

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

JOÃO GUILHERME BUZETTO TSUCHIYA

MULTIPLICAÇÃO DE *Bacillus subtilis* ATCC-6051 e *Trichoderma harzianum*
Rifai 60850 POR MEIO DA VINHAÇA DE SOJA: ALTERNATIVA DE MEIO DE
CULTURA LIQUÍDO

CAMPO MOURÃO

2022

**MULTIPLICAÇÃO DE *Bacillus subtilis* ATCC-6051 e *Trichoderma harzianum*
Rifai 60850 POR MEIO DA VINHAÇA DE SOJA: ALTERNATIVA DE MEIO DE
CULTURA LIQUÍDO**

**Multiplication of *Bacillus subtilis* atcc-6051 and *Trichoderma harzianum* rifai
60850 by means of soy vinasse: alternative liquid culture medium**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado como requisito para obtenção do título
de Bacharel em Engenharia Ambiental/Departamento
Acadêmico de Ambiental (DAAMB) da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).
Orientador (a): Prof. Dr. Paulo Agenor Alves Bueno.
Co-orientador (a): Téc. Dr^a. Adriele Rodrigues dos
Santos.

CAMPO MOURÃO

2022



Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho,
para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s)
autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados
nesta obra não são cobertos pela licença.

JOÃO GUILHERME BUZETTO TSUCHIYA

**MULTIPLICAÇÃO DE *Bacillus subtilis* ATCC-6051 e *Trichoderma harzianum*
Rifai 60850 POR MEIO DA VINHAÇA DE SOJA: ALTERNATIVA DE MEIO DE
CULTURA LIQUÍDO**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado como requisito para obtenção do título
de Bacharel em Engenharia Ambiental/Departamento
Acadêmico de Ambiental (DAAMB) da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 14/junho/2022

Prof^a. Ana Paula Peron
Doutorado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof^a. Elizabete Satsuki Sekine
Doutorado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Tec^a. Adriele Rodrigues dos Santos
Doutorado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Paulo Agenor Alves Bueno
Doutorado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

CAMPO MOURÃO

2022

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, na tentativa de fugir das definições que o alocam em qualquer religião que seja, o definindo com início, meio e fim, agradeço assim a todo o Deus que por algum motivo quis minha existência, e hoje e sempre me deu suporte a minha formação.

Agradeço a minha família, minha querida mãe Sidnéia, meu querido pai Ricardo Norio, e meus irmãos Fabiana, Paulo Vitor, Lucas e Ester.

Agradeço a toda turma em que entrei em Engenharia de Alimentos (2016/1), em especial agradeço os seres humanos incríveis que tive o prazer de um dia chamar de amigos: Giovanni, Massao, Júlio, Giovanna. Agradeço também a todos os professores que por pouco tempo pude ter o prazer de ter aula.

Agradeço também a toda turma de Engenharia Ambiental, no qual hoje faço parte. Agradeço em especial àqueles que um dia estive na mesa do bar, ou até tenha chamado de amigos, Adolfo, Yasser, Miqueias, Diego.

Agradeço a todos os professores que tive a oportunidade de ter aula, de conhecer e de aprender seja do departamento de Ambiental, ou qualquer outro, e agradeço em especial, aquele que se tornou meu orientador logo cedo Paulo Agenor Alves Bueno, aquela que chegou a me orientar e hoje faz parte da banca Elizabete Sekine, além de meus agradecimentos especiais, a professora que também é banca Ana Paula Peron, com quem aprendi muitas coisas relacionadas ao tema de TCC. Não poderia deixar de agradecer também a professora Raquel pelos ensinamentos na escrita que foram valiosos para este trabalho final.

Agradeço as pessoas lindas que estiveram no meu caminho, como o Guilherme Canesin, Bruna Gaspari, Beatriz Rodrigues, Gustavo Galvão, Bruno Dall Molin.

É engraçado terminar um trabalho de um ano agradecendo pessoas no qual tem esse tempo na minha vida, agradecer pessoas que fizeram parte disso, mas nem amigos somos, a vida passa de uma maneira durante o curso que só vemos o peso de algumas escolhas quando paramos para agradecer.

Assim eu agradeço alguma das coisas mais importantes que ocorreu no curso, o fato de eu ter feito estagio na Agrocels, empresa parceira dessa pesquisa. Agradeço a toda à equipe que esteve neste período e que ainda está por lá, Isadora Cristofoli, Lucas Ribeiro, Yumi Munetiko, Leonardo Coletto, Andressa Kuibida, Cristian Coelho, e de forma muito especial agradeço ao Pedro Henrique, que foi um

dos motivos de eu ter conseguido o estágio lá, e também a minha querida co-orientadora Adrielle Rodrigues dos Santos.

Agradeço as queridas pessoas do meu estágio atual, que me permitiram não apenas expor meu jeito de trabalhar, mas também me permitiram fazer diversas práticas e escritas durante o horário de estágio, Vanessa Rodrigues, Antônio Lima, Brenda Dall Molin, Estevam Brandão, Danilo Brasileiro, Kassia, Moacir, Marcelo.

Agradeço as pessoas que vieram antes mesmo de eu entrar na faculdade, mas que com certeza tiveram papel nessa jornada, como o pessoal do Técnico em Mecânica, alunos e professores, os profissionais com quem trabalhei na usina que se tornaram grandes amigos, a exemplo o Olegário, além dos meus queridos amigos, Pedro, Leonardo e Neto.

Agradeço a todos os profissionais ligados a universidade, prestadores de serviço como o RU, às moças da limpeza e os profissionais de serviços em gerais, o pessoal do DEPED, pois sem essas pessoas, eu talvez não estivesse chegado até aqui sem se preocupar com algumas coisas.

Agradeço a todos os profissionais de saúde e demais profissionais envolvidos no enfrentamento do corona vírus, momento este que vive e agradeço pela lucidez em acreditar na ciência.

Finalizando eu agradeço a pessoa mais importante dessa minha fase, devido aos acontecimentos, devido aos percalços, devido a tantas coisas, sempre esteve do meu lado, e hoje continua como uma grande amiga e parceira, Beatriz de Freitas.

E por fim, eu agradeço a mim mesmo, tento me perdoar pelos menos de procrastinação, tento me entender como pessoa, mas ainda assim tenho orgulho do trabalho feito e da jornada caminhada.

Se andarmos pelos caminhos que outros já
percorreram, chegaremos no máximo aos lugares
que eles já atingiram!
(AUGUSTO CURY, 2008).

RESUMO

Conforme a um aumento da demanda por alimentos, aumenta-se o uso de agrotóxicos. Além desse fator, a facilidade de uso que esses produtos químicos trazem, fazem com que sejam cada vez mais usados. No entanto trazem com seu alto consumo problemas ambientais e de saúde humana. Buscando alternativas mais sustentáveis, a utilização de fungos e bactérias ganha destaque, porém os custos em relação à meio de cultura podem ser um entrave. Buscando solucionar esse problema estudos testando diversos resíduos da indústria, como meio de cultura base é realizado. Dessa forma o objetivo desse estudo foi testar a vinhaça de soja como meio de cultura líquido para crescimento de *Bacillus subtilis* e *Trichoderma harzianum*. Para alcançar a resposta a esse objetivo, testes em incubadora *shaker*, biorreator de bancada atrelado à técnica de diluição seriada, foram usados no estudo. Em incubado *shaker* a vinhaça concentrada se mostrou promissora, não havendo diferença significativa em relação aos tratamentos junto ao controle. Já a vinhaça *in natura*, testada em biorreator de bancada, para o micro-organismo *B. subtilis*, não mostrou bons resultados apresentando decaimento, mas para o micro-organismo *T. harzianum* continuou se mostrando promissora, promovendo um crescimento de três logs em cinco dias de processo. Assim concluiu-se que a vinhaça de soja é um resíduo agroindustrial promissor para meio de cultura alternativo para *T. harzianum* quando aplicado em biorreatores, e acredita-se que seja necessário um estudo aprofundado em relação a sua aplicabilidade para *B. subtilis* e outros micro-organismos, variando as condições físicas.

Palavras-chave: fungos e bactérias; resíduo agroindustrial; biorreator.

ABSTRACT

As the demand for food increases, the use of pesticides increases. In addition to this factor, the ease of use that these chemicals bring makes them increasingly used. However, they bring with their high consumption environmental and human health problems. Seeking more sustainable alternatives, the use of fungi and bacteria is highlighted, but the costs in relation to the culture medium can be an obstacle. Seeking to solve this problem, studies testing various industrial residues, as a base culture medium, are carried out. Thus, the objective of this study was to test soybean vinasse as a liquid culture medium for the growth of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum*. To achieve the answer to this objective, tests in a shaker incubator, benchtop bioreactor linked to the serial dilution technique, were used in the study. In incubated shaker, the concentrated vinasse proved to be promising, with no significant difference in relation to the treatments with the control. In natura vinasse, tested in a bench bioreactor, for the microorganism *B. subtilis*, did not show good results, showing decay, but for the microorganism *T. harzianum* it continued to show promise, promoting a growth of 3 logs in 5 days of process. Thus, it is concluded that soybean vinasse is a promising agro-industrial residue for an alternative culture medium for *T. harzianum* when applied in bioreactors, and it is believed that an in-depth study is necessary in relation to its applicability to *B. subtilis* and other microorganisms, varying the physical conditions.

