



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA

TAYNÁ MENDES DO NASCIMENTO

**PRODUÇÃO DE BIOMASSA de *Bacillus stratosphericus* EM MEIO NUTRICIONAL
CONTENDO DIFERENTES FONTES DE CARBONO**

FORTALEZA

2021

TAYNÁ MENDES DO NASCIMENTO

**PRODUÇÃO DE BIOMASSA de *Bacillus stratosphericus* EM MEIO NUTRICIONAL
CONTENDO DIFERENTES FONTES DE CARBONO**

Monografia apresentada ao Curso de Química Industrial da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Química Industrial.

Orientador: Profa. Dra. Mary Anne Sousa Lima.

Supervisora de Estágio: Dra. Ana Iraidy Santa Brígida.

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

N199p Nascimento, Tayná Mendes do.
Produção de biomassa de *Bacillus stratosphericus* em meio nutricional contendo diferentes fontes de carbono / Tayná Mendes do Nascimento. – 2021.
47 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Química, Fortaleza, 2021.

Orientação: Profa. Dra. Mary Anne Sousa Lima.

Coorientação: Profa. Dra. Ana Iraidy Santa Brígida.

1. Sacarose. 2. Sacarose invertida. 3. Sideróforos. I. Título.

CDD 540

TAYNÁ MENDES DO NASCIMENTO

PRODUÇÃO DE BIOMASSA de *Bacillus stratosphericus* EM MEIO NUTRICIONAL
CONTENDO DIFERENTES FONTES DE CARBONO

Monografia apresentada ao Curso de Química Industrial da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Química Industrial.

Aprovada em: 16 / 04 / 2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Mary Anne Sousa Lima (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Ana Iraidy Santa Brígida
Embrapa Agroindústria Tropical

Prof. Dra. Vânia Maria Maciel Melo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, Eridan e Ricardo por não medirem esforços para que meus sonhos se tornassem realidade. Espero que o imenso amor que sinto por vocês consiga compensar toda a minha ausência.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo à Deus, pela minha existência, pelo privilégio de viver junto a pessoas tão maravilhosas, e por todas oportunidades a mim concedidas em seu nome. Aos meus guias espirituais, que me dão força, proteção, me livram de todo mal.

A minha mãe, Eridan Mendes por me envolver em um âmbito de afeto, amor e compreensão desde que nasci, por ser um exemplo de força, fé, dedicação e por nunca soltar a minha mão nos períodos de provação. Te amo com todo o meu ser.

Ao meu pai Ricardo Nascimento, pelas infinitas caronas em todos esses anos de faculdade, pelo apoio financeiro e por manter em mim acesa sempre a chama da fé que amanhã há de ser um dia melhor e apoiar todos os meus sonhos por mais absurdos que eles pareçam ser.

À minha família: Tatiane Mendes (irmã), Yasmin Mendes, Felipe Mendes (sobrinhos) e Franscélio Luz (cunhado), pelos momentos de felicidade proporcionados, e por acreditarem em mim. As minhas tias, tios, primas e primos, enfim, toda a família Mendes pela alegria de tê-los como exemplo de união e amizade.

Aos meus avós *in memoriam* Ozéias Ferreira, Hilda Mendes e Joana Nascimento que fizeram parte da minha história, lembrarei sempre com carinho dos momentos que juntos tivemos.

Meu melhor amigo Rodrigo Maciel, que me enche de orgulho todo dia, está do meu lado na alegria, na tristeza, na saúde e na doença. Quero ser igual a ti, quando eu crescer.

Meus amigos Andrezza Almeida, Alisson de Souza, Brena Stefanny e Thaís Freitas que estiveram presentes comigo desde o colégio e aquecem meu coração independente do tempo ou distância, que nunca afetou nossos laços.

Minhas amigas da UECE, Ana Luiza, Stephany Swellen, Dalila Davi, Danielle Matos e Roniele Oliveira que são meu exemplo de amor e assistencialismo ao próximo, seja pra rir, desabafar ou ter orientação acadêmica.

Dra. Katiany Abreu, que é muito importante na minha carreira acadêmica, pois esteve presente desde o momento em que pela primeira vez na vida realizei o repique de uma cultura bacteriana, fez meu olho brilhar por bioprocessos e cada vez mais querer me aventurar no mundo da microbiologia.

A Jackelyne de Lima, Lucas Martins e Edson Leão que estão mais distantes que todos os outros geograficamente, mas se fazem presente na minha vida de forma diária.

Obrigada pela escuta, abraços a distância e por compartilharem comigo alegrias e tristezas deste percurso.

As melhores pessoas que eu poderia ter encontrado na faculdade: Maria Luiza, Nívea Morais, Lorena Siqueira e Mayara Pereira. Obrigada pelas tardes na cantina da química, união pra trabalhos em grupo na biblioteca, companheiros de desespero antes de prova, consolos no Paraíba e por toda alienação nos três primeiros meses do ano.

Ao time Enactus UFC, por ter sido uma das minhas melhores lembranças da faculdade, por despertar em mim o amor pelo empreendedorismo social melhorando a vida das pessoas desenvolvendo projetos de impacto social com um time forte e sonhador, em especial ao projeto Crânio Verde, que me fez olhar o mundo fora da bolha da faculdade.

Aos meus amigos do time: Anderson Diógenes, Érica do Vale, Ernandes Gadelha, Fernanda Pantuzzi, Gisele Oliveira, Leonardo Magalhães, Marcelo Henrique, Natascha Alves e Sophia Marinho por me ensinarem o que é ter uma cultura organizacional que gera impacto, por me permitir ser eu mesma perto de vocês, por todas lembranças incríveis, feedbacks e por me incentivarem a ir além.

A Espedito Roza e Hugo Maciel, por serem minha maior motivação de criatividade, coragem e me inspirem a nunca ter medo de sair da minha zona de conforto e procurar o que me faz feliz. Eu quero vocês pra vida.

Meus amigos do curso de química: Natália Gomes, Felipe Agostinho e Henrique Sousa, pelos momentos de estudo e descontração dentro e fora da faculdade.

As professoras Dra. Adriana Correia, Dra. Alcinéia Conceição, Dra. Antônia Pimenta, Dr. Pierre Fechini e Dra. Ruth Vidal pelos valiosos ensinamentos que muito contribuíram na minha formação profissional e que serão sempre lembrados na minha caminhada pela área da ciência

Meus sinceros agradecimentos a Natália Moura, por todo suporte na realização experimental do TCC, pela orientação e grande contribuição ao trabalho como um todo. A equipe que compõe o Laboratório de Tecnologia de Biomassa (LTB), pelo companheirismo diário, em especial a Mairla Sousa, Bruna Marques e Natália Tavares

A minha orientadora de estágio Dra. Ana Iraidy, pelo companheirismo, empatia e grande contribuição técnica, despertando em mim o encanto de fazer ciência e compreender os minuciosos detalhes deste processo.

A minha orientadora pedagógica Dra. Mary Anne, por aceitar me orientar desde a iniciação científica, onde tive ensinamentos valiosos, obrigada por todo, amor, incentivo e paciência pra lidar com toda a demora pro fim deste processo.

A Dra. Vânia Melo, a quem tive o imenso prazer de acompanhar as aulas de microbiologia esse semestre e mesmo em um momento pandêmico e em aulas via EAD conseguiu engajar a turma e nos envolver nessa área de forma tão didática. Obrigada por todo ensinamento e por ter aceito o convite de participar da minha banca.

A todas as pessoas que contribuíram de alguma forma e acreditaram na realização deste trabalho

A Embrapa Agroindústria Tropical, pela disponibilização de instalações e equipamentos para realização deste estudo, bem como pela oportunidade de estágio.

Ao Curso de Química Bacharelado, na pessoa do coordenador Dr. Antoninho Valentin, por ser tão amável, bondoso e paciente comigo nos momentos mais difíceis.

A Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade de realização do curso e pelos privilégios e desafios que é estudar em uma instituição federal.

“fluctuat nec mergitur”

RESUMO

A crescente demanda do setor agrícola por técnicas que auxiliem no desenvolvimento vegetal, instiga no campo biotecnológico a pesquisa por processos de aperfeiçoamento, e de forma sustentável e economicamente viável, bactérias promotoras de crescimento em planta (BPCP), surgem como alternativa, por excretar substâncias como sideróforos, moléculas capazes de sequestrar o Fe e disponibilizá-lo na forma adequada para a nutrição vegetal. Para o desenvolvimento deste bioprocesso, atentou-se primeiramente ao meio nutricional, particularmente a fonte de carbono, essencial a produção de células e nutrição bacteriana. Bactérias do gênero *Bacillus* são tradicionalmente otimizadas com dextrose, mas para este trabalho, objetivou-se investigar a produção biomassa e de sideróforos por *Bacillus stratosphericus* variando a fonte de carbono com Sacarose e Sacarose invertida. Inicialmente, a curva de crescimento foi analisada com a inoculação de 1 μ L do microrganismo em 50 mL do meio líquido padrão NYD (nutrient-yeast-dextrose), incubado em estufa rotatória operando a 30 °C, 150 rpm por 24 horas. A fase exponencial foi observada entre 3 e 9 horas de fermentação, com concentração máxima de 2,97 g L⁻¹. Para os tempos de fermentação de 9 a 18 horas, observou-se uma fase de declínio lenta, chegando a 2,35 g L⁻¹ em 18 horas de fermentação. Após esse tempo, o declínio foi rápido chegando à 0,62 g L⁻¹ em 21 horas. O tempo de 18 horas foi selecionado para estudar as variações das fontes de carbono nas concentrações de 5 g L⁻¹, 10 g L⁻¹ e 15 g L⁻¹, substituindo a dextrose no tradicional meio NYD. Os resultados obtidos mostraram que para a sacarose, a concentração de 5 g L⁻¹ mostrou-se mais eficiente para produção de biomassa (3,7 g L⁻¹). Já para a sacarose invertida, a concentração de 15 g L⁻¹ levou a 4,28 g L⁻¹ de biomassa, ambas as fontes tiveram maior rendimento de biomassa que a composição tradicional com dextrose, que a 18h de cultivo, teve uma produção de 2,35 g L⁻¹ de biomassa. A produção de sideróforos pelo microrganismo não apresentou resultados satisfatórios.

