de tomate, pimentão, abóbora e pepino em 53%, 63,6%, 129,2% e 100,8%, respectivamente, em relação ao controle (TORRES et al., 2020). O potencial de *B. velezensis* BAC-03 em promover crescimento foi avaliado em cenoura, beterraba, pepino, pimenta, batata, rabanete, abóbora, tomate e nabo. No entanto, os resultados mostraram que BAC03 aumentou o crescimento de algumas plantas testadas em vários níveis em diferentes partes da planta (MENG; JIANG; HAO, 2016). Segundo Adrees et al. (2019), o gênero *Bacillus* pode estimular o crescimento e rendimento das culturas, porém que cepas isoladas e selecionadas podem não apresentar o mesmo efeito em espécies de plantas diferentes, sendo necessário testar seu potencial em espécies e regiões distintas. O isolado AP-3 de *B. velezensis* utilizado no presente trabalho promoveu o crescimento do sistema radicular de tomateiros em até 163% (MEDEIROS; BETTIOL, 2021).

6 CONCLUSÕES

As modificações de parâmetros no meio de cultura alteram a quantidade de endósporos produzidos por *Bacillus velezensis* AP-3.

A produção via fermentação em estado sólido com farinha de arroz e fécula de batata é viável quando fermentadas durante 7 dias a 60% de umidade.

O meio líquido contendo Melaço + Farelo de Algodão proporcionou concentrações expressivas de endósporos de *B. velezensis* AP-3 via fermentação submersa e sua viabilidade foi mantida em formulações em talco e fécula de batata.

Bacillus velezensis AP-3 inibiu o crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* e de *S. sclerotiorum*.

REFERÊNCIAS

- ADENIJI, A. A. et al. O. Seleccionando a produção de lipopeptide, *Bacillus* spp.: sondagem metabólica e genômica de *Bacillus velezensis* NWUMFkBS10.5. *Microbiologias Abertas*, v. 8, p. 07-42, 2019.
- ADREES, H. et al. Inducing systemic resistance in cotton plants against charcoal root rot pathogen using indigenous rhizospheric bacterial strains and chemical elicitors. *Crop Protection*, v. 115, p. 75-83, 2019.
- AHEMAD, M. Implications of bacterial resistance against heavy metals in bioremediation: A Review. *Journal of Institute of Integrative Omics and Applied Biotechnology*, v. 3, p. 39-46, 2012.
- AIZAWA, T. et al. *Bacillus trypoxylicola* sp. nov., xylanase-producing alkaliphilic bacteria isolated from the guts of Japanese horned beetle larvae (*Trypoxylus dichotomus septentrionalis*). *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, v. 60, p.61-66. 2010.
- ALCARAZ, L.D. et al. Understanding the evolutionary relationships and major traits of *Bacillus* through comparative genomics. *BMC Genomics*, v.11, n.1, p.1-17, 2010.
- ALONSO, F.O.M. Efeito da agitação e aeração na produção de lípases por *Yarrowia lipolytica*. 2001. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2001.
- ASH, C. et al. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Letters in Applied Microbiology*, v.13, p.202-206, 1991.
- ATHANASOPOULOS, A. et al. 2019. Fungal plasma membrane domains. *FEMS microbiology reviews*, v. 43, n. 6, p. 642-673, 2019.
- AYED, H.B. et al. Isolation and biochemical characterisation of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* An6. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, v.3, p.255-261. 2015.
- BAHADIR, P. S.; LIAQAT, F.; ELTEM, R. Plant growth promoting properties of phosphate solubilizing *Bacillus* species isolated from the Aegean Region of Turkey. *Turkish Journal of Botany*, v. 42, n. 2, p. 183-196, 2018.
- BERINI, F. et al. Microbial and viral chitinases: attractive biopesticides for integrated pest management. *Biotechnology Advances*, v.36, p.818-838, 2018.
- BETTIOL, W. G.; MORANDI, M. A. B. (Eds). *Biocontrole de doenças de plantas: usos e perspectivas*. Embrapa: Jaguariúna, p.7-14, 2009.
- BIBI, F. et al. Diversity and characterization of endophytic bacteria associated with tidal flat plants and their antagonistic effects on oomycetous plant pathogens. *Plant Pathology Journal*, v.28, p.20-31, 2012.

BONALDO, S. M.; PASCHOLATI, S. F.; ROMEIRO, R. S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, L. et al. (Eds.). Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba: FEALQ, 2005. 263 p.