Keywords: fungi and bacteria; agro-industrial residue; bioreactor.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	Objetivos	12
1.1.1	Objetivo Geral	12
1.1.2	Objetivos Específicos	12
1.2	Justificativa	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	Micro-organismos multifuncionais	14
2.2	Características de <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Trichoderma harzianum</i> e aplicações	14
3	MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1	Micro-organismos e condições de cultivo	17
3.2	Avaliação da viabilidade de aplicação da vinhaça de soja como meio decultura e suas concentrações	18
3.3	Crescimento de <i>B. subtilis</i> e <i>T. harzianum</i> em biorreator de bancada	19
3.4	Avaliação do crescimento dos micro-organismos	20
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.2	Composições da vinhaça de soja da empresa CJ Selecta	24
4.1	<i>Bacillus subtilis</i>	26
4.2	<i>Trichoderma harzianum</i>	30
5	CONCLUSÃO	33
	REFERÊNCIA	34

1 INTRODUÇÃO

O uso intensivo de agrotóxicos para proteção de culturas contra doenças e pragas, é vantajoso devido às suas facilidades de uso e sua eficiência, fatores estes que influenciam sua aplicação. No entanto, as preocupações com os problemas ambientais, como desequilíbrio biológico, contaminação de alimentos, do solo e de corpos d'água, resistência de patógenos em relação às ciclagens de nutrientes, (BETTIOL e MORANDI, 2009), além dos problemas em relação à saúde humana (TAVARES *et al.*, 2020).

Essas adversidades fazem com que surjam pesquisas em busca de soluções mais sustentáveis. Sendo que, a utilização dos inoculantes biológicos a base de fungos e bactérias, se apresenta como uma excelente alternativa, pois para o controle de pragas, no caso dos fungos agem por endoparasitismo, predação, para o caso das bactérias elas agem de formas de antibiose, competição, produção de enzimas, indução de resistência da planta, estímulo de germinação além de ambos os micro-organismos possuírem a capacidade de produção de metabólitos tóxicos para eventuais pragas (NEVES, *et al.*, 2021). Além de trazerem benefícios para a planta como um todo (tendo como locais de aplicação pela semente, raízes, solo e folhas), ajudando no desenvolvimento da cultura, auxiliando na ciclagem de nutrientes do solo, e ainda protegendo o plantio de pragas e doenças (LOPES *et al.*, 2021).

Dentre as principais dificuldades que são encontradas para a migração para o manejo biológico, estão os cuidados relacionados à manipulação dos produtos biológicos, assim como os controles de qualidade em relação aos bioprocessos de produção (BETTIOL e MORANDI, 2009). Outro fator que influencia essa transição de manejos é a questão financeira em relação ao meio de cultura, fato este que acaba por elevar o preço final do produto (CAPALBO *et al.*, 1991).

Nesse sentido, muitos pesquisadores buscam viabilizar os custos relacionados ao preparo de um meio de cultura líquido, que é utilizado no processo de multiplicação dos micro-organismos de interesse agrônômico. Estes estudos são realizados com diversos resíduos agroindustriais, envolvendo diferentes espécies de bactérias ou fungos, visando à economia em relação aos meios de culturas tradicionais. Capalbo *et al.* (1991) utilizou quatro resíduos: líquido de indústria de glutamato monossódico, água de coco filtrada (descarte da indústria de leite de coco

e derivados), melão de cana-de-açúcar e suplemento mineral de algas, para dar suporte nutricional a bactéria *Bacillus thuringiensis kurstaki*. Cardozo (2009) utilizou vinhaça de cana-de-açúcar, para crescimento celular de *Bacillus subtilis*, e ROVINA *et al.* (2018) fez o uso de resíduo de casca de laranja, para produção de biossurfactantes.

Outro resíduo que pode ser usado é o melão de soja, gerado a partir da produção do concentrado proteico de soja. Nesse sentido, Pecin (2018) avaliou a produção de substâncias antimicrobianas utilizando melão de soja, otimizado ou não, através da fermentação do fungo *Lasiodiplodia theobromae*, em incubadora *shaker*. Mello (2020) fez a utilização do melão de soja, para produção de biogás. Além destes, o melão de soja é usado para produção de bioetanol, como é feito pela empresa CJ Selecta (2021a) que, a partir de um processo de fermentação, tem como resultado final etanol e vinhaça de soja. Mesmo após esse processo, e a vinhaça de soja sendo caracterizada como resíduo, ela apresenta uma composição rica em nutrientes como fontes de nitrogênio e carboidrato.

Além dos meios de culturas alternativos, testes de otimização a partir da utilização de biorreatores também são frequentes, principalmente quando o objetivo é produzir algum composto. Dessa forma Picão (2020), ao estudar produção de Riboflavina, a partir do *B. subtilis*, que ao ser empregado um biorreator aerado e agitado (STR), que relaciona a taxa de aeração e velocidade de rotação, com o crescimento celular e a produção de riboflavina, demonstrando que a disponibilidade de oxigênio gerada a partir de uma maior rotação está implicada em maiores taxas de crescimento, fato este que é inversamente proporcional em relação à produção de riboflavina. Mayer *et al.* (2019), cita a produção de fungos do gênero *Trichoderma* com a utilização de melão de cana e levedo de cerveja, aplicando fermentação líquida em fermentadores aerados

O micro-organismo *B. subtilis*, está presente nos produtos biológicos brasileiros registrados no MAPA, além de compor em um dos principais produtos desenvolvidos pela Embrapa (MAPA, 2019; CROP LIFE, 2020). Da mesma forma o *Trichoderma harzianum* do gênero *Trichoderma*, que é comumente utilizado na agricultura brasileira, está presente em 66% dos produtos biológicos fúngicos desde gênero (Mayer *et al.*, 2019).

Dessa forma, alinhando a problemática envolvida com o uso dos agrotóxicos, junto a uma solução acessível que é o uso de produtos biológicos à base de fungos e bactérias, a exemplo de *T. harzianum* e *B. subtilis*, considerou-se a utilização da vinhaça de soja como meio de cultura líquido, buscando o crescimento destes micro-organismos.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar utilização do resíduo agroindustrial (vinhaça de soja) oriundo do processo de produção de etanol combustível, como meio de cultura de crescimento dos micro-organismos de interesse agrícola *Bacillus subtilis* ATCC-6051 e *Trichoderma harzianum* Rifai 60850.

1.1.2 Objetivos Específicos

Verificar por meio de uma análise física e química, da vinhaça de soja concentrada e *in natura*, se em sua composição, ainda há componentes que suporte o crescimento dos micro-organismos *T. harzianum* e *B. subtilis*;

Utilizar a vinhaça de soja concentrada como meio de cultura líquido, em diferentes concentrações, avaliando o crescimento dos micro-organismos *T. harzianum* e *B. subtilis*, propondo uma alternativa de uso para o resíduo;

Otimizar o processo de multiplicação celular dos micro-organismos *T. harzianum* e *B. subtilis*, utilizando vinhaça de soja *in natura* em biorreator STR.

1.2 Justificativa

Os resíduos agroindustriais do final do processo de produção do etanol combustível, como a vinhaça de cana-de-açúcar, devido à sua composição química, não podem ser despejados diretamente em um corpo d'água sem um tratamento prévio. Por isso, estes são geralmente utilizados nas lavouras de cana.

Similar à vinhaça de cana, a vinhaça de soja também possui características químicas que fariam necessário seu tratamento preliminar. Portanto, utilizar este resíduo para o crescimento de micro-organismos, podendo auxiliar no crescimento e proteção de culturas agrícolas, atrelando um valor econômico a este e, evitando os gastos com tratamento para seu descarte no meio ambiente, é uma excelente

alternativa para as indústrias produtoras deste resíduo, além de se tornar uma alternativa barata com base de meio de cultura.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Micro-organismos multifuncionais

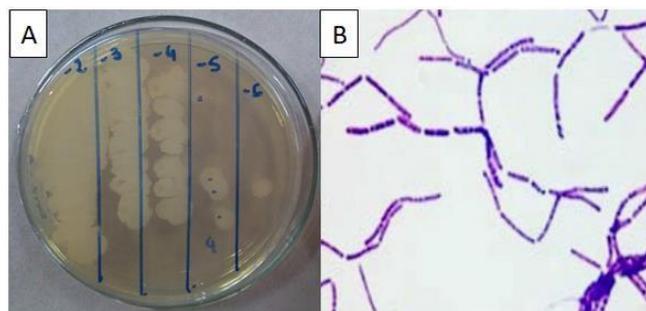
As rizobactérias promotoras de crescimento de planta (RPCPs) possuem a característica de promover o crescimento da planta e são naturalmente encontradas no solo. Os gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum* e *Rhizobium* são geralmente estudados para aplicação na agricultura (ARAÚJO, 2008). Entretanto, espécies do gênero *Bacillus* são os micro-organismos mais estudados do grupo das RPCPs. Isso se deve a sua alta capacidade de formar esporos, o seu estabelecimento em condições adversas de temperatura, pH e na presença de pesticidas, além de possibilitar um maior tempo de estocagem (OLIVEIRA, 2006).