Palavras-chave: Sacarose. Sacarose Invertida. Sideróforos.

ABSTRACT

The growing demand of the agricultural sector for techniques that assist in plant development, instigates research in the biotechnological field for research on improvement processes, and in a sustainable and economically viable way, plant growth promoting bacteria (BPCP), appear as an alternative, for excreting substances as siderophores, molecules capable of sequestering Fe and making it available in a form suitable for plant nutrition. For the development of this bioprocess, attention was first paid to the nutritional environment, particularly the carbon source, which is essential for the production of cells and bacterial nutrition. Bacteria of the genus *Bacillus* are traditionally optimized with dextrose, but for this work, the aim was to investigate the biomass and siderophores production by *Bacillus stratosphericus* by varying the carbon source with sucrose and inverted sucrose. Initially, the growth curve was analyzed by inoculating 1 μL of the microorganism in 50 mL of the standard liquid medium NYD (nutrient-yeast-dextrose), incubated in a rotary oven operating at 30 °C, 150 rpm for 24 hours. The exponential phase was observed between 3 and 9 hours of fermentation, with a maximum concentration of 2.97 g L⁻¹. For the fermentation times of 9 to 18 hours, a phase of slow decline was observed, reaching 2.35 g L⁻¹ in 18 hours of fermentation. After that time, the decline was rapid, reaching 0.62 g L⁻¹ in 21 hours. The time of 18 hours was selected to study the variations of carbon sources in the concentrations of 5 g L⁻¹, 10 g L⁻¹ and 15 g L⁻¹, replacing dextrose in the traditional NYD medium. The results obtained showed that for sucrose, the concentration of 5 g L⁻¹ was more efficient for biomass production (3.7 g L⁻¹). As for the inverted sucrose, the concentration of 15 g L⁻¹ led to 4.28 g L⁻¹ of biomass, both sources had higher biomass yield than the traditional composition with dextrose, which at 18h of cultivation, had a production of 2.35 g L⁻¹ of biomass. The production of siderophores by the microorganism did not present satisfactory results.

Keywords: Sucrose. Inverted sucrose. Siderophores.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Raízes de caupi (<i>Vigna unguiculata</i>) nodulada, inoculada com <i>Bradyrhizobium sp.</i> (esquerda) e coinoculada com <i>Bradyrhizobium sp.</i> + <i>Bacillus subtilis</i> (direita).....	22
Figura 2 – Curva de crescimento típica de uma população bacteriana.....	25
Figura 3 – Estrutura da sacarose.....	28
Figura 4 – Meio de cultura antes e depois da inoculação, respectivamente.....	31
Figura 5 – Pellets de biomassa pós lavagem e descarte de sobrenadante.....	33
Figura 6 – Diluições de biomassa para determinação de curva padrão.....	35
Figura 7 – Biomassa produzida em 5 e 10g L ⁻¹ , em sacarose invertida.....	42

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Perfil da curva de crescimento de *B. stratosphericus* CMIAT 61 em g L⁻¹ de biomassa em caldo NYD à 30°C em função do tempo 40
- Gráfico 2 – Efeito da fonte de carbono (sacarose e sacarose invertida) e concentração na produção de biomassa de *B. stratosphericus* CMIAT 61 à 30°C..... 41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Mecanismos de promoção de crescimento vegetal em bactérias do gênero <i>Bacillus</i>	24
Tabela 2 – Composição do meio de cultura NYDA.....	31
Tabela 3 – Composição do meio para estudo da fonte de carbono.....	36
Tabela 4 – Percentual de Fe ³⁺ complexado por sideróforos presentes nos sobrenadantes de <i>B. stratosphericus</i> CMIAT 61.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a	Coefficiente angular
Aa	Absorbância da amostra
Ab	Absorbância do controle
abs	Absorbância
AIA	Ácido indolacético
b	Coefficiente linear
BOD	Biochemical Oxygen Demand (Demanda Bioquímica de Oxigênio)
BPCPs	Bactérias Promotoras de Crescimento em Plantas
C	Concentração
CAS	Cromo Azurol S
CMIAT	Coleção de microrganismos de interesse da Agroindústria Tropical
d	Valor da diluição utilizada
DO	Densidade Óptica
f	Fator de conversão de absorbância para concentração
FC	Fonte de Carbono
g	gramas
h	horas
HCl	Ácido Clorídrico
HDTMA	Brometo de Hexadeciltrimetilamônio
L	Litro
mL	mililitros
mm	milímetros
NaOH	Hidróxido de Sódio
NYD	Caldo dextrose levedura nutriente
NYDA	Meio ágar dextrose levedura nutriente
rpm	Rotações por minuto
<i>sp.</i>	Espécie não identificada

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Temperatura em grau Celsius
©	Copyright
D	Dextrogiro
μ	Micro
®	Marca Registrada
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo geral	20
2.2	Objetivos específicos	20
3	ESTADO DA ARTE	21
3.1	Bactérias promotoras de crescimento em plantas	21
3.2	<i>Bacillus sp</i>	23
3.3	Crescimento microbiano e análise da biomassa	25
3.4	Meios de cultura	27
3.6	Fontes de carbono (FC)	28
3.7	Sideróforos	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1	<i>Microorganismo</i>	30
4.1.1	<i>Manutenção e ativação de cepas</i>	30
4.1.2	<i>Preparo do inóculo</i>	30
4.2	Meios de cultura	31
4.2.1	<i>Meio NYDA</i>	31
4.2.2	<i>Meio NYD</i>	31
4.3	Curva padrão de biomassa	32
4.3.1	<i>Obtenção da suspensão microbiana</i>	32
4.3.2	<i>Preparação da biomassa</i>	33
4.3.3	<i>Preparação das cápsulas de porcelana e determinação da biomassa</i>	33
4.3.4	<i>Preparo das diluições e leituras de absorbância</i>	34
4.3	Determinação da curva de crescimento	36
4.4	Produção de biomassa em diferentes fontes de carbono	36
4.4.1	<i>Inversão de sacarose</i>	37
4.5	Produção de sideróforos	37
4.5.1	<i>Preparo da solução CAS</i>	38
4.5.2	<i>Análise de Sideróforos</i>	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1	Determinação da curva de crescimento	40

5.2	Produção de biomassa em diferentes fontes de carbono	41
5.3	Produção de sideróforos	42
6	CONCLUSÃO	44
	REFERÊNCIAS	45
	APÊNDICE – Curva padrão de massa microbiana de <i>Bacillus stratosphericus</i> CMIAT 61.....	49

1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda do setor agrícola técnicas que auxiliem no desenvolvimento vegetal, instiga a pesquisa por processos químicos e biológicos de aperfeiçoamento, e de forma sustentável e economicamente viável. Nos últimos anos a comunidade bacteriana de gêneros presentes na biota do solo tiveram seu uso biotecnológico intensificado por atuar como uma alternativa promissora na redução dos impactos causados pelo uso de fertilizantes, bem como no beneficiamento do crescimento de plantas.

As bactérias do gênero *Bacillus* são conhecidas como promotoras de crescimento em planta (BPCPs), e quando associadas com a rizosfera destacam-se por excretarem substâncias reguladoras de crescimento em sua produção como, por exemplo, os sideróforos, moléculas capazes de sequestrar o Fe e disponibilizá-lo na forma adequada, visando melhorar a nutrição vegetal (CERQUEIRA, et al. 2015).

Dentro deste contexto, a Embrapa Agroindústria Tropical possui grande interesse no desenvolvimento de projetos utilizando agentes de biocontrole de pragas e nutrição para plantas, onde a utilização de espécies do gênero *Bacillus* isolados da rizosfera é uma das linhas de pesquisa que se encontram em desenvolvimento.

Um fator chave a ser considerado é o desenvolvimento de um bioprocesso de produção de biomassa, baseado em um meio de cultura economicamente viável em larga escala. Para o desenvolvimento deste bioprocesso, deve-se atentar primeiramente ao meio nutricional, particularmente às fontes de carbono e nitrogênio, oriundas de macromoléculas essenciais para a produção de células e nutrição bacteriana (Yáñez-Mendizábal *et al.*, 2012). Tradicionalmente, os meios otimizados para *Bacillus* contem dextrose como fonte de carbono (Souza, 2013), contudo outras fontes podem ser investigadas.

Deste modo, uma comparação inicial dos preços das fontes de carbono utilizadas neste estudo foi realizada e uma eficácia de custo foi observada: em 68,5% (sacarose) e 66,6% (sacarose invertida), quando comparado com o preço do meio controle em dextrose. Isso reflete em uma economicidade no processo de produção de biomassa via otimização do meio de cultura quando analisado sob a ótica de uma escala industrial de produção.

