

CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *Bacillus amyloliquefaciens* BIB 0129 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NUTRIENTES

GROWTH KINETICS OF *Bacillus amyloliquefaciens* BIB 0129 IN DIFFERENT CONCENTRATIONS OF NUTRIENTS

¹João Vitor Andrade Bernardes; ²Isabel Cristina Padula Paz; ²Alexandre Martins Guimarães; ¹Ana Cláudia Chesca

¹Universidade de Uberaba. ²Biota Innovations. jvabernardes@gmail.com

RESUMO

Microrganismos têm sido amplamente utilizados para formulações de bioproductos, incluindo bactérias do gênero *Bacillus*. Dentre elas podemos citar a espécie *Bacillus amyloliquefaciens*, bactéria que é amplamente utilizada na biotecnologia e na agricultura devido à sua capacidade de solubilizar fosfato, fixar nitrato e induzir resistência sistêmica em plantas. Nas fermentações em escala industrial, o conhecimento do microrganismo é de extrema importância, desde seus aspectos morfológicos até seu comportamento, como tempo de cultivo, velocidades de crescimento, bem como sua resposta aos diferentes meios de cultivo. Este trabalho teve como objetivo estudar a cinética de fermentação de *Bacillus amyloliquefaciens* cepa BIB 0129, determinando a taxa específica de crescimento (μ_x) e o tempo de geração, utilizando duas concentrações de sacarose e extrato de levedura. Utilizando concentração de 8,4 g.L⁻¹ dos substratos no meio de cultivo, a velocidade específica de crescimento celular (μ_x) obtida foi de 0,2527 h⁻¹. O tempo de geração para a menor concentração de substratos foi de 3,14 horas. Ao final de 48 horas de fermentação, a concentração final de microrganismos foi de 1,10x10⁹ UFC.mL⁻¹. Utilizando a concentração de 18 g.L⁻¹ de substratos, a taxa específica de crescimento celular (μ_x) foi de 0,5312 h⁻¹ e o tempo de geração de 1,30 horas. A concentração celular após 48 horas foi de 2,32x 10⁹ UFC.mL⁻¹.

PALAVRAS-CHAVE: Cinética de fermentação; Extrato de levedura; Sacarose; Velocidades específicas.

ABSTRACT

Microorganisms have been widely used for formulations of bioproducts, including bacteria of *Bacillus* genus. Among them we can mention the specie *Bacillus amyloliquefaciens*, a bacterium that is widely used in biotechnology and agriculture due to its ability to solubilize phosphate, fix nitrate and induce systemic resistance in plants. In industrial-scale fermentations, knowledge of the microorganism is extremely important, from its morphological aspects to its behavior, such as cultivation time, growth speeds, as well as its response to different media of cultivation. This work aimed to study the fermentation kinetics of *Bacillus amyloliquefaciens* strain BIB 0129, determining the specific growth rate (μ_x) and

generation time, using two concentrations of sucrose and yeast extract. Using a concentration of 8.4 g.L⁻¹ of substrates in the cultivation medium, the specific cell growth rate (μ_x) obtained was 0.2527 h⁻¹. The generation time for the lowest concentration of substrates was 3.14 hours. At the end of 48 hours of fermentation, the final concentration of microorganisms was 1.10x10⁹ CFU.mL⁻¹. Using a concentration of 18 g.L⁻¹ of substrates, the specific cell growth rate (μ_x) was 0.5312 h⁻¹ and the generation time was 1.30 hours. The cell concentration after 48 hours was 2.32x 10⁹ CFU.mL⁻¹.

KEYWORDS: Fermentation kinetics; Specific speeds; Sucrose; Yeast extract.

INTRODUÇÃO

O mercado de insumos biológicos vem crescendo ano a ano no Brasil, sendo que sua utilização aumenta cerca de 10 a 15% no mundo por ano¹. Os microrganismos desempenham um papel fundamental dentro do controle biológico, especialmente bactérias do gênero *Bacillus*.

Bacillus amyloliquefaciens é uma bactéria Gram positiva, formadora de endósporos. É amplamente utilizada no setor da agricultura, incluindo o controle biológico por ser um microrganismo promotor de crescimento, indutor de resistência e ser ambientalmente seguro². Os benefícios para a planta podem ocorrer de maneira direta ou indireta. Mecanismos diretos estão relacionados com a fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de sideróforos e fitohormônios (ácido indol acético- AIA) e produção de enzimas como 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC deaminase)³.