Além das rizobactérias Rezende *et al.* (2021), cita a utilização do fungo *Trichoderma sp.*, como micro-organismo multifuncional, que pode dar suporte nas práticas de agricultura sustentável. Estas espécies de fungos são aplicadas com o intuito de se obter um biocontrole para a planta (MUNIZ *et al.*, 2018), além de promover o crescimento vegetal, isso porque contribui para o aumento da taxa de germinação, além da capacidade de solubilizar fósforo (CHAGAS *et al.*, 2017).

2.2 Características de *Bacillus subtilis* e *Trichoderma harzianum* e aplicações

A espécie *Bacillus subtilis* é caracterizada pelo formato de bacilo, além de ser uma bactéria Gram-positiva, que ao ser submetido à técnica de coloração, apresenta uma coloração roxa, e dependendo do ágar a morfologia de sua colônia apresenta coloração esbranquiçada (Figura 1) (CARVALHO, 2005). Uma das grandes vantagens dessa bactéria é a capacidade de formação de endósporos e a ausência de endotoxinas, sendo que este tipo de formação é considerado a forma de vida mais resistente do planeta, suportando condições adversas de temperatura, pH e até presença de água, o que facilita e dá seguranças em etapas de armazenamento por exemplo (CAVALCANTE, 2013; MONNERAT *et al.*, 2020).

Figura 1. A) Colônia típica de *B. subtilis* em diluição seriada e B) resultado de coloração Gram de *B. subtilis*.



Fonte: Autoria própria (2022).

Esta espécie se destaca pela geração de metabólitos, e criação de biofilmes que ajudam na proteção das plantas (MONNERAT *et al.*, 2020). Ela também apresenta a capacidade de solubilizar alguns fosfatos presentes no solo, colocando certos elementos disponíveis para planta (JUNIOR *et al.*, 2021), benefício este se observou em aplicações na cultura de cana de açúcar, apresentando um aumento na produtividade, motivado pela solubilização de fosfato (CANÇADO *et al.*, 2021).

Outra característica do *B. subtilis* é interação com o solo e outros micro-organismos, como mostra os resultados apresentado por Lazzaretti e Melo (2005), indicando uma relação benéfica quando aplicado com a bactéria do gênero *Bradyrhizobium*, aumentando a competitividade os sítios de infecção, ajudando assim a rizobactéria. Da mesma forma mostraram Machado *et al.* (2020), aplicando *B. subtilis* junto ao *Azospirillum brasilense*, na cultura de milho e tendo bons resultados na produtividade.

A cepa *B. subtilis* ATCC-6051, é aplicada em estudos de testes de resistência bacteriana, triagem de sangue, acúmulo de íons metálicos de soluções aquosas, além de ter a capacidade de produzir isopreno, e também ser usado para produção de probiótico para melhoria da saúde de frangos (ATCCa, 2021; DONG *et al.*, 2021). Está mesma cepa foi utilizada para produção de biosurfactina, sendo utilizado como de cultivo resíduo de cervejaria otimizado, e apresentou excelente produção deste lipopeptídeo, além de apresentar inibição de micro-organismos como *Pseudomonas aeruginosa* DSM 3227, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* DSM 20231, *Staphylococcus epidermidis* DSM 28319 (NAZARETH, 2019).

O fungo da espécie *Trichoderma harzianum* encontrasse na categoria de fungos filamentosos, está espécie é facilmente encontrada no solo ou na planta, são multicelulares eucariontes típicos, e produzem esporos, conídios, hifas e clamidósporos, estruturas que possibilitam o uso de forma segura, assim como do *B. subtilis*, onde suportam condições adversas do ambiente (FRANCISCO, 2016).

O *T. harzianum* é amplamente utilizado e presente na composição de produtos biológicos, que são vendidos como bioagentes que podem ser aplicados em diversas culturas como soja, milho, cana de açúcar (MEYER *et al.*, 2019). Tal espécie é amplamente usada e comercializada devido a suas ações antagonistas de diversas pragas como *Fusarium* sp. e também o seu papel promissor no aumento da germinação de sementes (BEZERRA *et al.*, 2022). Além das características que esse micro-organismo apresenta em relação a sua eficiência, este se torna bastante utilizado devido sua facilidade de manejo pelo agricultor (PARRA, 2019).

A cepa *T. harzianum* Rifai 60850, apresenta além de aplicações para a agricultura, aplicações também na área de biorremediação, tendo a capacidade de lidar com metais pesados, poluentes de solo e na água (ATCCb, 2022). Em estudo aplicando essa mesma cepa de fungo, para o tratamento de doenças de podridão radicular do feijão-mungo, o *T. harzianum* apresentou bons resultados de inibição (KHAN *et al.*, 2019).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados nas dependências do laboratório de Biologia Molecular e do laboratório de Microbiologia e Microscopia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Campo Mourão, Paraná.

A vinhaça de soja foi disponibilizada pela CJ Selecta, e repassada pela Empresa Agrocells Biotecnologia localizada no município de Campo Mourão.

Foram utilizadas cepas de *Bacillus subtilis* ATCC 6051 e *Trichoderma harzianum* Rifai 60850 cedidas pela empresa Agrocells Biotecnologia, localizada no município de Campo Mourão, Paraná.

A CJ Selecta, empresa localizada no estado de Minas Gerais, no município de Araguari, é uma empresa que produz etanol a partir do resíduo da produção do farelo de soja (comumente usado em alimentação animal), o melaço de soja. Embora os subprodutos possuam características distintas, o processo de produção do etanol a partir do melaço de soja é semelhante ao feito utilizando o melaço da cana-de-açúcar. Entretanto, na literatura, são poucos os estudos que utilizam esse resíduo da soja para a produção de etanol. O álcool hidratado é o produto da união do processo de fermentação contendo um *pool* de leveduras e o subproduto do farelo de soja e, além do etanol, também é gerada a vinhaça de soja.

3.1 Micro-organismos e condições de cultivo

Bacillus subtilis ATCC 6051 armazenado em caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) com 20% de glicerol a -20 °C e, *Trichoderma harzianum* Rifai 60850 armazenado em ágar Batata Dextrose Ágar (BDA) inclinado foram utilizados neste estudo.

A cepa bacteriana foi reativada em 2 mL do caldo BHI, incubadas a 37 °C por 18 horas. Em seguida foi realizada estria descontínua em placa contendo Mueller Hinton Agar (MHA), para visualização de colônia característica, seguindo o protocolo da empresa Agrocells Biotecnologia. Os inóculos para uso nos ensaios foram feitos a partir das colônias características em ágar MHA.

A cepa fúngica foi cultivada em BDA, em placas de Petri a 25 °C, por 8 dias. Para o recolhimento dos esporos foi acondicionada água destilada às placas e o substrato foi submetido a filtração em gaze esterilizada, seguido de

homogeneização da suspensão e ajuste da concentração de esporos em câmara de Neubauer.

3.2 Avaliação da viabilidade de aplicação da vinhaça de soja como meio de cultura e suas concentrações

Para avaliar a possibilidade de a vinhaça ser utilizada como meio de cultura, e as concentrações com melhor desempenho para o de crescimento de *B. subtilis* sem a adição de nenhum componente, foram realizados testes de fermentação com tratamentos contendo 100%, 70% e 40% de vinhaça concentrada, conforme Cardozo e Araújo (2011) e Shi e Zhu (2007), além do controle em caldo BHI, utilizado para crescimento microbiano em geral (LB, 2018), utilizando erlenmeyers com volume total de 250 mL, tendo como volume útil 100 mL.

Foi utilizado uma proporção de 1:10 de inóculo e vinhaça, ou seja, 90 mL de meio de cultura para 10 mL de inóculo inicial. O inóculo inicial foi preparado a partir da inoculação de três colônias típicas encontradas em placa de petri pré-preparada com alça de inoculação em frasco contendo caldo BHI, e deixados por 18 horas em estufa bacteriológica a 35°C. O processo de multiplicação ocorreu em incubadora shaker com a rotação de 100 RPM e a temperatura controlada para 35 °C adaptado de Cardozo e Araújo (2011) e Shi e Zhu (2007) (Figura 2). As análises foram realizadas em triplicata.

Figura 2. Incubadora *shaker* em processo de multiplicação de *B. subtilis* com os erlenmeyers, tendo como tratamento 100%, 70%, 40% de vinhaça concentrada e BHI.



Fonte. Autoria própria (2022).

Os dados para análise de crescimento foram coletados em três amostras (T1, T2 e T3) para o micro-organismo *B. subtilis*, em um período de 24 horas, sendo: T1 – coleta da amostra após (30 minutos) inoculado o micro-organismo, T2 – coleta de amostra 12 horas após o início da multiplicação e T3 – 24 horas após o início adaptado de Cardozo e Araújo (2011) e Shi e Zhu (2007). Assim os resultados foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) com 5% de significância e usando o teste de Tukey para as comparações entre os tratamentos utilizando o software BioEstat 5.0.

3.3 Crescimento de *B. subtilis* e *T. harzianum* em biorreator de bancada

Para a otimização em biorreator, foi utilizado a melhor concentração de vinhaça em testes na incubadora *shaker* com a multiplicação do *B. subtilis*, passando a ser usada a vinhaça *in natura*. Onde a fermentação do *T. harzianum*, foi realizada em triplicata em biorreator de bancada STR de 1,5 litros de capacidade, sendo feita duas coletas, sendo T1 o primeiro dia de processo e T5 o quinto e último dia de multiplicação adaptado (DE REZENDE, 2017).