BUKHAT, S. et al. Communication of plants with microbial world: exploring the regulatory networks for PGPR-mediated defense signaling. *Microbiological Research*, v. 238, 2020.

CASTRO, A. M. D.; FERREIRA JR, N. U. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, v.33, p.181-188, 2010.

CAWOY, H. et al. *Bacillus*-based biological control of plant diseases. In: STOYTCHIEVA, M. Pesticides in the modern world – pesticides use and management, cap.13, p.273-302, 2011.

CAWOY, H. et al. Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*. *Microbial Biotechnology*, v.8, p.281–295, 2015.

CHALIVENDRA, S.; HAM, J. H. *Bacilli* in the biocontrol of mycotoxins. In: Islan, M. D. T.; et al. *Bacilli* and Agrobiotechnology: Phytostimulation and Biocontrol, v. 2, cap. 3, p. 49-62, 2019.

CHEBA, B. A. et al. Effect of nitrogen sources and fermentation conditions on *Bacillus* sp. R2 chitinase production, *Procedia Manufacturing*, v.22, p. 208-287, 2018.

CHEN, L. et al. Antimicrobial, plant growth-promoting and genomic properties of the peanut endophyte *Bacillus velezensis* LDO2. *Microbiology Research*, v. 218, p. 41-44, 2019.

CLAUS, D.; BERKELEY, R. C. W. Genus *Bacillus* Cohn 1872. In: SNEATH P. H. A. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, The Williams & Wilkins Co, v.2, p.1105–1141, 1986.

CLEMENTE, J. M. et al. Use of *Bacillus* spp. as growth promoter in carrot crop. *African Journal of Agricultural Research*, v.11, n.35, p.3355-3359, 2016.

COCHRANE, S. A.; VEDERAS, J. C. Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: a gold mine of antibiotic candidates. *Medicinal Research Reviews*, v.36, n.1, p.4–31, 2016.

CONRATH, U. et al. Priming for enhanced defense. *Annual Reviews Phytopathology*, v.53, p. 97–119, 2015.

COOK, R.; BAKER, K. The nature and practice of biological control of plant pathogens. St Paul, MN, USA: American Phytopathological Society. 1983.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry – a review. *Journal of Food Engineering*, v. 76, p. 291-302, 2006.

- CUCU, M. A. et al. An assessment of the modulation of the population dynamics of pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in the tomato rhizosphere by means of the application of *Bacillus subtilis* QST 713, *Trichoderma* sp. TW2 and two composts. *Biological Control*, v. 142, p. 104158, 2020.
- CUCU, M. A. et al. Influence of different biological control agents and compost on total and nitrification-driven microbial communities at rhizosphere and soil level in a lettuce - *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* pathosystem. *J Appl Microbiol*, v. 126 p. 905-918, 2019.
- DAS, A. et al. Fungal siderophores: structure, functions and regulation. In: Varma, A.; Chincholkar, S. B. *Microbial Siderophores*, Berlin: Springer-Verlag, v. 12, p. 1-40, 2007.
- DEMAIN, A. L. From natural products discovery to commercialization: a success story. *Journal Ind. Microbiol Biotechnology*, v. 33, p. 486–495, 2006.
- DEVI, S. Depiction of secondary metabolites and antifungal activity of *Bacillus velezensis* DTU001, *Synth. Syst. Biotechnol.*, v. 4, p. 142–149, 2019.
- DIMKIC, I. et al. Plant-associated *Bacillus* and *Pseudomonas* antimicrobial activities in plant disease suppression via biological control mechanisms - A review. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 117, 101754, 2022.
- DUNLAP, C. A. *Bacillus paralicheniformis* sp. nov., isolated from fermented soybean paste. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, v.65, p.3487-3492, 2015.
- DUNLAP, C. A. et al. *Bacillus swezeyi* sp. nov. and *Bacillus haynesii* sp. nov., isolated from desert soil. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, v.67, p.2720-2725, 2017.
- DUNLAP, C. A. et al. *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and *Bacillus oryzicola* are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, v.66, n.3, p.1212–1217. 2016b.
- DUNLAP, C. A. et al. Genome analysis shows *Bacillus axarquiensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus mojaviensis*; reclassification of *Bacillus malacitensis* and *Brevibacterium halotolerans* as heterotypic synonyms of *Bacillus axarquiensis*. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, v.66, p.2438-2443, 2016c.
- DUNLAP, C. A. Phylogeny and taxonomy of agriculturally important *Bacillus* species. ISLAN, M. D. T.; RAHMAN, M. M.; PANDEY, P. *Bacilli* and agrobiotechnology: phytostimulation and biocontrol. *Bacilli* in Climate Resilient Agriculture and Bioprospecting, p.143-150, 2019.
- DUNLAP, C. A.; et al. *Bacillus nakamurai* sp. nov., a black pigment producing strain. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, v.66, p.2987-2991. 2016a.