Neste trabalho, uma cepa de *B. stratosphericus* (CMIAT 61), pertencente à coleção de interesse para Embrapa Agroindústria Tropical foi utilizada para avaliar a sua capacidade produtiva de biomassa e sideróforos através da combinação de diferentes concentrações de sacarose ou sacarose invertida como fontes de carbono no meio nutricional.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar o desempenho da bactéria *Bacillus stratosphericus* CMIAT 61 na produção de biomassa sob diferentes fontes de carbono e analisar a produção de sideróforos.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Investigar o perfil de crescimento microbiano de *B. stratosphericus* CMIAT 61 em meio padrão NYD;
- b) Avaliar o efeito das fontes de carbono sacarose e sacarose invertida na produção de biomassa de *B. Stratosphericus* CMIAT 61 e comparar com os resultados obtidos em meio padrão NYD;
- c) Avaliar o efeito das fontes de carbono sacarose e sacarose invertida na produção de siderófilos por *B. Stratosphericus* CMIAT 61.

3 ESTADO DA ARTE

3.1 Bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCPs)

A utilização de bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCPs) surge como uma das estratégias inovadora no campo biotecnológico (TRINDADE, 2021; FIGUEIREDO *et al.*, 2010), na busca por alternativas que impactem diretamente a produção agrícola em termos de qualidade e produtividade, e que estejam alinhadas ao pilar ambiental e viabilizem eficácia no custo.

A relação planta-bactéria se dá em diferentes nichos, seja no solo, superfície ou mesmo no interior das plantas, podendo contribuir consideravelmente no crescimento e desenvolvimento vegetal (AMORIM, 2019). Dentro deste contexto, pesquisas vêm sendo desenvolvidas no intuito de se conhecer o mecanismo de ação das BPCPs que define a melhor utilização dos isolados, que tendem a agir de um modo diferente a depender da espécie de planta ou bactéria utilizada (HUNGRIA e ARAÚJO, 1994).

Duarte (2020) relatou uso de *Pseudomonas fluorescens*, *Paenitoea anatis* e *Azospirillum brasiliensis* como BPCPs frente a gramínea *Urochloa ruziziensis*, e o resultado foi extremamente promissor, apresentando um aumento de massa de forragem e de raízes das plantas em até 37%, pelos dois primeiros gêneros citados. A adoção desta estratégia reduziu a dependência por fertilizantes nitrogenados, devido a uma maior capacidade dos microrganismos de fixar o nitrogênio atmosférico, tornando-o disponível para a planta, reduzindo assim custos de produção, bem como os impactos ambientais gerados pelo uso do insumo de origem fóssil (FUKAMI *et al.*, 2016).

Além da fixação de nitrogênio, a solubilização de fosfatos minerais ou outros nutrientes do solo, estudos tem demonstrado ação indireta do crescimento de plantas por essas bactérias, evitando efeitos deletérios de organismos fitopatogênicos através da produção de antibióticos e sideróforos (VALETTI *et al.*, 2018). As BPCPs são capazes de agir no controle contra fitopatógenos e na degradação de pesticidas, apresentando tolerância a concentrações maiores que as aplicadas em campo, visando até mesmo uma biorremediação (AMORIM, 2019).

Nas pesquisas com BPCPs, existe a busca por bactérias que de fato promovam o crescimento vegetal, independentemente de sua classificação taxonômica, no entanto, as bactérias do gênero *Pseudomonas* e *Bacillus* ocupam posição de destaque, tendo sido aplicadas com maior frequência em estudo nos últimos anos (HUNGRIA e ARAÚJO, 1994).

Espécies de *Pseudomonas* se estabelecem melhor na rizosfera do que outros gêneros, enquanto que as espécies de *Bacillus* possuem a capacidade de adaptação a ambientes variados, além de serem produtoras de endósporos (VALDEBENITO-SANHUEZA e MELO, 2007) estruturas de extrema resistência ao calor, produtos químicos fortes e radiação. Rodrigues *et al.* (2012) relataram o efeito positivo do uso de espécie BPCPs quando co-inocularam *Bradyrhizobium* com uma estirpe de *Bacillus* em uma cultura de caupi (*Vigna unguiculata*). O resultado observado na Figura 1, demonstra o aumento da nodulação e uma melhor resposta simbiótica proporcionada (RODRIGUES, 2012; FIGUEIREDO *et al.* 2010).

Figura 1 – Raízes de caupi (*Vigna unguiculata*) nodulada, inoculada com *Bradyrhizobium sp.* (esquerda) e coinoculada com *Bradyrhizobium sp.* + *Bacillus subtilis* (direita).



Fonte: FIGUEIREDO *et al.* 2010

3.2 *Bacillus sp*

As bactérias do gênero *Bacillus* possuem forma de bastonete, gram-positivos e se destacam pela capacidade de formar endósporos, característica interessante para aplicações industriais uma vez que lhes confere resistência à temperatura e alta pressão osmótica, de forma que pequenas alterações nessas variáveis não geram grandes perturbações no processo (VALDEBENITO-SANHUEZA e MELO, 2007; TEJERA-HERNÁNDEZ, *et al.* 2011; FACCIN, 2012).

Villarreal-Delgado *et al.* (2018) relataram a habilidade exibida pelas espécies de *Bacillus* de se desenvolverem inúmeros habitats, porém o solo ainda é o território onde este gênero bacteriano pode ser encontrado em maior diversidade e quantidade, onde estão frequentemente associadas a plantas. Esta característica demonstra especificidades em potencial para uso em controle biológico, e efeito positivo na promoção de crescimento de plantas (BPCPs).

A Tabela 1 sumariza uma visão geral de alguns exemplos recentes na literatura relacionados à contribuição de *Bacillus sp.* na saúde, crescimento e desenvolvimento das plantas.

Tabela 1 – Mecanismos de promoção de crescimento vegetal utilizando bactérias do gênero *Bacillus*

Espécies ou linhagens	Planta	Benefícios / Modo de ação	Referência
<i>B. subtilis</i>	Alfafa	Remoção de Cd; Promoção de biomassa da planta; Regulação de metabólitos do solo; Metabolismo da alanina, aspartato e glutamato; Biossíntese de peptídeoglicano e ácidos graxos; Metabolismo da cisteína e metionina; Biossíntese de metabólitos secundários.	LI <i>et al.</i> , 2021
<i>B. megaterium</i>	Pepino	Maior biodisponibilidade de P e K e menor uso de fertilizantes desta composição; Geração de uma comunidade microbiana estável no solo daquela região.	ZHAO <i>et al.</i> , 2021
<i>B. safensis</i>	Quiabo	Fixação de N e P; Produção de AIA, amônia, giberelina e catalase; Aumento na biomassa de raízes e ramos	ALALI, KHALIFA e AL-MALKI, 2021
<i>B. pumilus</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> e <i>B. mojavensis</i>	Tomate	Aumento da biomassa da planta sem doença; Aumento na altura da planta; Maior produtividade dos frutos; Produção de auxina; aumento na produção de macro e micronutrientes como N, Ca e Na.	HE <i>et al.</i> , 2019
<i>Bacillus sp.</i>	Tabaco e Alface	Aumento do peso seco dos brotos de mudas de tabaco e no número de raízes laterais e fios radiculares; Produção de hormônio vegetais; Aumento no teor de clorofila (60%) no tabaco e acrescimento no peso seco de alface e brotação de mudas	KIM <i>et al.</i> , 2018
Co-inoculação de <i>Bacillus sp.</i> e <i>Trichoderma asperellum</i>	Bananeira princesa sp.	Melhoria em características morfofisiológicas, Adição de P e K solúveis; Síntese de auxinas e enzimas hidrolíticas	MOREIRA <i>et al.</i> , 2021
<i>B. stratosphericus</i>	Lírio	Atividade antifúngica, Produção de sideróforos e AIA, Fixação de N	KHAN <i>et al.</i> , 2020

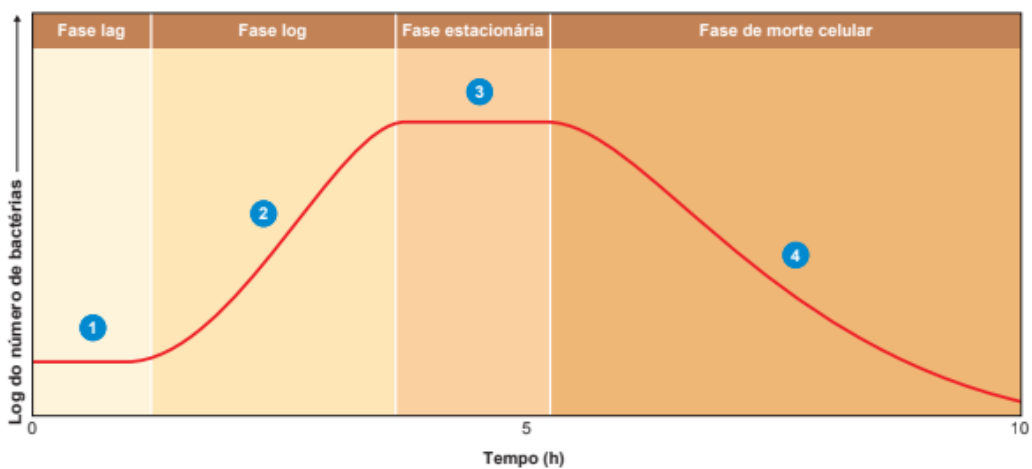
Fonte: Elaborada pela autora

3.3 Crescimento microbiano e análise da biomassa

Ao inserir microrganismos em um ambiente provido de nutrientes contendo pH e temperatura favoráveis às características metabólicas e fisiológicas deste micróbio, ao decorrer do tempo os nutrientes serão consumidos, enquanto que as enzimas intracelulares e metabólitos essenciais serão produzidos, fazendo com que a sua população aumente. É importante salientar que o crescimento microbiano está relacionado ao aumento no número de células, e não ao seu tamanho (HUNGRIA e ARAÚJO, 1994).