Para os ensaios em biorreator de bancada foi utilizada a vinhaça *in natura*, também fornecida pela CJ Selecta. Como esta vinhaça é um resíduo oriundo de um produto novo produzido pela empresa, eles ainda não possuem um padrão de qualidade estabelecido para ela. Dessa forma, a empresa enviou a primeira remessa de vinhaça de forma concentrada, entretanto o processo de concentração da vinhaça é dispendioso e a empresa preferiu adotar o uso desse produto *in natura*. Portanto os ensaios realizados em biorreator de bancada foram todos utilizando a vinhaça *in natura*. Como também a quantidade de vinhaça gerada é um passivo ambiental, sendo um entrave no aumento da produtividade da empresa, adotou-se o tratamento de 100% para crescimento em biorreator, pois dessa forma a vinhaça gerada poderia ser usada totalmente.

A vinhaça *in natura* era autoclavada, a 121 °C e 1 BAR, por 30 minutos junto ao biorreator de bancada, após a correção do pH, sendo 7,5 para o *B. subtilis* e 3,5 para o *T. harzianum*.

Para o teste em biorreator foi utilizados o modelo híbrido composto por aeração e coluna de bolhas. Os biorreatores possuem um volume total de 7,5 litros, sendo 6 litros o volume útil (Figura 3) e, 1,5 litros de volume total, sendo o volume útil utilizado de 0,9 litros (Figura 4), processo adaptado de Silva *et al.* (2016), que fez

o uso de biorreator *airlift*. Tais biorreatores foram utilizados respectivamente para *B. subtilis* e *T. harzianum*. Os reatores são compostos pelos seguintes medidores de parâmetro: sonda de pH, sensor de nível, sensor de temperatura acoplado a banho termostaticado, além de bombas peristálticas e compressor.

Figura 3. Biorreator de bancada de 7,5 litros, utilizado para multiplicação de *B. subtilis*, utilizando vinhaça de soja *in natura* 100%.



Fonte. Autoria própria (2022).

Figura 4. Biorreator de bancada de 1,5 litros, utilizado para multiplicação do micro-organismo *T. harzianum*, com vinhaça de soja *in natura* 100%.



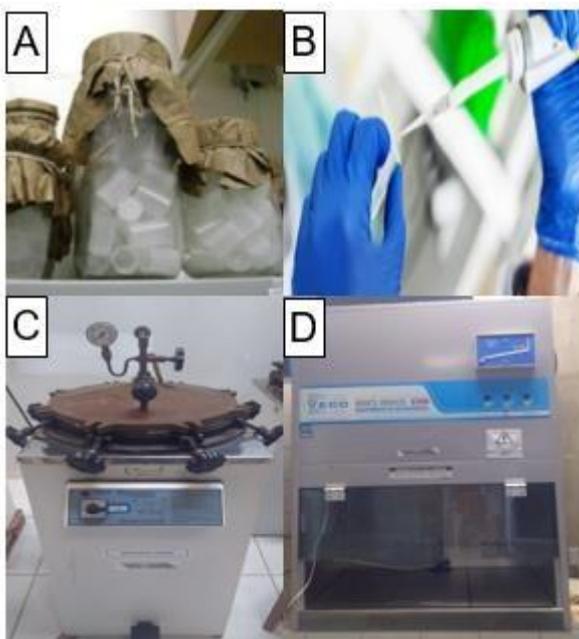
Fonte. Autoria própria (2022).

3.4 Avaliação do crescimento dos micro-organismos

Para avaliação de crescimento celular dos micro-organismos foi utilizada a técnica de diluição seriada descrita por Tortora (p. 166-169, 2017) com modificações na escala, sendo utilizada na diluição 0,1 mL de amostra para 0,9 mL de solução salina 0,85%. A técnica iniciasse com a preparação dos microtubos de 2 mL de volume total, onde foram acondicionados em frasco de conserva e tampados com papel kraft, após isso foi preparado a solução salina 0,85% (0,85 de Cloreto de Sódio para 100 mL de água destilada), posteriormente ambos foram autoclavados a 121 °C e 1 bar, por 15 minutos, junto com ponteiras de 1 mL. Com os materiais

autoclavados, a aliquotagem de 0,9 mL de solução salina para os eppendorfs foi feita utilizando micropipetador dentro da câmara de fluxo laminar (Figura 5).

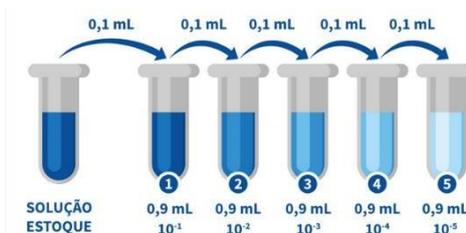
Figura 5. A) Acondicionamentos dos eppendorfs; B) Aliquotagem da solução salina; C) Autoclave e D) Câmara de fluxo laminar.



Fonte: Autoria própria (2022).

Com os microtubos prontos, segue para técnica de diluição, que consiste em passar 0,1 mL da amostra pura para 0,9 mL de solução salina, formando este primeiro microtubo a solução 10^{-1} , dessa forma seguem se as diluições, sendo passado 0,1 mL da diluição 10^{-1} para um segundo microtubo obtendo a diluição 10^{-2} (Figura 6), e assim por diante até a diluição 10^{-5} , a cada diluição a amostra era agitada com auxílio de agitador vortex.

Figura 6. Técnica de diluição seriada.



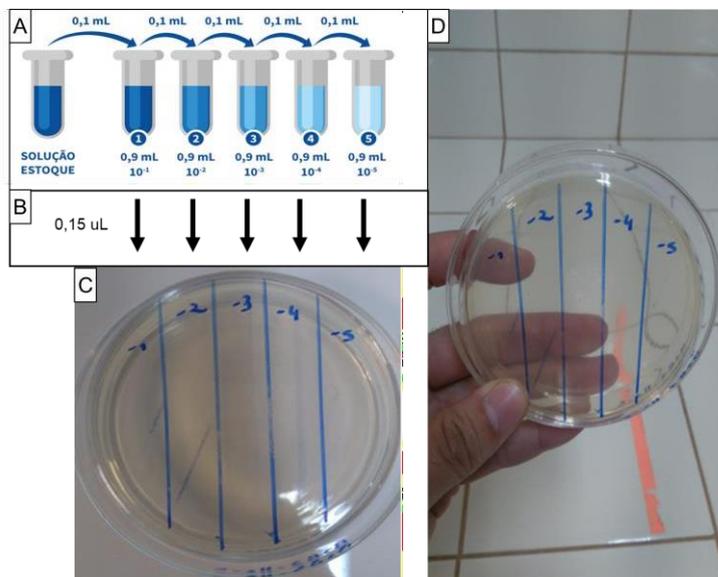
Fonte: KASVI (2018, s/ página).

Com as diluições preparadas é necessário fazer a inoculação, para este procedimento foi necessário o preparo das placas de petri acondicionadas com

papel kraft, e também o preparo do ágar de crescimento comum MHA, de forma que foi calculado 20 mL de ágar para cada placa, ambos foram autoclavados a 121 °C por 15 min, após a autoclavagem, as placas foram deixadas secando em estufa de secagem a 60 °C por 2 horas. Com as placas secas, o ágar foi vertido nas placas de petri dentro da câmara de fluxo laminar.

A inoculação do *T. harzianum* foi realizada a partir da alíquotagem de 100 uL de cada diluição em uma placa de petri contendo MHA, e com uma alça de Drigalski de vidro a amostra foi espalhada pela placa, sendo que cada placa continha uma diluição, onde tal procedimento foi realizado em triplicata de todas as diluições, para o *B. subtilis*, cada placa continha 5 diluições, sendo utilizado a técnica da gota escorrida, de forma que foi alíquotado 15 uL da amostra nas respectivas diluições, e em seguidas as placas eram colocadas na vertical para que a alíquota escorresse pelo ágar, este procedimento também foi realizado em triplicata das diluições realizadas (Figura 7).

Figura 7. A) Diluição realizada; B) inoculação da placa com 15 uL de amostra; C) separação da placa em cinco diluições e D) placa na vertical para a alíquota escorrer.



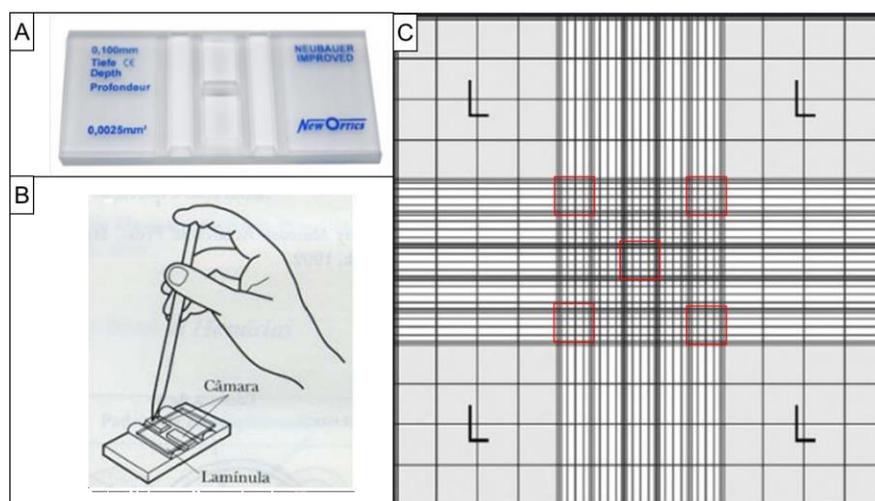
Fonte. Autoria própria (2022).