EARL, A.M.; LOSICK, R.; KOLTER, R. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. Trends Microbiology, v.16, n.6, p.269-275, 2008.

ELNAHAL, A.S. et al. The use of microbial inoculants for biological control, plant growth promotion, and sustainable agriculture: a review. Eur. J. Plant Pathol., v. 162, p. 759-792, 2022.

ERRINGTON, J. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. Nature Reviews Microbiology, v. 1, p. 117-126, 2005.

FAHEINA JUNIOR, G. S.; Produção de celulases por fermentação submersa utilizando micro-organismos prospectados em coleções de culturas nacionais. 2012. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

FAN, L. et al. Genome sequence of *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* gtP20b, isolated from the Indian ocean. Journal of Bacteriology, v.193, n.5, p.1276-1277, 2011.

FANNING, P.; GRIESHOP, M.; ISAACS, R. Efficacy of biopesticides on spotted wing drosophila, *Drosophila suzukii* Matsumura in fall red raspberries. Journal of Applied Entomology, v. 142, p. 26-32, 2018.

FARZAND, A. et al. 2020. Transcriptional profiling of diffusible lipopeptides and fungal virulence genes during *Bacillus amyloliquefaciens* EZ1509-mediated suppression of *Sclerotinia sclerotiorum*. Phytopathology, v. 110, n. 2, p. 317-326, 2020.

FATEMEH, S; REIHANI, S; KHOSRAVI-DARANI, K. Influencing factors on single-cell protein production by submerged fermentation: A review. Eletronic Journal of Biotechnology, v. 37, p. 34-40, 2019.

FAZLE RABBEE M.; BAEK K. H. Atividades antimicrobianas de lipopeptides e poliketides de *Bacillus velezensis* para aplicações agrícolas. Moléculas. v.25, p.49-73, 2020.

FIRA, D. et al. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species, J. Biotechnol., v. 285, p. 44–55, 2018.

FISHER, S.H.; *in*: SONENSHEIN, A.L.; HOCH, J.A.; LOSICK, R.; eds. *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics. American Society for Microbiology, Washington, p. 221-228. 1993.

FOX, G. E.; WISOTZKEY, J. D.; JURTSCHUK JR, P. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. International Journal of Systematic Bacteriology, v. 42, p. 166-170, 1992.

FRIKHA-GARGOURI, O. et al. Lipopeptides from a novel *Bacillus methylotrophicus* 39b strain suppress Agrobacterium crown gall tumours on tomato plants. Pest Manag Sci., v. 73, n. 3, p. 568-574, 2017.

- GAGNÉ-BOURQUE, F. et al. Accelerated growth rate and increased drought stress resilience of the model grass *Brachypodium distachyon* colonized by *Bacillus subtilis* B26. *Plos One*, v.10, n.6, p.1-23, 2015.
- GAO, S. F. et al. Swarming motility plays the major role in migration during tomato root colonization by *Bacillus subtilis* SWR01. *Biological Control*, v. 98, p.11-17, 2016.
- GARBEVA, P.; WEISSKOPF, L. Airborne medicine: bacterial volatiles and their influence on plant health. *New Phytologist*, v. 226, p. 32-43, 2020.
- GIBBS, P. A.; SEVIOUR, R. J; SCHIMID, F. Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. *Critical Reviews in Biotechnology*, v.20, n.1, p.17-48, 2000.
- GIBSON. T. A study of *Bacillus subtilis* and related organisms. *Journal of Dairy Research*, v.13, n.3, p.248-260, 1944.
- GOTOR-VILA, A. et al. Formulation of the biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 using different approaches: liquid, freeze-drying and fluid-bed spray-drying. *BioControl*, v. 62, p. 545–555, 2017.
- GRADY, E. N. et al. Characterization and complete genome analysis of the surfactin-producing, plant-protecting bacterium *Bacillus velezensis* 9D-6. *BMC Microbiology*, v.19, n.1, article 5, 2019.
- GU, Q.; et al. Bacillomycin D produced by *Bacillus amyloliquefaciens* is involved in the antagonistic interaction with the plant-pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Applied Environmental Microbiology*, v.83, n.19, p.17.2017.
- GUPTA, G. et al. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, v. 7, n. 2, p. 96-102, 2015.
- HAAS, H.; EISENDLE, M.; TURGEON, B. G. Siderophores in fungal physiology and virulence. *Annual Reviews of Phytopathology*, v. 46, p.87-149, 2008.
- HAMDACHE, A. et al. Non-peptide metabolites from the genus *Bacillus*. *Journal of Natural Products*, v.74, p.893-899, 2011.
- HAYAT, R. et al. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annual Microbiology*, v.60, p.579-598, 2010.
- HIGGINS, D.; DWORKIN, J.; Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *Microbiology Reviews*, v.36, p.131-148, 2011.
- HOFFMAN, T. et al. The anaerobic life of *Bacillus subtilis*: cloning of the genes encoding the respiratory nitrate reductase system. *FEMS Microbiology Letters*, v.131, p.219-225, 1995.
- HU, X.; et al. Formulations of the endophytic bacterium *Bacillus subtilis* Tu-100 suppress *Sclerotinia sclerotiorum* on oilseed rape and improve plant vigor in field