Mardigan *et al.*, (2016) descreveram que a multiplicação da população bacteriana ocorre em intervalos regulares, de forma que é possível representar graficamente em uma curva de crescimento bacteriano, que pode ser expressa pelo logaritmo da contagem microbiana em função do tempo, descrevendo um ciclo completo em quatro fases em formato sigmoidal, conforme ilustrado na Figura 2.

Figura 2 – Curva de Crescimento típica de uma população bacteriana



Fonte: TORTORA (2012)

A fase Lag consiste em um período de ajuste à mudança súbita de ambiente, caracterizada como uma fase de latência. O crescimento inicia em um valor próximo de zero onde acontecerá a síntese de macromoléculas, enzimas e metabólitos secundários essenciais a sua existência. Uma vez cultivadas em condições aptas ao seu crescimento, a multiplicação de células bacterianas ocorre de forma exponencial e constante, conforme evidenciado na segunda fase do ciclo, conhecida como fase log ou fase exponencial (SWINNEN *et al.*, 2004).

Ao passo que o crescimento celular evolui, substâncias são consumidas, metabólitos se acumulam, e uma fase estacionária é notada quando a quantidade de células viáveis se iguala a quantidade de células mortas (crescimento críptico). A população máxima é atingida quando a população microbiana deixa de crescer e número de mortes ultrapassa o total de células formadas.

O crescimento populacional microbiano acontecerá com variações características a cada microrganismo através de um processo de fissão binária, culminando com a duplicação da célula. A sua quantificação pode ser constatável por diversos métodos, dentre os quais a contagem em placas que registra o número de células viáveis (colônias) formadas, por meio de diluições seriadas de um inóculo (NICOLAU, 2014).

Outra forma de analisar a quantidade de biomassa é estimando a concentração celular por meio de transmitância. Em uma suspensão de biomassa bacteriana, ao passo em que as bactérias se multiplicam, o meio se torna turvo e opaco. A massa celular produzida é proporcional ao número de células, e a turbidez pode ser utilizada para estimar o número de células através da correlação com a densidade óptica (DO).

Após o cultivo, as amostras são separadas do meio nutricional por centrifugação e diluídas em água, e a transmitância é lida com o auxílio de um espectrofotômetro. Este equipamento promove por meio de uma fonte a emissão espectral contínua de luz que, com comprimentos de onda específicos, são selecionados por um monocromador, passam pela amostra e a energia radiante da luz emergente é então medida correlacionando com as Leis de Lambert Beer (SKOOG *et al.*, 2014).

3.4 Meios de cultura

O crescimento de qualquer organismo depende inteiramente de complementos nutricionais diferentes e em quantidades específicas. Dentro desta perspectiva, meios de culturas são preparados para o cultivo de microrganismos em laboratório, através de estudos detalhados de um material nutriente, a fim de promover o crescimento bem sucedido de acordo com a composição exigida por cada espécie em termos de macro e micronutrientes (MARDIGAN *et al.*, 2016; TORTORA *et al.*, 2012).

Em microbiologia, duas grandes classes de meio de cultura são utilizadas para o cultivo: meios complexos e meios definidos. Em meios complexos, o conhecimento da composição não é tão preciso e se tem o emprego de componentes de origem animal ou vegetal para o cultivo. A nível laboratorial, meios definidos apresentam muito mais vantagens por exibir um controle da composição química em materiais orgânicos ou inorgânicos de forma qualitativa e quantitativa, gerando um poder de aperfeiçoamento da produção e qualidade do produto (SILVA, 2006).

Andrade (2009) pontuou que a escolha de um meio de cultura torna-se tão essencial a um processo fermentativo quanto a escolha do microrganismo. E os critérios a serem seguidos para uma produção otimizada de acordo com Souza (2013), são listadas a seguir:

- ✓ Eficácia no custo;
- ✓ Suprir as exigências nutricionais do microrganismo;
- ✓ Que pequenos distúrbios (tamponação e formação de espuma) não gerem grandes perturbações ao processo;
- ✓ Facilidade na recuperação do produto;
- ✓ Alta disponibilidade, longo tempo de armazenamento;
- ✓ Simplicidade no manejo e descarte de efluentes.

Espécies de *Bacillus* já são conhecidas por seu grande apelo industrial devido à sua acessibilidade nos mais distintos aspectos de cultivo em escala comercial, exigindo em sua manutenção fontes de carbono, nitrogênio e sais minerais. No entanto, a natureza desta composição bem como a concentração destes nutrientes depende da espécie a ser cultivada.

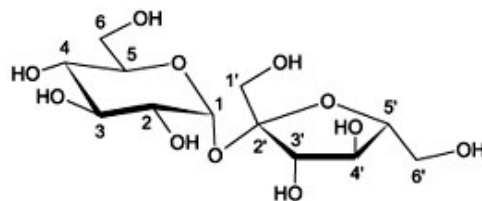
3.5 Fontes de Carbono (FC)

Os nutrientes necessários ao funcionamento de uma célula microbiana são originados dos elementos químicos, seja de forma essencial, ou posteriormente metabolizados. Mardigan *et al.*, (2016) relata que dentre os macronutrientes, os compostos orgânicos são cruciais ao funcionamento de seres eucariontes ou procariontes, sendo que em células bacterianas, o carbono corresponde a cerca de 50% do peso seco total da célula.

As fontes de carbono (FC) provenientes de ácidos graxos, orgânicos, compostos aromáticos, bases nitrogenadas, aminoácidos e açúcares, desempenham papel fundamental na obtenção de energia e proliferação celular, além da biossíntese de metabólitos (MAO *et al.*, 2005).

A sacarose ou 1-O-(β -D-Fructofuranosil)- α -D-glicopiranosose (Figura 3), é um dissacarídeo composto por frutose e glicose unidas por uma ligação glicosídica (BOSCOLO, 2003), que através de uma reação de hidrólise gera o açúcar invertido, uma mistura equimolar dos monossacarídeos com vasta aplicabilidade em processos industriais com características que se alinham aos critérios de escolha de um meio de cultura (ALMEIDA, 2003), além de se destacar pela facilidade de obtenção e eficácia de custo (HUNGRIA e ARAÚJO, 1994).

Figura 3 – Estrutura da Sacarose



Fonte: BOSCOLO (2003)

A reação de inversão de sacarose já foi estudada por uma gama de pesquisadores que observaram através de polarimetria o desvio no plano de luz polarizada na direção oposta da sacarose (+66°) à direita, frutose à esquerda (-92°) e a glicose à direita (+52°), como resultado, têm-se os açúcares redutores, oriundos do caráter levógiro da frutose. (CASTILLO,2008; BRIGHENTI, 2011). Sua produção pode ser concebida por hidrólise enzimática ou ácida, esta última pode ser alcançada pela ação direta de um ácido ou liberação de H⁺ de uma resina catiônica (ALMEIDA, 2003).

3.6 Produção de sideróforos

O ferro é um elemento químico substancial à existência de diversos organismos, garantindo o crescimento das plantas, a síntese de clorofila, o funcionamento fotossintético. Nos microrganismos produz a redução do oxigênio para síntese de ATP, e a diminuição de ribotídeos precursores de DNA para formação da Heme. No entanto, a disponibilidade de ferro na natureza na sua forma livre é tóxica aos organismos vivos, pois tende a formar hidróxidos e oxihidróxidos com baixa cinética de dissolução, limitando sua absorção e gerando efeitos deletérios (FERREIRA *et al.*, 2019; RAJKUMAR *et al.*, 2010; VARMA *et al.*, 2007).

Dentro deste contexto, a deficiência de ferro induziu a busca por agentes com propriedades específicas como o forte efeito quelante apto a competir com o íon hidroxila para produzir o estado férrico do ferro, disponibilizando o mineral em sua forma solúvel com uso potencial para fertilizantes. Uma técnica bastante eficaz é o uso de sideróforos, moléculas desenvolvidas por bactérias e plantas gramíneas que aumentam a disponibilidade do metal solúvel (KUMAR *et al.*, 2021).

Sideróforos (do grego: portadores de ferro), são moléculas de baixo peso molecular que atuam como vacúolos onde o ferro é armazenado como substrato na forma ferrosa, para uso posterior. Rajkumar *et al.*, (2010) cita que além do ferro, os sideróforos formam complexos estáveis com Cd, Al, Cu, Ga, Pb, Zn, dentre outros. Seu uso como vetor em sistema de absorção destes metais é amplamente estudado para aumentar a eficácia em processos de biorremediação em solos contaminados, com aplicação em campos clínicos, agrícolas e ambientais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismo

A cepa *Bacillus stratosphericus* CMIAT 61, pertencente à Coleção de Microrganismos de Interesse para Agroindústria Tropical – CMIAT da Embrapa Agroindústria Tropical foi utilizada neste trabalho. Todo o experimento deste estudo foi realizado no Laboratório de Tecnologia da Biomassa (LTB) pertencente à unidade da Embrapa Agroindústria Tropical (CNPAT).