Após a semeadura as placas que continham *B. subtilis* foram colocadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 24 horas, para crescimento das colônias, e as placas de *T. harzianum* foram armazenadas em incubadora BOD a 25 °C por cinco dias. Dado o tempo proposto para o crescimento das colônias, as mesmas foram contadas, e feitas à média das diluições contadas, e os dados inseridos na equação

X, para obtenção da concentração em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL), onde concentração (UFC/mL) = média de colônia \times 1/(Diluição contada) \times 1/(Aliquota inoculada) (GUERRA, 2016).

Além da técnica de diluição seriada, também foi utilizado outro método para se obter a concentração de bactérias na amostra, sendo feito a partir da contagem de células com a Câmara de Neubauer (Figura 8) juntamente com microscópio óptico. O método inicia-se a partir da preparação da câmara, sendo alocada uma lamínula sobre a área quadriculada, e em seguida adicionou-se uma alíquota de 20 mL nas canaletas, para que seja preenchida a área dos quadros para que seja realizada a contagem.

Figura 8. A) Modelo de câmara de Neubauer; B) preparação da câmara para contagem e C) contagem das células na câmara.



Fonte. Autoria própria (2022).

Após a contagem do número de células nos quadros, foi feita a média, e passado para equação levando em consideração o volume da câmara, onde a concentração (UFC/mL) = média de colônia \times 5 \times 10.000 (GUERRA, 2016).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2 Composições da vinhaça de soja da empresa CJ Selecta

Após a aquisição da vinhaça de soja concentrada e posteriormente *in natura* pela empresa CJ Selecta, o resíduo foi enviado a uma empresa localizada no município de Campo Mourão, Paraná (Acqua Solos), para a avaliação de sua composição (Tabela 1).

Tabela 1. Comparação da composição da vinhaça de soja concentrada, vinhaça de soja *in natura* e vinhaça de cana-de-açúcar.

(continua)

Parâmetro	Vinhaça de soja concentrada (g/L)	Vinhaça de soja <i>in natura</i> (g/L)	Vinhaça de cana-de-açúcar(g/kg)
Proteína bruta (min)	-	-	-
Gordura (máx)	-	-	-
Cinza (máx)	31,6 (%)	0,07	-
Frutose	-	-	-
Sacarose	-	-	-
Rafinose	-	-	-
Estaquiose	-	-	-
Glucose	-	-	-
Cálcio	5,67	2,12	3,3
Fósforo	8,9	1,05	0,5
Sódio	-	-	-
Magnésio	4,48	0,20	3,3
Potássio	69,52	2,08	15,1

Tabela 1. Comparação da composição da vinhaça de soja concentrada, vinhaça de soja *in natura* e vinhaça de cana-de-açúcar.

(conclusão)

Parâmetro	Vinhaça de soja concentrada (g/L)	Vinhaça de soja <i>in natura</i> (g/L)	Vinhaça de cana-de-açúcar(g/kg)
Enxofre	5,13	0,33	5,8
Nitrogênio	32,76	0,53	9,2
Ferro	0,2988	0,0277	0,147
Manganês	0,00964	0,00145	0,019
Cobre	0,06483	0,0076	-
Zinco	0,20307	0,0076	0,007
Boro	0,04111	0,055	-
Açúcares totais (%)	3,87	1,47	-
Carbono orgânico (%)	39,77	58,10	-
Matéria orgânica (%)	68,4	99,93	-

Fonte: Cardozo (2009); Autoria própria (2022);.

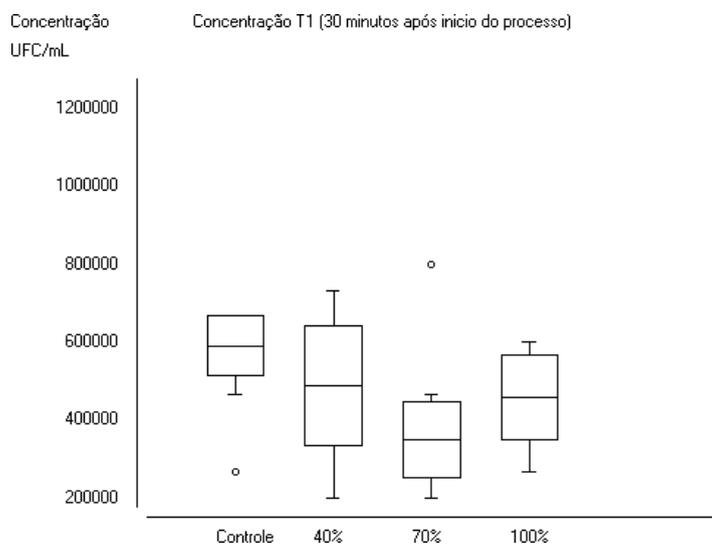
Foi observada pelo resultado da composição das vinhaças de soja, a presença das principais fontes de nutrientes que dão suporte ao crescimento dos micro-organismos em geral, como os nitrogênios, os carbonos e açúcares, além de sais inorgânicos, demonstrando assim a possibilidade do uso da vinhaça de soja como meio de cultura líquido.

Além disso, a composição química da vinhaça de soja é de certa forma similar a vinhaça de cana de açúcar, que já é utilizada em fermentações utilizando micro-organismos de interesse agrícola (VITTI, 2019).

4.1 *Bacillus subtilis*

Os resultados iniciais das multiplicações não demonstraram uma diferença significativa, pois obteve $p=0,16$, sendo, portanto maior que 0,05, dessa forma sabem-se que ao início os tratamentos equivalem ao controle (Figura 9).

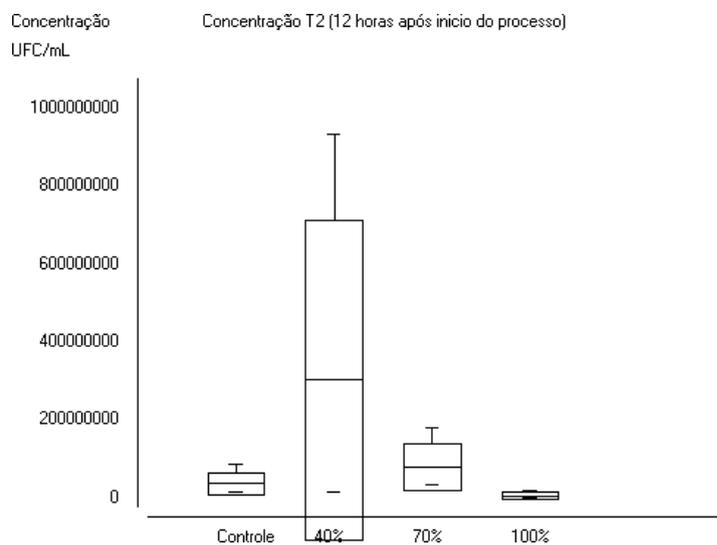
Figura 9. Concentração bacteriana UFC/mL dos tratamentos 100%, 70%, 40%, de vinhaça concentrada e controle em T1 (30 minutos após a inoculação do *B. subtilis*).



Fonte: Autoria própria (2022).

Seguindo o teste para a segunda hora da coleta, sendo 12 horas após o início do teste, é possível observar um aumento significativo do tratamento com 40%, pois esse é o único que em comparação ao controle obteve um $p < 0,05$ (Figura10).

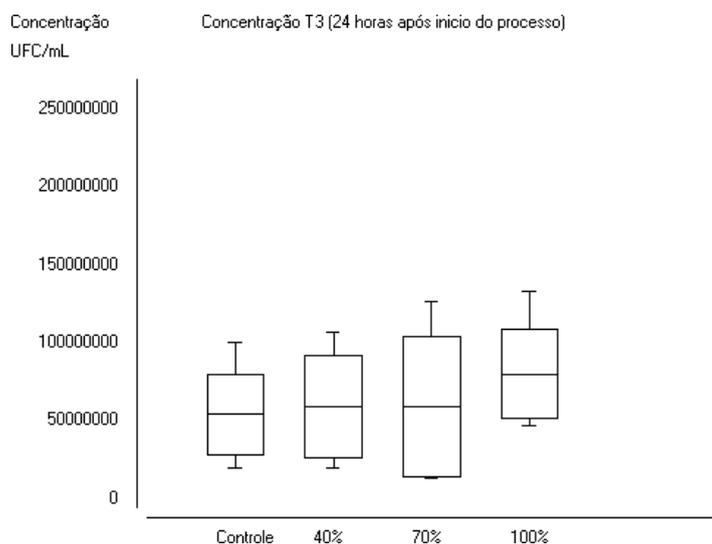
Figura 10. Concentração bacteriana UFC/mL dos tratamentos 100%, 70%, 40%, de vinhaça concentrada e controle em T2 (12 horas após a inoculação do *B. subtilis*).



Fonte: Autoria própria (2022).