trials conducted at separate locations. *Canadian Journal of Microbiology*, v.57, p.539-546, 2011.

ISLAM, M. R. et al. Isolation and identification of antifungal compounds from *Bacillus subtilis* C9 inhibiting the growth of plant pathogenic fungi. *Mycobiology*, v. 40, p. 59–66, 2012.

ISLAN, M. D. T.; RAHMAN, M. M.; PANDEY, P. *Bacilli* and agrobiotechnology: phytostimulation and biocontrol. *Bacilli in Climate Resilient Agriculture and Bioprospecting*, p.143-150, 2019.

JABER, L. R.; OWNLEY, B. H. Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens? *Biological Control*, v. 116, p. 36-45, 2018.

JENSEN, D. F. et al. Biological control using microorganisms as an alternative to disease resistance. In: Collinge, D. B. (Ed.) *Plant pathogen resistance biotechnology*. Wiley Blackwell: New York and London, p. 341–363, 2016

Jl, S. H. et al. Biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CNU114001 against fungal plant diseases. *Mycobiology*, v. 41, n. 4, p. 234-242, 2013.

JIN, Y.-X.; et al. Metabolomics- based component profiling of *Halomonas* sp. KM-1 during different growth phases in poly(3-hydroxybutyrate) production. *Bioresource Technology*, v.140, p.73-79, 2017.

KAI, M. et al. Bacterial volatiles and their action potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.81, p.1001-1012, 2009.

KAMPFER, P. et al. *Bacillus gossypii* sp. nov., isolated from the stem of *Gossypium hirsutum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 65, p. 4163-4168, 2015.

KESWANI; et al. Formulation technology of biocontrol agents: present status and future (eds.) In: ARORA N.K. et al. *Bioformulations: for Sustainable Agriculture*, cap. 2, p.35-52, 2016.

KHARDZIANI, T. et al. Elucidation of *Bacillus subtilis* KATMIRA 1933 potential for spore production in submerged fermentation of plant raw materials. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, v. 9, n. 4, p. 435-443, 2017.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, p. 345–351, 2002.

KÖHL, J.; ROGIER, K.; RAVENSBERG, W. J. Mode of Action of Microbial Biological Control Agents Against Plant Diseases: Relevance Beyond Efficacy. *Front. Plant Sci.*, v.10, p. 8-45, 2019.

KOKCHA, S. et al. Noncontiguous-finished genome sequence and description of *Bacillus timonensis* sp. nov. *Stand Genomic Science*, v.6, n.3, p.346-355, 2012.