4.1.1 Manutenção e Ativação de cepas

As estirpes foram preservadas em tubos criogênicos contendo caldo NYD (dextrose 10 g L⁻¹, extrato de levedura 5 g L⁻¹, extrato de carne 3 g L⁻¹ e peptona de carne 5 g L⁻¹) + 15% de glicerol (que atua como agente crioprotetor) e congeladas a – 85 °C em ultra freezer (DA SILVA *et al.*, 2018). Para preservação na bacterioteca, a linhagem foi repicada em ágar NYDA (nutrient-yeast-dextrose ágar) inclinado, e incubada à 30 °C por 24 horas em BOD (Tecnal® - Modelo TE-391) e, por conseguinte, mantida sob refrigeração.

4.1.2 Preparo do Inóculo

O preparo do inóculo se deu através da coleta de células do microrganismo, com o auxílio de uma alça estéril, transferindo-o assepticamente em capela de fluxo laminar (Esco Sentinel™ Gold) para um Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio líquido NYD (de composição semelhante ao NYDA com a exceção de ágar-ágar), e em seguida, incubado em estufa incubadora rotatória “shaker” (New Brunswick™ Innova® 44/44R) operando à 30 °C - 150 rpm durante 24 horas.

A Figura 4 apresenta Erlenmeyers contendo caldo de cultivo NYD estéril (à esquerda) e o mesmo após 24 horas de incubação em agitador rotativo (à direita).

Figura 4 – Meio de cultivo antes e depois da inoculação, respectivamente



Fonte: Elaborado pela Autora (2021)

4.2 Meios de cultura

4.2.1 Meio NYDA

Seguindo metodologia proposta por Mariano (2005), o meio NYDA utilizado na manutenção e ativação das cepas tem a sua composição descrita na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição do Meio NYDA

Componente	Composição (g L ⁻¹)	Marca
Dextrose	10,0	Vetec
Extrato de Levedura	5,0	Kasvi
Extrato de Carne	3,0	HiMedia
Peptona de Carne	5,0	Sigma- Aldrich
Sulfato de Amônio	3,0	Vetec
Sulfato de Magnésio	0,5	CRQ - LTDA
Ágar-Ágar	15,0	Dinâmica

Fonte: Mariano (2005)

O preparo do meio foi realizado através da solubilização dos componentes em água destilada. Na adição de ágar, o meio foi aquecido por alguns minutos até ficar límpido. Após

solubilização, o meio foi transferido a tubos de ensaio rosqueável de 20x150 mm, contendo 12 mL de meio cada, vedados e esterilizados em autoclave a 111 °C, durante 20 minutos.

4.2.2 Caldo NYD

Nos experimentos para a fermentação e preparo de inóculo, e determinações de curva padrão e de crescimento, foi empregado caldo NYD, cuja composição química foi preparada conforme descrito por Mariano (2005), de forma similar a NYDA, sem a presença de ágar.

Os elementos do caldo foram solubilizados em água destilada, homogeneizados e em seguida acondicionados em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de caldo cada. As etapas seguintes de esterilização foram realizadas de forma análoga ao procedimento utilizado para o meio NYDA.

4.3 Curva padrão de biomassa

Com o intuito de realizar a correlação entre valores calculados de absorvância com a concentração presente em suspensão celular, a construção da curva padrão microbiana de *Bacillus stratosphericus*, deu-se em duas etapas:

4.3.1 Obtenção da suspensão microbiana

Durante a vigência da Fase Lag a taxa de reprodução do microrganismo é praticamente nula, seu intervalo depende das diferenças de composição do meio no qual o microrganismo foi transferido, uma vez que as células estarão se adaptando ao seu novo ambiente e sintetizando novas enzimas para o consumo deste novo nutriente. Inserido neste contexto, buscou-se otimizar a produção e reduzir o tempo de Fase Lag com a inserção de um pré-inóculo para cada ensaio fermentativo deste estudo.

Partindo da cepa em estoque conservada em ágar NYDA inclinado, transferiu-se através da raspagem com o auxílio de uma alça estéril, o microrganismo para um Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de caldo NYD. O procedimento ocorreu de forma asséptica em capela de fluxo laminar. Em seguida, o microrganismo diluído em caldo foi conduzido a uma estufa incubadora rotatória New Brunswick™ Innova® 44/44R, 150 rpm à temperatura de 30 °C, por um período de 24 horas. Após este período, um volume de 1µL do

pré-inóculo foi transferido a um Erlenmeyer contendo 50 mL de caldo NYD, seguindo as mesmas etapas e condições de cultivo dos processos anteriormente descrito.

4.3.2 *Preparação da Biomassa*

Após crescimento da biomassa, o microrganismo concentrado no meio de cultura foi transferido assepticamente para tubos falcons de 50 mL e centrifugado (Centrífuga Excelsa® II Modelo 206-BL) a 3600 rpm por 15 minutos, para separar os pellets da fase líquida (sobrenadante). Posteriormente, a fase líquida foi desprezada com o intuito de retirar o excesso de meio e evitar que este interfira na leitura das amostras, e foi realizada a lavagem da biomassa (Figura 5) adicionando 20 mL de água destilada e homogeneização da solução em agitador tipo Vórtex (BiomiXer).

A suspensão microbiana obtida foi submetida ao processo de centrifugação sob as mesmas condições descritas, onde a fase líquida foi desprezada e o processo de lavagem repetido por mais duas vezes. Ao final desta etapa, 25 mL de água destilada foram adicionados ao tubo, e a solução resultante foi homogeneizada no vórtex, levando à obtenção de uma suspensão de células concentradas e lavadas.

Figura 5 – Pellets de biomassa obtida após separação do sobrenadante e lavagem



Fonte: Elaborado pela Autora (2021)

4.3.3 *Preparação das cápsulas de porcelana e determinação da biomassa seca*

As cápsulas de porcelana foram previamente lavadas e submetidas a processo de secagem em estufa a 105 °C por 4 horas, e em seguida, mantidas sob vácuo em dessecador para se equilibrar à temperatura ambiente, e em seguida pesadas para mensurar a tara.

Após este procedimento, 5 mL da suspensão microbiana concentrada foram transferidas analiticamente para a cápsula. O ensaio foi conduzido em triplicata. As amostras foram acondicionadas em estufa a 105 °C por 24 horas para atingir massa seca constante, ao fim do processo as cápsulas foram novamente pesadas. A biomassa seca é calculada com base na equação 1.

$$\text{biomassa seca (g)} = (\text{tara da cápsula} + \text{biomassa seca}) - \text{tara da cápsula} \quad (1)$$

Uma vez com os dados de biomassa seca (g), a concentração de biomassa seca pode ser determinada pela equação 2:

$$[\text{biomassa seca}] = \frac{\text{biomassa seca (g)}}{0,005 (L)} \quad (2)$$

Onde: [biomassa seca] é a concentração de biomassa seca em g L⁻¹, e 0,005 corresponde ao volume de solução utilizado em litros para determinação da biomassa seca.

4.3.4 Preparo das Diluições e leituras de absorbância

As diluições das soluções de biomassas foram preparadas utilizando-se balões volumétricos de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 250, 500, 100 e 2000 mL. A escolha de volume dos balões variou conforme a quantidade de biomassa desenvolvida no período de incubação (Figura 6).

A suspensão microbiana foi novamente homogeneizada em tubo vórtex, e 1 mL de cada solução foi transferida analiticamente aos balões volumétricos, seguida de diluição com água destilada. As soluções de biomassa em diferentes diluições foram transferidas para a cubeta de vidro de um espectrofotômetro (Varian, Modelo Cary 50) contendo uma amostra em branco (água destilada). A aquisição de dados foi realizada usando o software Cary WinUV no módulo Simple reads.

Figura 6 – Diluições de biomassa para determinação de Curva Padrão



Fonte: Elaborado pela Autora (2021)

A curva padrão de conversão de valores de absorvância em concentração, para *B. stratosphericus* pode ser obtida por meio de uma regressão linear dos dados de concentração de biomassa seca em g L^{-1} pela absorvância lida para cada diluição e tomando $b=0$ (Equação 3), sendo assim:

$$Y = aX + b \quad (3)$$

O fator a ser utilizado para conversão posterior de absorvância lida em valores de concentração de biomassa seca é calculado pela Equação 4.

$$f = 1/a \quad (4)$$

Onde: f é o fator de conversão de absorvância para concentração e a , o coeficiente angular obtido por regressão linear. Para cálculos de concentração é possível substituir os valores médios de absorvância através da Equação 5.

$$C = \overline{abs} * f * d \quad (5)$$

Em que C corresponde a concentração de biomassa seca (g/L), \overline{abs} , valor médio das absorvâncias, f o fator de conversão de absorvância para concentração e d , o valor de diluição usada.

4.4 Determinação da curva de crescimento

A determinação da curva de crescimento foi realizada com o intuito de identificar o tempo em que se tem o número máximo de células no cultivo, a cinética de cultivo, bem como as fases de crescimento microbiano.

O delineamento experimental foi proposto para um estudo de crescimento do microrganismo por um período de 24 horas. 50 mL de caldo de *Bacillus stratosphericus* CMIAT 61 cultivado em NYD foram transferidos para Erlenmeyers de 250 mL e incubados em shaker a 150 rpm sob uma temperatura de 30 °C. O ensaio foi realizado em triplicata.

Os frascos foram retirados da incubadora rotatória em intervalos de tempo de 3 horas, e submetidos ao processo de centrifugação e lavagem de biomassa de forma análoga ao procedimento da curva padrão de crescimento. A massa celular foi ressuspensa em balões de volumes que variavam com a quantidade de biomassa produzida. Em seguida, a densidade óptica foi medida a 600 nm para construção da curva.