Mecanismos indiretos são atribuídos à produção de componentes antimicrobianos em resposta a estresses bióticos⁴. *B. amyloliquefaciens* é um microrganismo produtor de componentes antimicrobianos, como o ácido cianídrico (HCN) e lipopeptídeos cílicos, como a surfactina utilizada para inibir o crescimento de patógenos^{5,6}. A interação de microrganismos com as raízes das plantas aumenta a resistência das plantas contra patógenos como outras bactérias, fungos e vírus. Esse fenômeno é denominado como resistência sistêmica induzida^{7,8}.

B. amyloliquefaciens cepa BIB 0129 é uma bactéria endofítica, isolada de um híbrido de eucalipto no município de Guaíba no Rio Grande do Sul. Ensaios

com a cepa (anteriormente chamada de EUCB 10) mostraram seu potencial solubilizador de fosfato, fixação de nitrogênio atmosférico e produção de AIA. Além disso, testes realizados com *Eucalyptus urograndis* mostram que plantas inoculadas com a cepa apresentaram um aumento de 96,2% na taxa de enraizamento⁹.

Em fermentações bacterianas existem quatro fases de crescimento: fase lag, log, estacionária e de morte. A fase log é a fase em que ocorre um aumento exponencial no número de células. A reprodução celular é mais ativa nesse período e o tempo de geração atinge um valor constante, e por isso a representação logarítmica da fase log gera uma linha reta¹⁰. É a fase em que ocorre a maior taxa de conversão de substrato em produto, como também maior oscilação nos valores de pH, aumento da temperatura, incidência de espuma e queda nos valores de oxigênio dissolvido no meio de cultura, sendo nesta fase que são realizados os estudos de cinética de crescimento.

O estudo cinético de um processo fermentativo consiste na análise da evolução dos valores de concentração de um ou mais componentes no sistema de cultivo, em função do tempo de fermentação. Podem ser analisados a concentração do microrganismo (X), produtos do metabolismo (P) e os nutrientes ou substratos (S) que compõem o meio de cultura¹¹.

O Conhecimento de dados da cinética da fermentação possibilita realizar a estimativa de produtividade das fermentações, ampliação para escalas industriais e comparações entre diferentes condições de cultivo (pH, temperatura e concentração de substratos).

Em ambientes industriais, a viabilização técnico-econômica dos insumos e matérias primas são características que possuem grande influência na escolha de métodos e padrões operacionais, sendo assim o presente trabalho tem como objetivo estudar a cinética de crescimento de *Bacillus amyloliquefasciens* BIB 0129 em duas concentrações diferentes de sacarose e extrato de levedura.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foi utilizada a bactéria *B. amyloliquefaciens* cepa BIB 0129. As fermentações foram feitas em escala laboratorial em Erlenmeyers de 1L e 5L de volume.

Foram utilizados dois tratamentos, com 3 repetições: o primeiro com a concentração de 8,4 g.L⁻¹ de sacarose e extrato de levedura no meio de cultura e o segundo com concentração de 18g.L⁻¹ dos mesmos substratos. A sacarose foi obtida a partir da utilização de açúcar cristal.

Para condução da fermentação líquida foi utilizado um meio base, com a variação da concentração de açúcar e extrato de levedura: 8,4 g.L⁻¹ e 18 g.L⁻¹.

Os plaqueamentos realizados para quantificação da população microbiana, foram feitos em meio LBA (Luria Bertani).

Foram selecionadas 16 colônias típicas de *B. amyloliquefaciens* e estas transferidas para um Erlemeyer de 1L contendo 400mL de meio, previamente esterilizado a 121°C por 20 minutos. Após inoculada, a suspensão foi colocada em uma incubadora com agitação orbital, a 30°C e 150 rpm, por 24h. As colônias foram obtidas a partir de repiques utilizando a técnica de estriamento por esgotamento.

Após 24 horas, 200mL da suspensão foram transferidos para um Erlenmeyer de 5L contendo 1,8L de MPB, totalizando 2L após a inoculação (10% de inóculo). O momento da inoculação do Erlenmeyer de 2L foi considerado o tempo zero da fermentação (t_0). O Erlenmeyer foi colocado em agitação no agitador orbital, a 30°C e 150 rpm.

A partir do tempo zero, a cada 2 horas foram coletadas amostras para determinação da absorbância e a concentração celular do caldo fermentativo. A absorbância da amostra foi medida em um espectrofotômetro da marca Kasvi®, utilizando-se o comprimento de onda de 600nm. O meio de cultura estéril foi utilizado para a leitura do branco. A quantificação da população bacteriana foi feita a partir da metodologia de diluição seriada¹².