- KONG, Q. et al. Overexpression of the bivalent antibacterial peptide genes in *Pichia pastoris* delays sour rot in citrus fruit and induces *Geotrichum citri-aurantii* cell apoptosis. *Food Biotechnology*, v. 30, n. 2, p. 79-97, 2016.
- KOREJO, F. et al. Evaluation of antibacterial and antifungal potential of endophytic fluorescent *Pseudomonas* associated with *Salvadora persica* L. and *Salvadora oleoides* Decne. *Pak J Bot*, v. 49, p. 1995-2004, 2017.
- KULIMUSHI, P. Z. et al. Stimulation of fengycin-type antifungal lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* in the presence of the maize fungal pathogen *Rhizomucor variabilis*. *Frontiers in microbiology*, v. 8, n. 850, 2017.
- KUMAR, A. et al. Isolation, screening and characterization of bacteria from Rhizospheric soils for different plant growth promotion (PGP) activities: an *in vitro* study. *Recent Research in Science and Technology*, v.4, p.1-5, 2012.
- LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M; PINHO, R. S. C. de. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. *Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas*, Chapadinha, v. 4, n.2, p.12,2010.
- LASTOCHKINA, O. *Bacillus subtilis*-Mediated Abiotic Stress Tolerance in Plants. *In: Islan, M. D. T.; et al. Bacilli and Agrobiotechnology: Phytostimulation and Biocontrol*. v. 2, cap. 6, p. 97-125, 2019.
- LEELASUPHAKUL, W.; HEMMANEE, P.; CHUENCHITT, S. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, v. 48, p. 113-121, 2018.
- LEYBOURNE, D. J. et al. The price of protection: A defensive endosymbiont impairs nymph growth in the bird cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi*. *Insect Sci*, v. 27, p. 69-85, 2020.
- LIMA, O. D. D. R. et al. Ação antifúngica *in vitro* de isolados de *Bacillus* sp. sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Revista Caatinga*, v. 27, p. 57-64, 2014.
- LIMA, V. M. G. et al. Effect of the nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. *Food Technology and Biotechnology*, v.41, p.105-110, 2003.
- LIU, B. et al. Biological control of take-all in wheat by endophytic *Bacillus subtilis* E1R-j and potential mode of action. *Biological Control*, v.49, n.3, p.277-285, 2009.
- LIU, Y. et al. *Bacillus zhangzhouensis* sp. nov. and *Bacillus australimaris* sp. nov. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, v.6, p.1193-1199, 2016.
- LIU, Y. et al. Reclassification of *Bacillus invictae* as a later heterotypic synonym of *Bacillus altitudinis*. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, v.65, p.2769-2773, 2015.

- LOGAN, N. A. et al. Aerobic endospore-forming bacteria from geothermal environments in northern Victoria Land, Antarctica, and Candlemas Island, South Sandwich archipelago, with the proposal of *Bacillus fumarioli* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, London, v. 50, n. 5, p. 1741-1753, 2000.
- LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, v. 63, p. 541-556, 2009.
- LUNA-BULBARELA, A. et al. Efeitos de bacilomicina D homologues produzidos por *Bacillus amylooliquefaciens* sobre crescimento e viabilidade de *Colletotrichum gloeosporioides* em diferentes estágios fisiológicos. *Biological Control*, v. 127, p. 145-154, 2018.
- MADIGAN, M. et al. *Microbiologia de Brock*, 14^o ed. Porto Alegre: Artmed, 2016, 960 p.
- MAIER, R.M. Bacterial growth. In: *Environmental Microbiology* ed. Maier, R.M., Pepper, I.L. and Gerba, C.P. Burlington, MA: Elsevier/Academic Press. p.37–54, 2009.
- MANOUSSOPOULOS, Y. Effects of three strawberry entomopathogenic fungi on the prefeeding behavior of the aphid *Myzus persicae*. *Journal of Insect Behavior*, v. 32, p. 99-108, 2019.
- MASCARIM, G. M. *et al.* Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.127, p.11-20, 2015.
- 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, p. 2387-2401, 2021. doi:10.1111/jam.15095
- MELO, I. S. DE. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.). *Controle Biológico*. Jaguariúna: Embrapa, p. 17-66, 1998.
- MENDES, G. et al. Optimization of *Aspergillus niger* phosphate solubilization in solid state fermentation and use of the resulting product as a P fertilizer. *Microbiology and Biotechnology*, v. 8, p. 930-939, 2015.
- MENG, Q. M.; JIANG, H.; HAO, J. Effects of *Bacillus velezensis* strain BAC03 in promoting plant growth. *Biological Control*, v. 98, p. 18-26, 2016.
- MERRILL, L. et al. Composition of *Bacillus* species in aerosol from 11 U.S. *Journal of Forensic Science*, v.51, p.559-565, 2006.
- MIHALACHE, G. et al. Lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* as new biocontrol products against fusariosis in ornamental plants. *Environmental Science and Pollution Research International*, v.25, p.29784-29793, 2017.