4.5 Produção de biomassa em diferentes fontes de carbono

A avaliação da produção de biomassa do microrganismo se deu através da variação da fonte de carbono e da concentração da solução. Desta forma, neste experimento utilizou-se, separadamente, sacarose (Dinâmica, P.A) e sacarose invertida como fontes de carbono nas concentrações de 5, 10 e 15 g L⁻¹ (Tabela 3).

Tabela 3 – Composição do meio para o estudo da fonte de carbono.

Componente	Composição (g L ⁻¹)	Marca
Fonte de Carbono Estudada	Concentração avaliada	Dinâmica
Extrato de Levedura	5,0	Kasvi
Extrato de Carne	3,0	HiMedia
Peptona de Carne	1,0	Sigma- Aldrich
Sulfato de Amônio	3,0	Vetec
Sulfato de Magnésio	0,5	CRQ – LTDA

Fonte: Elaborado pela Autora (2021)

4.5.1 Inversão da Sacarose

Utilizando a metodologia de Alves (2017) adaptada, a sacarose invertida foi obtida pela dissolução em água destilada de diferentes pesagens de sacarose P.A em Erlenmeyers de 250 mL para produzir soluções de sacarose nas concentrações de 5, 10 e 15 g L⁻¹. Após esta etapa, reduziu-se o pH das soluções a 1,5 utilizando HCl (6M) e as soluções foram conduzidas a um banho maria onde permaneceram por 40 min a 80 °C (Figura 8). Após a reação de hidrólise, a sacarose invertida foi adicionada à composição do caldo conforme Tabela 5. A solução obtida foi homogeneizada e teve pH aferido para 6,3 através da adição de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 40,0 N.

Após a obtenção do meio nas diferentes concentrações de sacarose e sacarose invertida, 1μL do microrganismo foi inoculado em erlenmeyres contendo caldo NYD. As amostras foram submetidas à incubação rotatória a 150 rpm a uma temperatura de 30 °C pelo tempo determinado na curva de crescimento, numa fermentação de regime contínuo. Após este período, o inóculo foi submetido a centrifugação a 3600 rpm por 15 min, e o sobrenadante livre de células foi posteriormente utilizado nas análises de sideróforos. A biomassa teve sua concentração celular medida em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 600 nm.

4.6 Produção de Sideróforos

Os ensaios para detecção e determinação de sideróforos foi realizado seguindo método com corante Cromo Azurol S (CAS), conforme descrito por SCHWYN & NEILANDS (1987) com algumas modificações, com o intuito de estudar sistemas de absorvência de ferro. Devido à fotossensibilidade e periculosidade na liberação de gases tóxicos apresentada por alguns dos componentes da solução, o experimento foi realizado em ambiente escuro e em capela de exaustão química. Cabe ressaltar também que a água utilizada no preparo das soluções era deionizada.

4.6.1 *Preparo da Solução CAS*

A solução CAS provém do preparo de quatro soluções.:

Solução A: 12,2 mg de Cromo Azurol S (Sigma-Aldrich) foi dissolvida em água deionizada e analiticamente transferida para um balão volumétrico, que foi preenchido com água para produzir 10 mL de solução.

Solução B: 27 mg de cloreto férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) foi manipulado em um béquer e homogeneizado com 100 mL de água. Após completa dissolução do sal, 84 μL de HCl (grau analítico) foram adicionados cuidadosamente nesta solução.

Solução C: 21,9 mg do reagente HDTMA (Brometo de hexadeciltrimetilamônio) da marca Sigma-Aldrich, foram dissolvidos em 25 mL de água previamente pré-aquecida ($\pm 55^\circ\text{C}$). A solução foi homogeneizada.

Solução D: 4,307 g de piperazina anidra (Sigma-Aldrich) foram dissolvidas em 40,0 mL de água destilada.

7,5 mL da solução A e 1,5 mL da solução B foram adicionados em um béquer de vidro de 50mL. A esta mistura foi adicionada o conteúdo da solução C. A mistura resultante das soluções A, B e C foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL, e em seguida o conteúdo da solução D foi adicionado. Água destilada foi adicionada para completar o volume do balão volumétrico e a solução foi homogeneizada. A solução resultante foi transferida para um béquer de vidro envolto em papel alumínio, e o pH foi ajustado com HCl (12M) para 5,6 com auxílio de pHmetro portátil (Phtek Modelo pH-100). A solução foi armazenada em geladeira em frasco de polietileno envolto em papel alumínio.

4.6.2 *Análise de sideróforos*

Em um experimento monitorado em triplicatas, tubos de ensaios rosqueados de 20x150 mm foram embrulhados em papel alumínio e previamente identificados. A cada tubo foram adicionadas 2 mL da solução CAS, e em seguida 2 mL do sobrenadante proveniente do ensaio de produção de biomassa em diferentes fontes de carbono. As amostras foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A absorbância das soluções foi registrada em espectrofotômetro a 630 nm, tomando como zero a água deionizada, e como controle alíquotas do caldo com sacarose e sacarose invertida nas concentrações de 5, 10 e 15

g L⁻¹. A fórmula para calcular o percentual de íons Fe³⁺ complexado, indicando o teor de sideróforos produzidos pelo microrganismo é indicado na Equação 6.

$$(\%) = (Ab - Aa) * 100/Ab \quad (6)$$

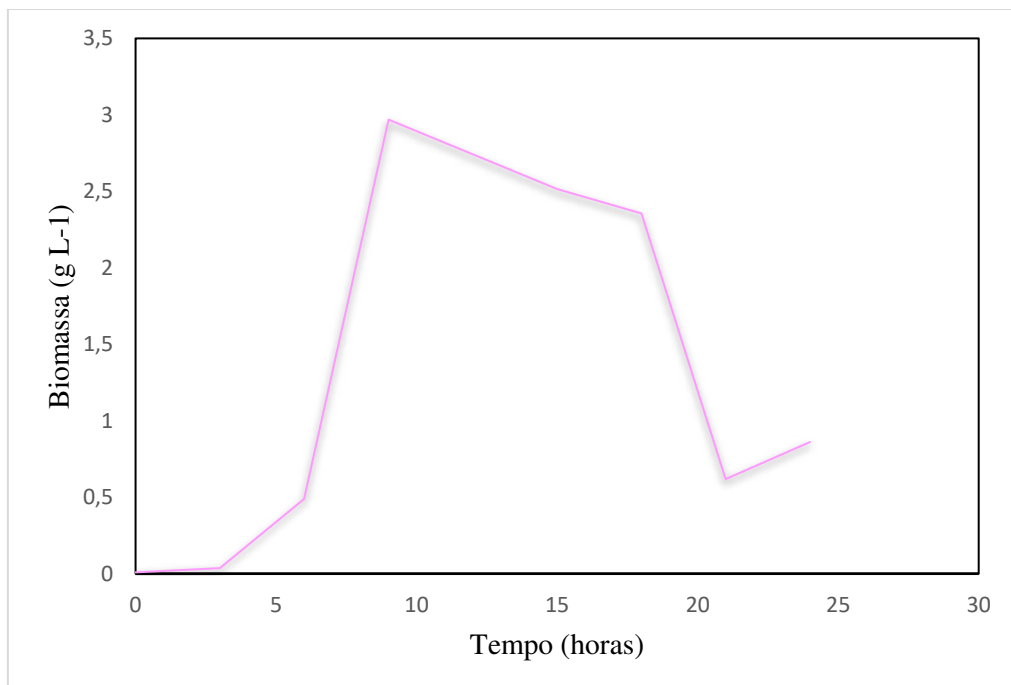
Onde, Ab é a absorvância do controle (caldo de cultivo + solução CAS) e Aa, a absorvância lida da amostra de microrganismo fermentado com solução CAS.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Curva de Crescimento

O perfil do crescimento do *Bacillus stratosphericus* CMIAT 61 em função do tempo de fermentação em meio líquido NYD foi observado, amostras foram retiradas ao longo de um cultivo de 24 horas, as transmitâncias foram lidas a 600 nm e o resultado é apresentado no Gráfico 1.

Gráfico 1 – Perfil da curva de crescimento de *Bacillus stratosphericus* CMIAT 61 em g L^{-1} de biomassa em caldo NYD à 30 °C em função do tempo.



Apesar do uso de um inóculo adaptado, ainda foi possível observar uma fase lag até o período de 3 horas de cultivo, apresentando $0,03618 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa. Uma alternativa para reduzir ou evitar a fase lag seria aumentar a concentração de inóculo utilizado.