Já em T3, que constitui o final do processo de multiplicação, e completam 24 horas de processo, os tratamentos se equivalem novamente ao controle, obtendo-se um $p = 0,39$, sendo que o tratamento 100% chega a uma média maior (Figura 11).

Figura 11. Concentração bacteriana UFC/mL dos tratamentos 100%, 70%, 40%, de vinhaça concentrada e controle em T1 (24 horas após a inoculação do *B. subtilis*).



Fonte: Autoria própria (2022).

Resultados semelhantes foram encontrados por Cardozo (2011) que utilizou a vinhaça de cana de açúcar para o crescimento de *B. subtilis* em incubadora *shaker*, com tempo de processo de 168 horas, sem controle da temperatura (temperatura ambiente), de forma que a melhor concentração de vinhaça foi de 25%. Shi e Zhu (2007), utilizando também a vinhaça de cana de açúcar, obtiveram bons resultados de geração de esporos, variando também o tempo de processo que neste caso foi de 60 horas e a temperatura que foi mantida em 30°C, tendo como concentração de vinhaça de 40%. Ambos os autores chegaram à conclusão de que seria viável a utilização da vinhaça de cana de açúcar, assim os resultados apresentados validam também a utilização da vinhaça de soja como opção de meio de cultura.

Sabendo que a vinhaça de soja concentrada pode ser usada como meio de cultura, e que não há diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 2), o estudo segue para testes em biorreator de bancada, tendo como estudo a vinhaça *in natura* a 100%, essa vinhaça será utilizada, pois a empresa CJ Selecta optou por não mais concentrar seu resíduo devido aos custos envolvidos no processo.

Tabela 2. Valores de p para os tratamentos 100%, 70%, 40%, de vinhaça concentrada e o controle, entre os períodos T1, T2 e T3 (30 minutos, 12 horas e 24 horas, respectivamente após a inoculação do *B. subtilis*).

Tempo	Valor de p
T1	0,1619
T2	< 0,05*
T3	0,3940

*Diferença significativa entre Controle e Tratamento 40%.

Fonte: Modificado de BioEstat 5.0 (2022).

Os resultados obtidos a partir da multiplicação em biorreator não foram satisfatórios, apresentando decaimento na concentração do micro-organismo (Tabela 3).

Tabela 3: Resultado da multiplicação do *B. subtilis* em biorreator de bancada com a utilização da vinhaça in natura 100%.

TEMPO	1ª Replicata CONCENTRAÇÃO DE MICRO-ORGANISMO (UFC/mL)	2ª Replicata CONCENTRAÇÃO DE MICRO-ORGANISMO (UFC/mL)	3ª Replicata CONCENTRAÇÃO DE MICRO-ORGANISMO (UFC/mL)
T1	0	$2,10 \times 10^6$	$1,00 \times 10^4$
T2	0	$1,30 \times 10^5$	$5,00 \times 10^3$
T3	0	$1,03 \times 10^4$	$1,02 \times 10^3$

Fonte: Autoria própria (2022).

Em relação à primeira replicata, os valores de crescimento 0, se refere a problemas com a sonda de pH do biorreator, que mesmo ao ser calibrada utilizando as soluções tampão pH 4 e pH 7, fez a medição errada ao iniciar o teste de fermentação, o que culminou em um aumento excessivo do pH, marcando um pH 12 (ao ser medido com pHmetro de bancada), o que pode ter causado a mortandade do micro-organismo.

Este resultado corrobora com o apresentado por Oliveira (2006) que mostra que a curva de crescimento da biomassa acompanha um pH de no máximo 10, após isso o pH se estabiliza em 10, e a biomassa começa a decrescer. Agregado a este fato em diversos assuntos sobre multiplicação de *B. subtilis*, traz como pH ótimo para crescimento faixas entre 4,5 a 7,5, dependendo das condições de oxigenação e composição do meio de cultura (DUQUE, 1991; CARVALHO, 2005; OLIVEIRA, 2006; VOSS, 2013).

Em relação aos resultados de crescimento da segunda e terceira replicata, a fermentação utilizando vinhaça *in natura* 100%, pode não ter oferecido nutrientes suficientes para proporcionar o crescimento microbiano, fazendo com que o *B. subtilis* ao invés de crescer, diminuísse sua concentração.

A proposição da multiplicação em biorreator foi por conta da inserção de ar a partir de um compressor, o que resultaria em uma maior disponibilidade de oxigênio para bactéria, o que promoveria maiores taxas de crescimento (LUNA *et al.*, 2002; CARVALHO, 2005; OLIVEIRA, 2006), visto que em teste na *shaker* este era fornecido apenas devido a relação rotação x *headspace*. Além do controle dos parâmetros de aquecimento e pH. Porém ao observar os resultados de decaimento da concentração, levantou-se a possibilidade da vinhaça de soja *in natura* não ser viável para aplicação em sistemas aerados quando aplicado sem adição de nenhuma outra fonte de nutriente como é feito quando utilizado a vinhaça de cana de açúcar.

A vinhaça *in natura* se apresenta rica em fontes orgânicas de carbono e contém um nível de relação carbono x nitrogênio de 1092/1, o que pode indicar que a falta de nitrogênio no meio esteja influenciando o ciclo de Krebs, visto que a quantidade de nitrogênio no meio está relacionada ao crescimento microbiano (JOHK *et al.*, 2014). Além da possibilidade de submeter o micro-organismo a sistemas anaeróbios, devido às altas concentrações de carboidratos e açúcares, forçando a bactéria entrar no processo de fermentação (CARVALHO, 2005).

Outro fator que pode explicar o decaimento da concentração quando aplicado a sistemas aerados é o tempo de processo proposto, visto que em estudos de meio alternativos os processos ocorrem em mais de 24 horas, isso provavelmente ocorre pela falta de conhecimento dos reais compostos do meio, principalmente em relação a fontes de carbono e nitrogênio (SHI e ZHU, 2007; CARDOZO e ARAÚJO, 2011; DA SILVA, 2020).

4.2 *Trichoderma harzianum*

Similar ao *B. subtilis*, foi usado à vinhaça *in natura* 100% para multiplicação do *T. harzianum* em biorreator. A multiplicação utilizando este resíduo apresentou bons resultados de crescimento, estando uma média de três logs em um tempo de cinco dias (Tabela 4).

Tabela 4: Resultado da multiplicação do *T. harzianum* em biorreator de bancada utilizando vinhaça *in natura* 100%, em T1 e T2 (30 minutos após a inoculação e cinco dias após a inoculação).

DIA	1ª Replicata CONCENTRAÇÃO DE MICRO- ORGANISMO (UFC/mL)	2ª Replicata CONCENTRAÇÃO DE MICRO- ORGANISMO (UFC/mL)	3ª Replicata CONCENTRAÇÃO DE MICRO- ORGANISMO (UFC/mL)
T1	$2,10 \times 10^3$	$2,33 \times 10^3$	$1,32 \times 10^3$
T2	$1,13 \times 10^6$	$4,33 \times 10^6$	$4,52 \times 10^6$

Fonte: A autoria própria (2022).

As concentrações finais, após cinco dias de processo indicam que a vinhaça de soja *in natura* é uma fonte de nutriente de baixo custo que pode ser aplicada a processos de multiplicação em escala, isso porque o meio traz os componentes necessários para dar suporte do nutricional ao micro-organismo (MEYER *et al.*, 2019).

Juntamente com a composição do resíduo a fermentação em biorreator aerado, possibilitou melhor interação entre meio e fungo, além de proporcionar a disponibilidade de oxigênio, essa composição de resultados foi proposto por Papavizas *et al.* (1984), que utilizou melaço e levedo de cerveja, alinhado com biorreator aerado, e alcançou ótima produção de *T. harzianum*, em um processo fermentativo que variou de 10 a 15 dias.

Diferentemente do resultado encontrado para o *B. subtilis*, é visto em produção de fungo uma composição de meio de cultura com maiores concentrações de fontes de carbono, como mostrado no estudo de Balestri (2015), que utilizou resíduo de manipueira com concentrações de carbono e açúcares maiores que concentrações de nitrogênio. Outro resultado que corrobora com os encontrados no presente estudo é o de Kobori *et al.* (2015), que variou as concentrações da relação C/N, e demonstrou que relações em que concentração de carbono é maior foi possível a produção de microescleródios e conídios submersos.

Essa produção de estruturas devida seu tamanho, pode ter induzido a alguns erros da análise de crescimento, visto que a utilização da técnica de diluição seriada na escala de 0,1 mL de amostra para 0,9 mL de solução salina 0,85% não é a mais recomendada para este tipo de micro-organismo, pois a técnica é realizada utilizando ponteiras de 100 uL que são extremamente finas e podem acabar deixando de puxar estruturas que se aglomeram, e isso foi visto durante o

acompanhamento do crescimento da cultura em placas, que mesmo a amostra estando em concentração $4,51 \times 10^6$ UFC/mL por exemplo, a placa não apresentou crescimento.

5 CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível observar que a vinhaça de soja, similar a vinhaça de cana de açúcar apresentou bons resultados quando aplicado em micro-organismos como *B. subtilis* e *T. harzianum*, dependendo das condições físicas de processo. A bactéria *B. subtilis*, em sistema sem aeração houve crescimento de dois logs, e com aeração houve decaimento, indicando não ser aplicável a este tipo de sistema. O fungo em o crescimento em sistemas aerados obteve bons resultados.