A cinética de crescimento foi feita de acordo com as equações diferenciais e modelos integralizados¹¹. Devido ao fato de que a concentração microbiana X aumenta durante uma fermentação, é mais lógico analisar os valores das velocidades instantâneas com relação a concentração microbiana, conforme a equação diferencial ordinária:

$$\mu_X = \frac{1}{X} * \frac{dX}{dt}$$

A partir do modelo integralizado obtém-se a equação:

$$\ln X = \mu_X * t + \ln x_0$$

Comparando-se com a equação de 1º grau, temos que:

$$\begin{aligned} y &= \ln X \\ a &= \mu_X) \\ b &= \ln X_0 \end{aligned}$$

Ao lado da velocidade específica μ_X , a fase exponencial também é caracterizada frequentemente pelo tempo de geração t_g , que é o intervalo de tempo necessário para dobrar o valor da concentração celular¹¹, dado pela seguinte expressão:

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu_X}$$

RESULTADOS

Com as médias aritméticas resultantes dos valores de Abs₆₀₀ e UFC.mL⁻¹ em função do tempo foram geradas as curvas de crescimento para cada um dos tratamentos. A partir das curvas de crescimento de *B. amyloliquefaciens* BIB 0129 foram iniciados os estudos de cinética.

A curva de crescimento de *B. amyloliquefaciens* cepa BIB 0129 no meio com a concentração de 8,4 g.L⁻¹ de sacarose e extrato de levedura pode ser observada na Figura 3a.

Com a curva de crescimento do microrganismo pode ser observada uma queda na população microbiana entre o tempo 0 e 2. Essa morte de microrganismos

pode ter sido ocasionada pela não adaptação de células menos resistentes ao meio de cultura após a transferência. A fase log se estendeu por aproximadamente 12 horas, entre o tempo 2 e 14, formando uma reta, evidenciando o crescimento microbiano neste intervalo. Do tempo 14 ao tempo 48, houve uma estabilização dos valores de UFC.mL^{-1} , e embora os valores tenham tido uma variação, a população microbiana se manteve no mesmo logaritmo (10^9), caindo em alguns momentos para 10^8 , porém em valores próximos de 10^9 . Não foi identificada uma fase de declínio na curva de crescimento, pois microrganismos pertencentes ao gênero *Bacillus*, iniciam o processo de diferenciação celular para formação do esporo após esgotamento de nutrientes, não havendo, portanto, uma fase de morte. Ao final das 48 horas de fermentação a concentração celular final foi de $1,10 \times 10^9 \text{ UFC.mL}^{-1}$.

A partir da curva resultante entre a absorbância a 600nm e o tempo podemos observar o aumento crescente da absorbância ao longo do tempo, tendo a fase log se encerrando por volta das 14 horas de cultivo, coincidindo com os dados obtidos de UFC.mL^{-1} . Analisando os valores da absorbância e comparando-os com os valores de UFC.mL^{-1} , pode ser observado que entre o início da fermentação e as 2 horas de cultivo, há uma redução na concentração microbiana embora tenha ocorrido um aumento na absorbância do meio.

Esse resultado dá um indicativo de que a leitura da turbidez do meio não mostra o número de células viáveis disponíveis no cultivo.

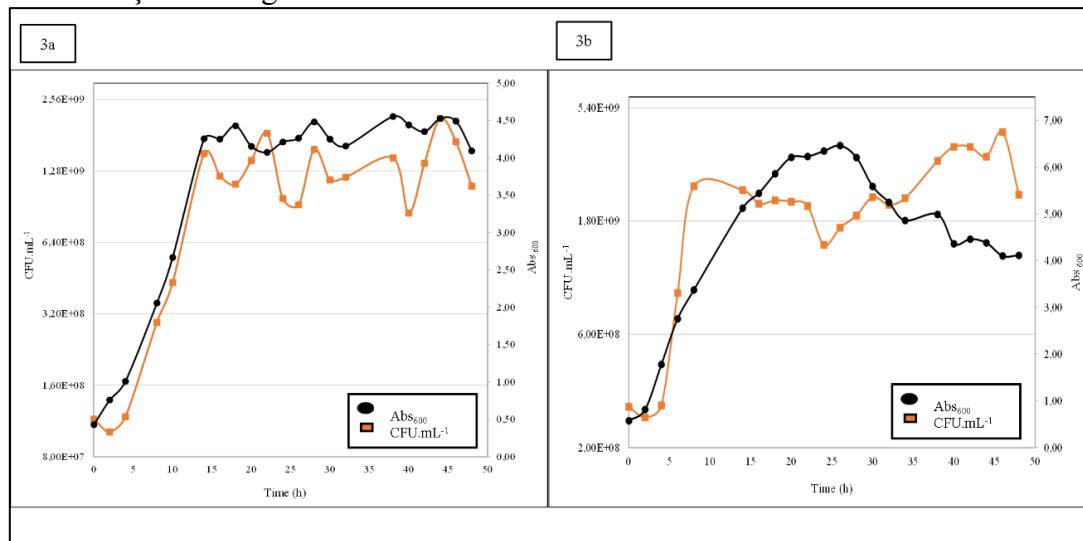
As médias dos valores de absorbância e UFC.mL^{-1} resultantes para a concentração de 18g.L^{-1} dos substratos foram utilizadas para gerar as curvas de crescimento mostradas na figura 3b.