- MIRANDA, C. A.; MARTINS, O. B.; CLEMENTINO, M. M. Species-level identification of *Bacillus* strains isolates from marine sediments by conventional biochemical, 16S rRNA gene sequencing and inter-tRNA gene sequence lengths analysis. *Antonie van Leeuwenhoek*, Dordrecht, v. 93, n. 3, p. 297-304, 2008.
- MONDOL, M.A.M.; SHIN, H.J.; ISLAM, M.T. Diversity of secondary metabolites from marine *Bacillus* species: chemistry, biosynthesis and biological activity. *Marine Drugs*, v.11, p.2846-2872, 2013.
- MONGKOLTHANARUK, W. Classification of *Bacillus* beneficial substances related to plants, humans and animals. *Journal of Microbiology Biotechnology*, v.22, p.1597-1604, 2012.
- MONTEIRO, S. M. S. et al. Enhanced spore production of *Bacillus subtilis* grown in a chemically defined medium. *Advances in Microbiology*, v. 4, p. 444-454, 2014.
- MONTGOMEY, D.C., Design and analysis of experiments, 6th ed. John Wiley and Sons, Inc., New York, 2005.
- MORANDI, M.A.B.; BETTIOL, W. Controle Biológico de doenças de plantas no Brasil. IN: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. Controle de doenças de plantas: uso e perspectivas. Embrapa: Jaguariúna, 2009, 341 p.
- ODUM, E. P. Fundamentals of ecology. Philadelphia: WB Saunders; 1953.
- 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, 104764, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104764>
- PALAZZINI, J. M. et al. *Bacillus velezensis* RC 218 as a biocontrol agent to reduce *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation: genome sequencing and secondary metabolite cluster profiles. *Microbiology Research*, v. 192, p. 30-36, 2016.
- PALMA, M. B. Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido 169 p. Tese Doutorado em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2003.
- PANDEY, A. Solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v.13, p.81-84, 2003.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LEON, J. A. R. Solid-State fermentation in biotechnology: fundamentals and applications. 1.ed. New Delhi: Asiatech Publishers, INC, 2001. 231p.
- PAULITZ, T. C. Biochemical and ecological aspects of competition in biological control. In: BAKER, R. R. (Ed.). *New directions in biological control: alternatives for suppressing agricultural pests and diseases*. New York: Liss, p.713-724, 1990.
- PEREIRA, M. J. Z.; RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. F. B. Inheritance of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* Brazilian race 2 in common bean. *Scientia Agricola*, v.66, p.788-792, 2009.

- PIETERSE, C. M. J. et al. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Reviews Phytopathology*, v. 52, p. 347–375, 2014.
- PRASHAR, P.; KAPOOR, N.; SACHDEVA, S. Isolation and characterization of *Bacillus* sp. with *in vitro* antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* from rhizosphere of tomato. *J. Agric. Sci. Technol.*, v. 15, p. 1501–1512, 2013.
- PRIEST, F.G. et al. *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics. American Society for Microbiology, Washington, D.C., p.1–16, 1993.
- PRIEST, F.G. *In*: HARWOOD, C.R. Isolation and identification of aerobic endospore-forming bacteria. *In*: HARWOOD, C. R. ed., *Biotechnology Handbook 2: Bacillus*, Plenum Press, New York, p. 27-59, 1989.
- PRIHATNA, C. et al. A novel tomato *Fusarium* wilt tolerance gene. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, p. 1226, 2018.
- RADHAKRISHNAN, R. et al. *Bacillus*: a biological tool for crop improvement through bio-molecular changes in adverse environments. *Frontiers in Physiology*, v. 8, p. 6-67, 2017.
- RAHMAN, M. M.; MOCCALDI, L. A. Application method and efficacy of *Bacillus* spp. in mitigating abiotic and biotic stresses and enhancing plant performance. *In*: ISLAN, M.D.T. et al. *Bacilli and Agrobiotechnology: Phytostimulation and Biocontrol*, v.2, cap.14, p.267-285, 2019.
- RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.1, n.3, 1998.
- RAJKUMAR, M. et al. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends Biotechnology*, v. 28, p. 142-149, 2010.
- RAMYABHARATHI, S.; MEENA, B.; RAGUCHANDER, T. Induction of chitinase and β -1,3-glucanase PR proteins in tomato through liquid formulated *Bacillus subtilis* EPCO 16 against *Fusarium* wilt. *Journal Today Biologic Science Res Reviews* v.1, n.1, p.50-60, 2012.
- RAO, A. P. et al. Biological control mechanisms against plant-based pathogens. *Journal of Biopesticides and Environment*, v. 3, p. 1–11, 2016.
- RASHAD, Y. M. et al. Synergy between endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* GGA and arbuscular mycorrhizal fungi induces plant defense responses against white rot of garlic and improves host plant growth. *Phytopathologia Mediterranea*, v. 59, n; 1, p. 169-186, 2020.
- RAVENSBERG, W. J. Commercialization of microbes: present situation and future prospects. *In*: *Principles of Plant-Microbe Interactions. Microbes for Sustainable Agriculture*, ed. LUGTENBERG, B. Springer. p. 309–317. 2015.
- REAL, G.; HENRIQUES, A. O. Controlo da iniciação da esporulação em *Bacillus subtilis*. *Boletim de Biotecnologia*, Lisboa, v.68, p.2-12, 2001.