Isso demonstra a versatilidade de alguns micro-organismos, sendo o estudo de extrema importância, pois dá suporte para uma transição de manejo tradicional que utiliza agrotóxicos para o manejo sustentável, indicando assim uma nova alternativa de meio de cultura. Além de propor uma solução de uso para este resíduo, fazendo assim desnecessário custos envolvendo o descarte no meio ambiente.

Dessa forma, para estudos futuros, temos alguns caminhos, como: verificar a aplicabilidade em gama maior de micro-organismos de interesse agrícola, variando as condições físicas, verificar a eficiência desses micro-organismos após sua multiplicação em vinhaça de soja, além de estudar as características finais desse fluido buscando sua real valoração.

REFERÊNCIAS

- ATCC (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION). *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) **Cohn 6051**: 2021. Disponível em: <https://www.atcc.org/products/6051>. Acesso em: 10 Dez. 2021.
- ATCC (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION). *Trichoderma harzianum* **Rifai 60850**: 2022. Disponível em: <https://www.atcc.org/products/60850>. Acesso em: 10 Abr. 2022.
- ARAUJO, F. F. D. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciência agrotec**, Lavras, v. 32, n. 2, p. 456-462, Abr. 2008. DOI: 10.1590/S1413-70542008000200017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542008000200017>. Acesso em: 10 Out. 2021.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Controle biológico de doenças e plantas no Brasil**. Jaguariúna: Embrapa meio ambiente, 2009. *E-book*. 341 p. Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/17182/1/livro_biocontrole.pdf. Acesso em: 10 Out. 2021.
- BALESTRI, E. L. **Diferentes concentrações de manipueira para desenvolvimento de *Trichoderma* spp. Em meio submerso a partir de um biorreator airlift alternativo**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2015. Disponível em: https://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/6928/3/CM_COEAM_2015_2_08.pdf. Acesso em: 20 Abr. 2022.
- BEZERRA, M. C. L.; GOMES, R. S. S.; CARVALHO, T. K. N.; RODRIGUES, R. M.; SILVA, T. B. M.; MEDEIROS, J. G. F. Redução de fungos e qualidade fisiológica de sementes de milho inoculadas com *Trichoderma harzianum*. **Nativa**, v. 10, n. 1, p. 69-73, Mar. 2022. DOI 10.31413/nativa.v10i1.13011. Disponível em: <https://doi.org/10.31413/nativa.v10i1.13011>. Acesso em: 28 Mar. 2022.
- CANÇADO, G. M. A.; VASCONCELOS, J. C. S.; OLIVEIRA-PAIVA, C. A.; CRISTOFOLETTI, D. SEVERINO, F. J.; PINTO JUNIOR, A. S.; MEDEIROS, G. BARBOSA, L. A. F.; SPERANZA, E. A.; ANTUNES, J. F. G. Utilização de inoculante líquido solubilizador de fosfato formulado a base dos isolados de *Bacillus megaterium* (b119) e *Bacillus subtilis* (b2084) no plantio da cana-de-açúcar. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** 49. Nov. 2021. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1137862>. Acesso em: 10 Abr. 2022.
- CARDOZO, R. B.; ARAÚJO, F. F. Multiplicação de *Bacillus subtilis* em vinhaça e viabilidade no controle da meloidoginose, em cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 15, n. 12, p. 1283-1288, Dez. 2011. DOI 10.1590/S1415-43662011001200010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1415-43662011001200010>. Acesso em: 11 Out. 2021.

- CARVALHO, A. L. U. D. **Fisiologia de *Bacillus subtilis* R14 sob condições restrita e irrestrita de oxigênio**: produção de compostos bioativos e esporulação. 2005. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/1534>. Acesso em: 01 Nov. 2021.
- CAPALBO, D. M. F.; MORAES, I.O.; SOBRINHO, M. R.; CONTI, H. H. Obtenção de bioinseticida a base de *Bacillus thuringiensis* em novos meios de cultura. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 1, n. 1, p. 13-19, Nov. 1991. DOI 10.5380/pes.v1i0.39534. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5380/pes.v1i0.39534>. Acesso em: 10 Out. 2021.
- CHAGAS, L. F. B.; CHAGAS JUNIOR, A. F.; SOARES, L. P.; FIDELIS, R. R. *Trichoderma* na promoção do crescimento vegetal. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia, v. 4, n. 3, p. 97-102, Set. 2017. DOI 10.32404/rean.v4i3.1529. Disponível em: <https://doi.org/10.32404/rean.v4i3.1529>. Acesso em: 20 Mar. 2022.
- CJ SELECTA. CJ Selecta, 2021. **Unidades de negócios**: Etanol. Disponível em: <https://www.cjselecta.com.br/etanol.html>. Acesso em: 20 Nov. 2021.
- CJ SELECTA. CJ Selecta, 2021. **Melaço de soja**: Informações técnicas. Disponível em: <https://www.cjselecta.com.br/melaco.html>. Acesso em 10 Dez. 2021.
- CURY, A. **O VENDEDOR DE SONHOS**. São Paulo: Planeta, 2008.
- DA SILVA, E. **Tópicos multidisciplinares em ciências biológicas 2**. 1. ed. Belo Horizonte: Atena, 2020. Disponível em: <https://educapes.capes.gov.br/handle/capes/573187>. Acesso: 13 Mai. 2022.
- DE REZENDE, L. C. **Fermentação líquida como estratégia para produção massal de conídios de *Trichoderma***. 2017. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Programa de Pós Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/13300>. Acesso em: 15 Mar. 2022.
- DONG, X.; WANG, W.; JIANG, T.; ZHANG, Y.; HAN, H.; ZHANG, Y.; YANG, C. Construction and potential application of bacterial superoxide dismutase expressed in *Bacillus subtilis* against mycotoxins. **Shashi Kant Bhatia**, v. 16, n. 11, Jul. 2021. DOI: 10.1371/journal.pone.0260047. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260047>. Acesso em: 15 Mar. 2022.
- DUQUE, C. R. B. G. **Efeito da temperatura, de ativação, ph e tempo de incubação na germinação de esporos de bactérias isoladas de processos de fermentação alcoólica**. 1991. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1991. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11138/tde-20181127-155151/pt-br.php>. Acesso em: 13 Abr. 2022.
- FONTES, E. M. G., VALADARES-INGLIS, M. C. Controle biológico de pragas na agricultura. IN: FONTES, E. M. G., VALADARES-INGLIS, M. C. **Estratégias de uso e histórico**: controle biológico no Brasil. 1 ed. Brasília: Embrapa recursos genéticos

e biotecnologia, p. 36-40. Disponível em:

[https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=1121825&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22VALADARES-INGLIS,%20M.%20C.%20\(Ed.\).%22&qFacets=autoria:%22VALADARES-INGLIS,%20M.%20C.%20\(Ed.\).%22&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1](https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=1121825&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22VALADARES-INGLIS,%20M.%20C.%20(Ed.).%22&qFacets=autoria:%22VALADARES-INGLIS,%20M.%20C.%20(Ed.).%22&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1). Acesso em: 22 Nov. 2021.

GUERRA, A. F. **Métodos de contagem microbiana**. Valença, 1. ed. , 2016. p. 28. Disponível em: <https://microbiologia-de-alimentos.webnode.com/files/200000184-5c3f35d384/M%C3%A9todos%20de%20contagem%20microbiana.%20Valen%C3%A7a,%201%C2%AA%20Edi%C3%A7%C3%A3o,%202016,%2028p.pdf>. Acesso em: 13 Nov. 2021.

JÖNK, M. W.; TODESCATO, D.; MAASS, D.; OLIVEIRA, D.; ULSON DE SOUZA, A. A.; GUELLI U. SOUZA, S. M. A. Estudo de meio de cultura para *Bacillus Subtilis* CCT516 utilizando técnica de planejamento experimental. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Out. 2014, Florianópolis. Disponível em: <http://pdf.blucher.com.br.s3-sa-east-1.amazonaws.com/chemicalengineeringproceedings/cobeq2014/1501-18977-143693.pdf>. Acesso em: 20 Mar. 2022.

KASVI. **Preparo de soluções em laboratório: concentração, fator de diluição e diluição seriada**. 2018. Disponível em: <https://kasvi.com.br/preparo-de-solucoes-laboratorio-concentracao-fator-diluicao-seriada/>. Acesso em: 24 Nov. 2021.

KHAN, M. R.; HAQUE, Z.; RASOOL, F.; SALATI, K.; MOHIDDIN, F. A.; ZUHABI, M. Management of root-rot disease complex of mungbean caused by *Macrophomina phaseolina* and *Rhizoctonia solani* through soil application of *Trichoderma* spp. **Crop Protection**, v. 119, p. 24-29, Mai. 2019. DOI 10.1016/j.cropro.2019.01.014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.01.014>. Acesso em: 07 Mai. 2022.

KOBORI, N. N.; MASCARIN, G. M.; JACKSON, M. A.; SCHISLER, D. A. Liquid culture production of microsclerotia and submerged conidia by *Trichoderma harzianum* active against damping-off disease caused by *Rhizoctonia solan*. **Fungal Biology**, v. 119, p. 179-190, Abr. 2015. DOI 10.1016/j.funbio.2014.12.005. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1011851>. Acesso em: 22 Abr. 2022.