Ao se adicionar mais substratos ao meio de cultura, foi observado um crescimento mais rápido do microrganismo, com uma pequena redução da concentração microbiana na fase lag, entre os tempos 0h e 2h de cultivo. A partir da quarta hora de fermentação a bactéria *B. amyloliquefasciens* BIB0129 iniciou a fase exponencial de crescimento, que se estendeu até a oitava hora da fermentação, totalizando 4 horas de fase logarítmica, entrando a partir deste momento na fase estacionária. Ao final do experimento a concentração de células obtidas foi de 2,32

$\times 10^9$ UFC.mL $^{-1}$, não obtendo uma diferença significativa em relação a concentração de 8,4 g.L $^{-1}$ dos substratos.

A curva de crescimento Tempo (h) x Abs₆₀₀ para a concentração de 18 g.L $^{-1}$ dos substratos, mostrou um aumento constante dos valores de absorbância até as 26 horas de cultivo, seguido de uma queda da Abs₆₀₀ até as 48 horas. Ao se aumentar a concentração de substratos no meio de cultura, *B. amyloliquefasciens* cepa BIB 0129 apresentou um crescimento irregular se comparado a curva de crescimento em que foi utilizada uma concentração menor de substratos no meio de cultura, uma vez que, o aumento constante da absorbância até as 26 horas não coincidiu com o crescimento celular observado na figura 3b, em que a concentração máxima resultante da fase log foi obtida na oitava hora de cultivo.

Figura 3. a) Tempo (h) x Abs₆₀₀ e Tempo (h) x UFC.mL $^{-1}$ para a concentração de 8,4 g.L $^{-1}$ dos substratos. b) Tempo (h) x Abs₆₀₀ e Tempo (h) x UFC.mL $^{-1}$ para a concentração de 18 g.L $^{-1}$ dos substratos.



Os dados de cinética para as concentrações de sacarose e extrato de levedura estão contidos na Tabela 1.

Tabela 1. Valores de cinética de crescimento de *B. amyloliquefasciens* BIB029

Concentração (Sacarose e extrato de levedura)	Velocidade específica (μ) (h^{-1})	Tempo de geração (h)
8,4 g/L	0,2527	3,14
18 g/L	0,5312	1,30

Ambos os parâmetros cinéticos, de velocidade específica de crescimento celular (μ_x) e tempo de geração (t_g) foram maiores quando a concentração dos substratos no meio de cultura estava maior.

Para a concentração de 8,4 g.L⁻¹ dos substratos foi concluído que a fase log de crescimento se iniciou por volta da 4^a hora de cultivo e se estendeu até a 14^a hora de cultivo totalizando 10 horas de fase log. A partir da equação da reta, podemos concluir que a velocidade de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) é 0,25 h⁻¹. Com o valor de $\mu_{\text{máx}}$ e a partir das equações diferenciais, temos que o tempo de geração de *B. amyloliquefaciens* para o tratamento de menor concentração foi de 3,14 horas.

Por outro lado, quando se aumentou a concentração de substratos no meio de cultura (18 g.L⁻¹), *B. amyloliquefaciens* BIB0129 também iniciou a fase log de crescimento celular após 4 horas de fermentação, porém chegou ao fim da fase log após 8 horas de cultivo, atingindo a concentração celular de $2,52 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹. A velocidade de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) na concentração maior foi de 0,53 h⁻¹, e o tempo de geração de 1,30 horas.