- RIBEIRO, V. P. et al. Endophytic *Bacillus* strains enhance pearl millet growth and nutrient uptake under low-P. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 49, p. 40-46, 2018.
- RIJAVEC, T. et al. Isolation of bacterial endophytes from germinated maize kernels. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 53, n. 6, p. 802-808, 2007.
- ROBERTS, M. R.; TAYLOR, J. E. Exploiting plant induced resistance as a route to sustainable crop production. *In*: COLLINGE, D. B. (Ed.) *Biotechnology for plant disease control*. Wiley Blackwell: New York and London, p. 319-339, 2016.
- ROCHA, D. J. A.; MOURA, A. B. Controle biológico da murcha do tomateiro causada por *Ralstonia solanacearum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* por rizobactérias. *Tropical Plant Pathology*, v. 38, p. 423-430, 2013.
- ROCHA, F. Y. O. et al. Taxonomical and functional characterization of *Bacillus* strains isolated from tomato plants and their biocontrol activity against races 1, 2 and 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Applied Soil Ecology*, v. 120, p. 8-19, 2017.
- RODRIGUES, A. M.; SANTANA, E. S. Efeito do cloreto de sódio na produção de proteínas (*Saccharomyces cerevisiae*) em fermentação semi-sólida. *Revista Ciências Tecnologia Alimentar*, v.21, n.1, p. 57-62, 2001.
- ROMERO, D. et al. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, v.20, p.430-440, 2007.
- RUSSELL, B.L.; JELLY, S.A.; YOUSSTEN, A.A. Carbohydrate metabolism in the mosquito pathogen *Bacillus sphaericus*. *Applied Environmental Microbiology*, v.55, p. 294-297, 1989.
- SALAZAR, B. et al. *Bacillus* spp. as bio-factories for antifungal secondary metabolites: innovation beyond whole organism formulations. *Microbiology Ecology*, 2022.
- SANTNER, A.; ESTELLE, M. Recent Advances and Emerging Trends in Plant Hormone Signalling. *Nature*, v. 459, n. 7250, p. 1071-1078, jun. 2009.
- SANTOS, S. F. de M.; Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato. 2007. Tese de Doutorado – Engenharia Química Da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 2007.
- SCHMIDT, F. R. Optimization and scale up of industrial fermentation processes. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 68, p. 425-435, 2005.
- SEHRAWAT, A. et al. Hydrogen cyanide production by soil bacteria: biological control of pests and promotion of plant growth in sustainable agriculture. *Pedosphere*, v. 32, nº 1, p. 15-38, 2022.

SELLA, S. R. B. R. et al. Lab-scale production of *Bacillus atropheus* spores by solid state fermentation in different types of bioreactors. Brazilian Archive of Biology and Technology, v.52, p. 159-170, 2009.

SELO, G. et al. A Comprehensive review on valorization of agro-food industrial residues by solid-state fermentation. Foods, v. 10, n. 5, p. 9-27, 2021.

SENDI, Y. et al. Potential of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) root microbiome in the biocontrol of root rot disease and traits of performance. J Plant Dis Protec, v. 127, p. 453-462, 2020.

SHAFI, J.; TIAN, H.; JI, M. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. Biotechnology & Biotechnological Equipment, v. 31, n. 3, p. 446-459, 2017.

SHAHID, I. et al. Profiling of metabolites of *Bacillus* spp. and their application in sustainable plant growth promotion and biocontrol. Frontiers in Sustainability Food System, v. 5, p. 605195, 2021.

SHARMA, R.; DAHIYA, A.; SINDHU, S S. Harnessing proficient rhizobacteria to minimize the use of agrochemicals. International Journal of Current Microbiology and Applied Science, v. 7, p. 3186-3197, 2019.

SHEN, Y. et al. Quantitative metabolic network profiling of *Escherichia coli*: an overview of analytical methods for measurement of intracellular metabolites. Trends Analytical Chemistry, v.75, p.141-150, 2016.

SHIN, J. H. et al. Antagonistic and plant growth-promoting effects of *Bacillus velezensis* BS1 isolated from rhizosphere soil in a pepper field. Plant Pathology Journal, v. 37, n. 3, p. 307-314, 2021.