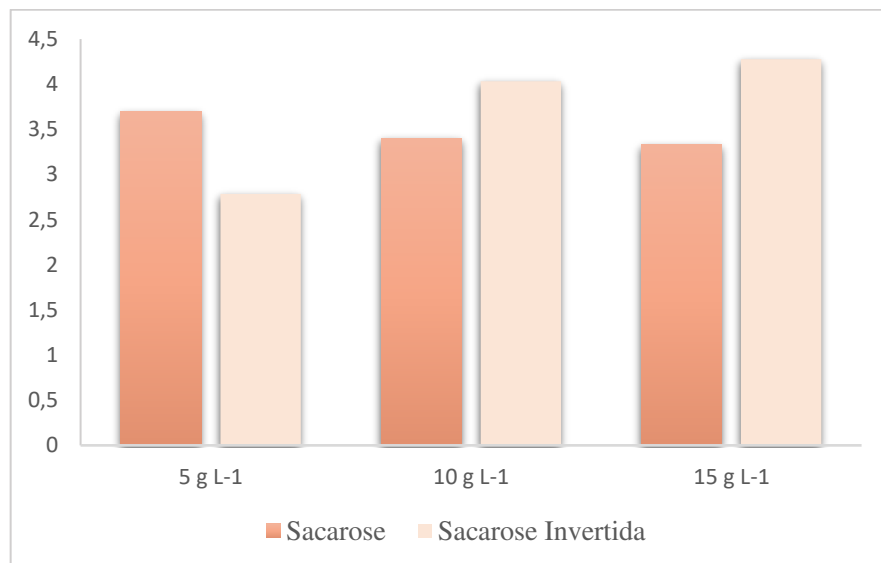
O crescimento exponencial do microrganismo foi evidenciado entre 3 e 9 horas de fermentação. Após este período, a velocidade de crescimento foi reduzida e a cultura entrou em uma fase estacionária com sutis reduções de crescimento entre 15 horas ($2,51 \text{ g L}^{-1}$) e 18 horas ($2,35 \text{ g L}^{-1}$). Posteriormente, após fase estacionária, CMIAT 61 sofreu um processo morte celular de forma exponencial.

Com produtividade máxima em 9 horas de cultivo ($2,97 \text{ g L}^{-1}$) e para os ensaios posteriores, definiu-se um tempo de 18 horas de cultivo pela maior praticidade da execução do experimento nesse tempo e por ainda proporcionar um valor elevado de biomassa.

5.2 Produção de Biomassa em diferentes fontes de carbono

Nascimento (2007) sugere que meios de cultura utilizados em fermentações industriais contribuem bastante no custo de produção em razão dos grandes volumes. Em razão disso, tem-se interesse no estudo de diferentes fontes de carbono para alinhar produtividade a baixos custos de processamento. O Gráfico 2 mostra o efeito das fontes analisadas no presente estudo na concentração de biomassa produzida.

Gráfico 2 – Efeito das fontes de carbono (sacarose e sacarose invertida) e concentração na produção de biomassa de *Bacillus stratosphericus* CMIAT 61 à 30°C .



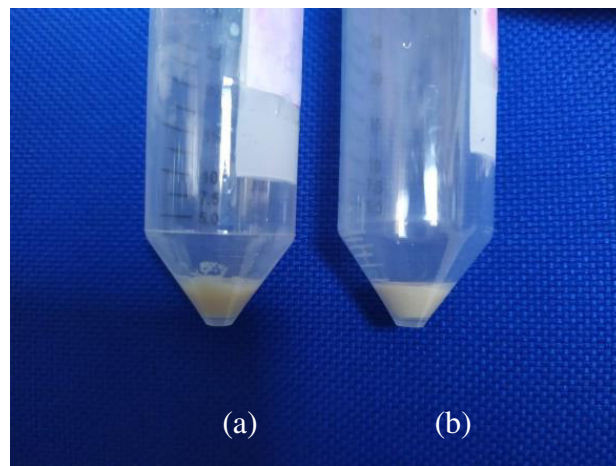
A partir dos resultados apresentados, foi observado que *B. stratosphericus* teve uma maior produção de biomassa na presença de sacarose invertida na concentração de 15 g L^{-1} como fonte de carbono ($4,28 \text{ g L}^{-1}$). Para o meio contendo sacarose, o valor máximo de biomassa foi de $3,7 \text{ g L}^{-1}$ para o meio contendo 5 g L^{-1} de sacarose. Estes valores foram maiores que a produtividade máxima observada em 9 horas de cultivo ($2,97 \text{ g L}^{-1}$) em meio com glicose como fonte de carbono.

Mohanrasu et al. (2020), analisaram o efeito das fontes de carbono (arabinose, glicose, glicerol, lactose, ácido láctico, manitol, acetato de sódio, amido e sacarose a um nível

de 20 g / L) no crescimento de *Bacillus megaterium* e na produção de poliidroxibutirato (PHB), e encontram na glicose um destaque frente as outras fontes com maior rendimento.

Para além disso, observou-se uma diferença no que diz respeito a homogeneização da biomassa com a floculação dos pellets bacterianos em algumas concentrações nas diferentes fontes. Este resultado é evidenciado na Figura 7, onde à direita têm-se 10 g L⁻¹ de sacarose invertida, um pellet compactado que não apresentou dificuldades em sua dissolução, ao passo que na amostra à esquerda, onde há sacarose invertida (5 g L⁻¹) houve a formação de grumos.

Figura 7 – Biomassa produzida em 5 g L⁻¹ (a) e 10 g L⁻¹ (b) , em sacarose invertida.



Fonte: Elaborado pela Autora (2021)

HUNGRIA e ARAÚJO (1994) relatam, que devido a existência de exopolissacarídeos, células bacterianas tendem a se agrupar e formar grumos, normalmente ao acaso, no entanto, quanto maior a produção de exopolissacarídeos por uma espécie bacteriana, maior será a dificuldade de dissolução destes grupamentos de células.

Em trabalho realizado por PAULA (2019), cepas de *Bacillus stratosphericus* apresentaram potencial para produção deste biopolímero em meio de cultura a base de sacarose. Possivelmente, devido a esta propensão de formação de exopolissacarídeos por esta espécie, a formação de flocos e agrupamento de células bacterianas, foram observados.

5.3 Produção de Sideróforos

Em condições de baixa disponibilidade, íons férricos são sequestrados no ambiente por células microbianas após reconhecimento específico de proteínas de membrana,

por moléculas de baixo peso molecular, denominadas sideróforos. Essa característica pode ser encontrada em BPCPs. O modo de ação para complexação do ferro bem como a classificação dos tipos de sideróforos produzidos por essas bactérias e a metodologia empregada tem sido alvo de pesquisa desde a década de 90 com a publicação do ensaio universal para detecção e determinação de sideróforos em 1987 por Schwyn e Neiland.

No presente estudo, a metodologia adotada pela identificação por absorvância com solução CAS, produziu, para amostras de sobrenadantes contendo as diferentes fontes de carbono, um percentual de Fe^{3+} complexado que é sumarizado na Tabela 4.

Tabela 4 – Percentual de Fe^{3+} complexado por sideróforos presentes nos sobrenadantes de *Bacillus stratosphericus* CMIAT 61

Descrição	Absorbância	(%)
Água destilada	0,4444	-
Meio Sacarose 5g L ⁻¹	0,6080	-
Meio Sacarose 10g L ⁻¹	0,5087	-
Meio Sacarose 15g L ⁻¹	0,5419	-
Meio Sacarose Invertida 5g L ⁻¹	0,5517	-
Meio Sacarose Invertida 10g L ⁻¹	0,6196	-
Meio Sacarose Invertida 15g L ⁻¹	0,4407	-
Sobrenadante Sac 5g L ⁻¹	0,5487	9,8
	0,5787	4,8
	0,6177	-1,6
Sobrenadante Sac 10g L ⁻¹	0,5366	-5,5
	0,5690	-11,9
	0,5200	-2,2
Sobrenadante Sac 15g L ⁻¹	0,6563	-21,1
	0,3855	28,9
	0,3555	34,4
Sobrenadante Sac. Inv 5g L ⁻¹	0,5112	7,3
	0,6695	-21,4
	0,2208	60,0
Sobrenadante Sac. Inv 10g L ⁻¹	0,2404	61,2
	0,2484	59,9
	0,6599	-6,5
Sobrenadante Sac. Inv 15g L ⁻¹	0,2663	39,6
	0,3910	11,3
	0,3922	11,0

Sobrenadantes de 10 e 5 g L⁻¹ de sacarose apresentaram menor variação no valor desvio padrão e de forma geral não expressaram quelação precisa. O valor médio maior foi observado para o sobrenadante de sacarose investida a 10 g L⁻¹, porém com grande desvio padrão.

Varma *et al.* (2007) relataram que em meios de cultura laboratoriais a quantidade de sideróforos produzidos pode ser tão pouca quanto 0,1% do produzido sob condições mais eficientes. Desta forma, se faz necessário a remoção de elementos traços (Mo e Mn) que possam influenciar no resultado final. Assim, resultado negativo pode ser relacionado a falta de atenção a um tratamento prévio da amostra para remoção de possíveis elementos traços interferentes.

6 CONCLUSÃO

O potencial de produção de biomassa de *Bacillus stratosphericus* CMIAT 61 foi estudado. Foi possível concluir que, dentre as fontes de carbono analisadas, a sacarose mostrou uma fonte de carbono mais eficiente para produção de biomassa em meios à 5 g L⁻¹ de fonte de carbono, gerando 3,7 g L⁻¹ de biomassa produzida no tempo estudado. Já o uso de 15 g L⁻¹ de sacarose invertida é capaz de gerar maior teor de biomassa das condições estudadas, 4,8 g L⁻¹ de biomassa.

A determinação da produção de sideróforos pelo microrganismo não apresentou resultados satisfatórios, no entanto, um possível tratamento prévio da amostra para remoção de interferentes poderiam ser desenvolvidos em trabalhos posteriores.