LB (LABORCLIN). **BHI - BRAIN HEART INFUSION**. 2018. Disponível em: <https://www.laborclin.com.br/wp-content/uploads/2019/06/900808-BHI-AGAR-9mL-FRASCO-CX-10TB-.pdf>. Acesso em: 03 Abr. 2022.

LAZZARETTI, E.; MELO, I. S. D. Influência de *Bacillus subtilis* na promoção de crescimento de plantas e nodulação de raízes de feijoeiro. **Boletim de Pesquisa e**

Desenvolvimento 28. Jan. 2005. Disponível em:

<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/14507> . Acesso em: 04 Nov. 2021.

LOPES, M. J. S.; SANTIAGO, B. S.; SILVA, I. N. B.; GURGEL, E. S. Microbial biotechnology: inoculation, mechanisms of action and benefits to plants. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, Set. 2021. DOI 10.33448/rsd-v10i12.20585. Disponível em: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i12.20585>. Acesso em 03 Abr. 2022.

LUNA, C. L.; MARIANO, R. L. R.; SOUTO-MAIOR, A. M. Production of a biocontrol agent for crucifers black rot disease. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, n. 2, p. 113-140, Jun. 2002. DOI 10.1590/S0104-66322002000200007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0104-66322002000200007>. Acesso em: 22 Mar. 2022.

MACHADO, R. W. B.; CALVI, V. O.; PACCOLA, E. A. Z.; FILHO, E. S.; GASPAROTTO, F. Inoculação foliar de plantas de milho com *Bacillus subtilis* e *Azospirillum brasilense*. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhece, Jandaia**, v. 17, n. 34, p. 289-298. DOI 10.18677/EnciBio_2020D22. Disponível em: https://10.18677/EnciBio_2020D22. Acesso em: 12 Mar. 2022.

MELLO, B. S. D. **Viabilidade do uso de melaço de soja como substrato para a digestão anaeróbia/aeróbia em reator compartimentado**. 2020. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara, 2020. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/191844>. Acesso em: 15 Out. 2021.

MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. **Trichoderma**: uso na agricultura. 1. ed. Brasília: Embrapa Soja, 2019. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1117296/trichoderma-uso-na-agricultura>. Acesso em: 22 Mai. 2022.

MONNERAT, R.; MONTALVÃO, S. C. L.; MARTINS, E. S.; QUEIROZ, P. R.; SILVA, E. Y. Y.; GARCIA, A. R. M.; CASTRO, M. T. de; ROCHA, G. T.; FERREIRA, A. D. C. L.; GOMES, A. C. M. M. Manual de produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero *Bacillus* para uso na agricultura. **Documentos 369**. Mai. 2020. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1122563/manual-de-producao-e-controle-de-qualidade-de-produtos-biologicos-a-base-de-bacterias-do-genero-bacillus-para-uso-na-agricultura>. Acesso em: 23 Nov. 2021.

MUNIZ, P. H. P. C.; PEIXOTO, G. H. S.; TEIXEIRA, M. P. M.; MELLO, S. C. M.; CARVALHO, D. D. C. Produção de conídios em substrato sólido e colonização superficial por *Trichoderma harzianum*. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia, v. 5, n. 4, p.40-44, Dez. 2018. DOI 10.32404/rean.v5i4.2608. Disponível em: <https://doi.org/10.32404/rean.v5i4.2608>. Acesso em: 24 Abr. 2022.

NAZARETH, T. C. **Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* ATCC 6051 using brewery waste as a carbon source**. 2019. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade

Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/214877>. Acesso em: 10 Mar. 2022.

OLIVEIRA, F. H. P. C. D. **Fisiologia de *Bacillus subtilis* R14: crescimento e produção de lipopeptídeos em cultivos descontínuos**. 2006. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós Graduação em Biotecnologia de Produtos Bioativos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/1720>. Acesso em: 01 Nov. 2021.

PAPAVIZAS, G. C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, Ecology, and Potential for Biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, v. 23, p. 23-54, Set. 1985. DOI 10.1146/annurev.py.23.090185.000323. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.py.23.090185.000323>. Acesso em: 20 Mar. 2022.

PARRA, J. R. P. Controle Biológico na Agricultura Brasileira. **Entomological Communications**, v. 1, Dez. 2019. DOI 10.37486/2675-1305.ec01002. Disponível em: <https://doi.org/10.37486/2675-1305.ec01002>. Acesso em: 04 Mai. 2022.

PECIN, S. B. **Melaço de soja como substrato para a produção microbiana de (1→6)-β-D-GLUCANA**: Avaliação do melaço bruto e do hidrolisado químico. 2018. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2018. Disponível em: <http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/3986>. Acesso em: 11 Out. 2021.

PICÃO, B. W. **Estudo da velocidade de agitação na produção de Riboflavina por *Bacillus subtilis* em biorreator mecanicamente agitado e aerado**. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2021. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/213514>. Acesso em 22 Abr. 2022.

REZENDE, C. C.; SILVA, M. A.; FRASCA, L. L. M.; FARIA, D. R.; FILIPPI, M. C. C.; LANNA, A. C.; NASCENTE, A. S. Microrganismos multifuncionais: utilização na agricultura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, Fev. 2021. DOI 10.33448/rsd-v10i2.12725. Disponível em: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i2.12725>. Disponível em: 23 Abr. 2022.

ROSSETTO, F.; SANTIAGO, A. D. Adubação – resíduos alternativos. **Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Brasília**, s/ ano. Disponível em: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_39_711200516717.html. Acesso em: 13 Out. 2021.

ROVINA, F., EHRHARDT, D. D., TAMBOURGI, E. B. Utilização de resíduo de casca de laranja para produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*. **Sientia Plena**, Campinas, v. 14, n. 4, Abr. 2018. DOI 10.14808/sci.plena.2018.044201. Disponível em: <https://doi.org/10.14808/sci.plena.2018.044201>. Acesso em: 22 Nov. 2021.

SHA, J.; YAN, F.-F.; HU, J.-Y.; MOHAMMED, A.; CHENG, H.-W. *Bacillus subtilis*-Based Probiotic Improves Skeletal Health and Immunity in Broiler Chickens Exposed

to Heat stress. **Animals**, n. 11, p. 1494, mai. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani11061494>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2615/11/6/1494/htm>. Acesso em: 10 Dez. 2021.

SHI, F.; ZHU, Y. Application of statistically-based experimental designs in médium optimization for spore production of *Bacillus subtilis* from distillery effluente. **BioControl**. n. 52, p. 845-853, Jan. 2007. DOI: 10.1007/s10526-006-9055-z. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10526-006-9055-z>. Acesso em: 08 Nov. 2021.

SILVA, C. C.; CRISTÓFOLI, J. B.; MIRANDA, C. R. Sistema biotecnológico alternativo para multiplicação contínua de microorganismos endofíticos e reposição biológica do solo agrícola. **Anais do VII CONCCEPAR: Congresso Científico Cultural do Estado do Paraná, Campo Mourão, 2016**. Disponível em: <https://concepar.grupointegrado.br/resumo/sistema-biotecnologico-alternativo-para-multiplicacao-continua-de-microorganismos-endofiticos-e-reposicao-biologica-do-solo-agricola/480/822>. Acesso em: 11 Abr. 2022.

TAVARES, D. C. G.; SHINODA, D. T.; MOREIRA, S. S. da C.; FERNANDES, A. C. Utilização de agrotóxicos no Brasil e sua correlação com intoxicações. **Sistemas &** Rio de Janeiro, v. 15, n. 1, p. 2–10, Abr. 2020. DOI 10.20985/1980-5160.2020.v15n1.1532. Disponível em: <https://doi.org/10.20985/1980-5160.2020.v15n1.1532>. Acesso em: 22 Nov. 2021.

TORINO JUNIOR, M. A.; CHAGAS JUNIOR, A. B.; BORGES CHAGAS, L. F.; MARTINS, A. L. L.; OLIVEIRA, R. S. *Bacillus subtilis* como inoculante promotor de crescimento em plantas de soja em campo. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 7, n.11, p. 107220-107237, Nov. 2021. DOI 10.34117/bjdv7n11-384. Disponível em: <https://doi.org/10.34117/bjdv7n11-384>. Acesso em: 14 Abr. 2022.

TORTORA, G. J. Microbiologia. IN: TORTORA, G. J. **Crescimento microbiano: medida direta do crescimento microbiano**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017, p. 166-169. Disponível em: <https://edisciplinas.usp.br/mod/resource/view.php?id=3118898&forceview=1>. Acesso em: 08 Nov. 2021.

VITTI, N. V. P. **Viabilização do uso da vinhaça concentrada com fertilizantes nitrogenados: aspectos agrônômicos e ambientais**. 2019. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019. DOI: <https://doi.org/10.11606/T.64.2020.tde-29012020-111418>. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/64/64135/tde-29012020-111418/en.php>. Acesso em: 22 Nov. 2021.

VOSS, G. B. **Produção de *Bacillus subtilis* em biorreatores airlift e sua aplicação no controle de nematoide de galhas do tomateiro**. 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/106979>. Acesso em 20 Abr. 2022.