SHUAIB, M. et al. Variation and succession of microbial communities under the conditions of persistent heavy metal and their survival mechanism. Microbial Pathogenesis, v.150, 104713, 2021.

SIEFERT, J. L. et al. Phylogeny of marine *Bacillus* isolates from the Gulf of Mexico. Current Microbiology, New York 41, n. 2, p.84-88, 2000.

SILVA, G. K. C. et al. Utilização de resíduo agroindustrial como materia prima para a produção de ácido cítrico por *Kluyveromyces marxianus* URM 4404. Scientia Plena, v. 8, n. 5, p.1-6, 2012.

SINDHU, S S. et al. Biopesticides: use of rhizosphere bacteria for biological control of plant pathogens. Defence Life Science Journal, v. 1, p. 135-148, 2016.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Auxin and plant-microbe interactions. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, v.3, n.4, 2011.

SRINIVAS, C. et al. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causal agent of vascular wilt disease of tomato: Biology to diversity-A review. Saudi Journal of Biological Sciences, v. 7, p. 1315-1324, 2019.

- STACKEBRANDT, E.; *et al.* Comparative 16S rRNA oligonucleotide analyses and murein types of round-spore-forming bacilli and non-spore-forming relatives. *Journal of General Microbiology*, v.133, p.2523–2529, 1987.
- STANBURY, P.; WHITAKAR, A.; HALL, S. J. *Principles of Fermentation Technology*. Aditya Books, New Delhi, 1997.
- STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol. Microbiol.*, v. 56, n. 4, p. 845-857, 2005.
- STRAGIER, P.; LOSICK, R. Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annual Reviews of Genetics*, v.30, p.297-341, 1996.
- SYRANIDOU, E. *et al.* Exploitation of endophytic bacteria to enhance the phytoremediation potential of the wetland helophyte *Juncus acutus*. *Frontiers in Microbiology*, v. 07 (1408), 2016.
- TEIXIDÓ, N. *et al.* Biological control of postharvest diseases in fruit and vegetables. *In: LACROIX, C.*, (Ed.), *Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage*. Woodhead Publishing Limited. Cambridge, p. 364-402, 2011.
- THAKKAR, A. SARAF, M. Development of microbial consortia as a biocontrol agents for effective management of fungal disease in *Glycine max* L. *Archives of Phytopathology and Protection*, v. 48, p. 459-474, 20150.
- TORRES, M. *et al.* Growth promotion on horticultural crops and antifungal activity of *Bacillus velezensis* XT1. *Applied Soil Ecology*, v. 150, p. 103-453, 2020.
- TRONSMO, A. M. *et al.* Biological control of plant diseases. *In: TRONSMO, A.M. et al.* (Eds.). *Plant pathology and plant diseases*. Wallingford: CABI, p. 289-306, 2020.
- VASSILEV, N.; MENDES, G. Solid-state fermentation and plant-beneficial microorganisms. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Current Advances in Solid-State Fermentation*, Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, p. 402–416, 2018.
- VEJAN, P. *et al.* Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability - a review. *Molecules*, v. 21, 573p., 2016.
- WANG, C. *et al.* Effects of *Bacillus velezensis* FKM10 for promoting the growth of *Malus hupehensis* Rehd. and inhibit fusarium verticillioides. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, p.28-89, 2019.
- WARD, O. P. *Bioteconología de la fermentación*. Zaragoza, España: Acribia, 1991. 274 p.
- WELLER, D. M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, v.26, p.379-407, 1988.

WU, J. Y. et al. Kinetic analysis on precursors for iturin, a production from *Bacillus amyloliquefaciens* BPD1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 126, n. 5, p. 630-635, 2018.

WU, Y. et al. Biocontrol traits and antagonistic potential of *Bacillus amyloliquefaciens* Strain NJZJSB3 against *Sclerotinia sclerotiorum*, a causal agent of canola stem rot. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 24, p. 1327-1336, 2014.

YÁNEZ-MENDIZÁBAL, V. et al. Production of the postharvest biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8 using low cost commercial products and by-products. *Biol Control.*, v. 60, p. 280–289, 2011.

ZHANG, L.; SUN, C.; Fengycins, cyclic lipopeptides from marine *Bacillus subtilis* strains, kill the plant-pathogenic fungus *Magnaporthe grisea* by inducing reactive oxygen species production and chromatin condensation. *Applied Environmental Microbiology*, v.84, n.18, p.418-445, 2018.