REFERÊNCIAS

- ALALI, Heba Adel; KHALIFA, Ashraf; AL-MALKI, Mohammed. Plant growth-promoting rhizobacteria from *Ocimum basilicum* improve growth of *Phaseolus vulgaris* and *Abelmoschus esculentus*. **South African Journal of Botany**, v. 139, p. 200-209, 2021.
- ALMEIDA, Ana Cláudia Santana et al. Estudo do processo contínuo para produção de açúcar invertido por via enzimática. 2003. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.
- ALVES, Brenda Fontenele. Produção de biomassa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* CMIAT 170-L7K antagônica a fungos fitopatogênicos. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal do Ceará, 2017.
- AMORIM, Alyson da Silva. Influência de fatores abióticos sobre o desenvolvimento de bactérias promotoras de crescimento vegetal dos gêneros *Bacillus* e *Pantoea*. 2019. 43 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Agronomia) – Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns, 2019.
- ANDRADE, Marcela Vicente Vieira. Otimização de um meio de cultura para a produção de poligalacturonases pelo termofílico *Bacillus sp.* smia-2 e propriedades da enzima. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, 2009.
- BORGES, A. L. *et al.* Ferrirrigação da bananeira. Cruz das Almas: Embrapa Mancioca e Fruticultura, 2002. 1p (Embrapa CNPMF, Comunicado Técnico, 84).
- BOSCOLO, Maurício. Sucroquímica: Síntese e potencialidades de aplicações de alguns derivados químicos de sacarose. **Química nova**, v. 26, n. 6, p. 906-912, 2003.
- BRIGHENTI, Deodoro Magno et al. Inversão da sacarose utilizando ácido cítrico e suco de limão para preparo de dieta energética de *Apis mellifera* LINNAEUS, 1758. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 2, p. 297-304, 2011.
- CASTILLO ZURITA, Edwin José. Avaliação da inversão da sacarose em um sistema de evaporação (evaporador de filme descendente com promotor de película). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2008.
- CERQUEIRA, Wilza et al. INFLUÊNCIA DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *Bacillus* SOBRE O CRESCIMENTO DE FEIJÃO COMUM (*Phaseolus vulgaris* L.). **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n. 20, 2015.
- DA SILVA, Christiana de FB et al. Potencial da biomassa bacteriana promotora de crescimento no desenvolvimento de mudas micropropagadas de bananeira. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 22, n. 11, p. 782-787, 2018.
- DUARTE, Camila Fernandes Domingues et al. Inoculação de bactérias promotoras do crescimento vegetal em *Urochloa Ruziziensis*. **Research, Society and Development**, v. 9, n.

8, p. e630985978-e630985978, 2020.

FACCIN, Debora Jung Luvizetto. Avaliação de condições de cultivo para aumento da produção de P (3HB) por *Bacillus megaterium* e modelagem do bioprocesso. Tese de Doutorado Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2012.

FERREIRA, Carlos MH et al. Comparison of five bacterial strains producing siderophores with ability to chelate iron under alkaline conditions. **AMB Express**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2019.

FIGUEIREDO, M. et al. Biotecnologia aplicada à agricultura: textos de apoio e protocolos experimentais. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Recife: Instituto Agronômico de Pernambuco.,p. 272, 2010

FUKAMI, Josiane et al. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **Amb Express**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2016

©GLOBAL CATALOGUE OF MICROORGANISMS. Advanced Search- *Bacillus stratosphericus*. Disponível em: <
http://gcm.wfcc.info/speciesPage.jsp?strain_name=Bacillus%20stratosphericus>.
Acesso em: 07 de março de 2021

HE, Yanhui et al. Co-inoculation of *Bacillus* sp. and *Pseudomonas putida* at different development stages acts as a biostimulant to promote growth, yield and nutrient uptake of tomato. **Journal of applied microbiology**, v. 127, n. 1, p. 196-207, 2019.

HUNGRIA, Marianagela; ARAUJO, Ricardo S. Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Brasília, DF: Embrapa-Serviço de Produção e Informação, 1994.

KIM, Ji Seong et al. Physiological and proteomic analysis of plant growth enhancement by the rhizobacteria *Bacillus* sp. JS. **Genes & genomics**, v. 40, n. 2, p. 129-136, 2018.

KHAN, Mohammad Sayyar et al. Isolation and characterization of plant growth-promoting endophytic bacteria *Bacillus stratosphericus* LW-03 from *Lilium wardii*. **3 Biotech**, v. 10, n. 7, p. 1-15, 2020.

KIRSOP, B. E.; DOYLE, A. Maintenance of Microorganisms and Cultured. 2 ed. Academic Press, London. cap. 4.2, p. 45-50, 1991.

KUMAR, Adarsh et al. Synergistic effect of ACC deaminase producing *Pseudomonas* sp. TR15a and siderophore producing *Bacillus aerophilus* TR15c for enhanced growth and copper accumulation in *Helianthus annuus* L. **Chemosphere**, p. 130038, 2021.

LI, Qi et al. Biochemical mechanisms of rhizospheric *Bacillus subtilis*-facilitated phytoextraction by alfalfa under cadmium stress—Microbial diversity and metabolomics analyses. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 212, p. 112016, 2021.

MADIGAN, Michael T. et al. Microbiologia de Brock-14ª Edição. Artmed Editora, 2016.

MARIANO, Rosa de Lima Ramos; SILVEIRA, EB da. Manual de práticas em fitobacteriologia. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005.

MAO, Xian-Bing et al. Optimization of carbon source and carbon/nitrogen ratio for cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. **Process biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1667-1672, 2005.

NASCIMENTO, Wellington Cristina Almeida do et al. Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por um *Bacillus sp.* termofílico. **Food Science and Technology**, v. 27, n. 2, p. 417-421, 2007.

NICOLAU, Paula Bacelar. Microrganismos e crescimento microbiano. 2014.

MOREIRA, Flávia Melo et al. Investigating the ideal mixture of soil and organic compound with *Bacillus sp.* and *Trichoderma asperellum* inoculations for optimal growth and nutrient content of banana seedlings. **South African Journal of Botany**, v. 137, p. 249-256, 2021.

MOHANRASU, K. et al. Optimization of media components and culture conditions for polyhydroxyalkanoates production by *Bacillus megaterium*. **Fuel**, v. 271, p. 117522, 2020.

OMS. Report of an a informal consultation on the detection, isolation, identification and ecology of biocontrol agents of disease vectors. Geneva: World Health Organization, 1987. 41 p.

PAULA, Bruna Marques de. Produção e caracterização de exopolissacarídeos de *Bacillus*. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal do Ceará, 2019.

RAJKUMAR, Mani et al. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. **Trends in biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 142-149, 2010

RODRIGUES, Artenisa Cerqueira et al. Resposta da co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento em plantas e *Bradyrhizobium sp.* em caupi. **Bioscience journal**, v. 28, n. 1, 2012.

ROYCHOUDHURY, Siddhartha et al. Cell growth and α -amylase production characteristics of *Bacillus amyloliquefaciens*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 33, n. 2, p. 197-206, 1989.

SILVA, Camila Rocha da. Otimização do meio de cultura a base de soro de leite e água de maceração de milho para produção de proteases por *bacillus sp* Smia-2. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, 2006.

SCHWYN, Bernhard; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical biochemistry**, v. 160, n. 1, p. 47-56, 1987

SKOOG, D.A. *et al.* Fundamentos de Química Analítica Tradução da 9ª edição Norte-Americana, Cengage learning, São Paulo, 2014.

SOUSA, Cívita Teixeira de. Produção de biomassa de *Bacillus sp.* RAB9 por fermentação submersa. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, 2013.

SWINNEN, I. A. M. et al. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. **International journal of food microbiology**, v. 94, n. 2, p. 137-159, 2004.

TEJERA-HERNÁNDEZ, Berto; ROJAS-BADÍA, Marcia M.; HEYDRICH-PÉREZ, Mayra. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. **Revista CENIC. Ciencias Biológicas**, v. 42, n. 3, p. 131-138, 2011.

TRINDADE, Vanessa Dias Rezende. Aplicação de extrato de algas e bactérias promotoras de crescimento via foliar e por inoculação de sementes em sorgo dupla aptidão. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, 2021.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. Microbiologia. In: Microbiologia. 2012.

VALDEBENITO-SANHUEZA, Rosa Maria; MELO, Itamar Soares. Métodos usados no biocontrole de fitopatógenos. Bento Gonçalves - Embrapa Uva e Vinho. 2007.

VALETTI, Lucio; IRIARTE, Liliana; FABRA, Adriana. Growth promotion of rapeseed (*Brassica napus*) associated with the inoculation of phosphate solubilizing bacteria. **Applied Soil Ecology**, v. 132, p. 1-10, 2018.

VARMA, Ajit; CHINCHOLKAR, Sudhir B. (Ed.). Microbial siderophores. **Springer Science & Business Media**, 2007.

VILLARREAL-DELGADO, María Fernanda et al. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. **Revista Mexicana de Fitopatología**, v. 36, n. 1, p. 95-130, 2018.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ. Biblioteca Universitária. Guia de normalização de trabalhos acadêmicos da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2013.

YÁNEZ-MENDIZÁBAL, V. et al. Production of the postharvest biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8 using low cost commercial products and by-products. *Biological Control*, v. 60, n. 3, p. 280-289, 2012.

ZHAO, Yingnan et al. The application of *Bacillus Megaterium* alters soil microbial community composition, bioavailability of soil phosphorus and potassium, and cucumber growth in the plastic shed system of North China. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 307, p. 107236, 2021

APÊNDICE

Pesquisa de precificação das fontes de carbono

Tabela – Estimativa de preço das fontes de carbono analisadas

Componente	Preço (R\$ 1 t)	Fontes
Dextrose	7940,66	Fornecedor 1
Sacarose	2500,00	Fornecedor 2
Sacarose Invertida	2650,00	Fornecedor 3

Curva Padrão

Gráfico – Curva padrão de massa microbiana de *Bacillus stratosphericus* CMIAT 61