DISCUSSÃO

Ao final das 48 horas de fermentação a concentração celular final foi de $1,10 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹ para a concentração de 8,4 g.L⁻¹ dos substratos e $2,32 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹ para a concentração de 18 g.L⁻¹. Resultados próximos foram obtidos por Lima (2017)¹³, que em experimento com *B. amyloliquefaciens* IT45 realizado em Erlemeyer de 2L, com 200 mL de meio de cultura conseguiu após 48 horas de fermentação, concentrações celulares de $1,4 \times 10^9$ UFC/mL. Estudo semelhante,

utilizando Erlemeyers de 500 mL com 100 mL de meio de cultura, em temperatura de 30°C e 160 rpm em shaker, chegou a uma concentração celular de $1,16 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹ utilizando as cepas MT45 e X27 de *B. amyloliquefciens*¹⁴.

Ao se utilizar o meio de cultura com a concentração de 18g.L⁻¹ dos substratos *B. amyloliquefciens* BIB 0129 apresentou uma curva irregular de crescimento, em que os valores de UFC.mL⁻¹ não acompanharam os valores de absorbância. As quedas dos valores de absorbância do cultivo após as 26 horas podem estar relacionadas ao fim da fase exponencial de crescimento, em que as células se encontram mais alongadas para que ocorra a divisão celular. Durante a divisão celular, células de *B. subtilis* dobram de massa para na sequência se dividirem ao meio formando 2 células filhas de tamanho equivalente. O meio de cultura também exerce relação com o tamanho das células¹⁵. Células de *Salmonella* apresentavam tamanho duas vezes maior quando crescidas em meio rico em nutrientes, do que células cultivadas em um meio pobre em nutrientes^{16,17}. O mesmo comportamento de controle dependente do tamanho das células e disponibilidade de nutrientes também foi observado em *B. subtilis*^{18,19}. Valores elevados de absorbância podem ter sido observados na fase de crescimento exponencial em decorrência da maior disponibilidade de substratos nesta etapa. O esgotamento de nutrientes após a fase logarítmica pode ter impactado na redução do tamanho celular, acarretando na queda dos valores de absorbância. Além disso, o esgotamento de nutriente é um sinalizador para as células vegetativas de *Bacillus* para o início do processo de esporulação, onde há uma perda citosplasmática gradual até a total lise celular e liberação do esporo.

Em experimentos com *Bacillus thuringiensis* var *galleriae* estudaram os efeitos da concentração de glicose e extrato de levedura no crescimento e esporulação da espécie²⁰. Variando as concentrações de glicose entre 3,4 g.L⁻¹ e 34 g.L⁻¹, e extrato de levedura entre 1 g.L⁻¹ e 20 g.L⁻¹, os autores observaram que altas concentrações de glicose no meio de cultura resultaram em uma população heterogênea de células vegetativas, e altas concentrações de extrato de levedura prejudicaram a síntese de componentes do esporo, dificultando a esporulação.

As equações cinéticas que indicam como as variáveis do experimento interferem nas velocidades de crescimento, morte celular, geração de produtos e também consumo de substratos, sendo necessário tratar os dados experimentais, desprezando os pontos que apresentaram erros grosseiros²¹. Dessa maneira, foram excluídos os pontos experimentais em que os valores de UFC.mL⁻¹ destoaram do restante.

A cinética de crescimento de *Bacillus pumilus* cepa CCIBP-C5, em diferentes meios de cultivo a base de farinha de soja como fonte de nitrogênio e melaço de cana e quitina coloidal como fontes de carbono²². Foram obtidos tempos de geração de 1,94 horas para o meio a base de farinha de soja e quitina e 2,67 horas para o meio utilizando farinha de soja e melaço de cana.

Em diferentes meios de cultura para otimizar o crescimento e produção de celulases de *Bacillus licheniformis* BCLLNF-01, foi observado que em meio BLM + 0,5% CMC, *B. licheniformis* apresentou uma velocidade de crescimento de 0,06 h⁻¹, por outro lado, nos meios enriquecidos com glicose e caseína as taxas de crescimento foram maiores²³. Nos meios BLM + 1% de glicose e BLM + 1% de glicose + 1% de caseína *B. licheniformis* apresentou $\mu = 0,11 \text{ h}^{-1}$.

A natureza e as características dos substratos utilizados no meio de cultura interferem no metabolismo do microrganismo, incluindo a expressão de enzimas e metabólitos²⁰. O fluxo de metabólitos possui uma relação direta com a concentração de substratos.

Diferentes concentrações de substrato interferem de várias formas na qualidade e rendimento de uma fermentação. Quando a concentração de sacarose e extrato de levedura foi aumentada para 18g.L⁻¹, houve um aumento na velocidade específica de crescimento (μ_x) e no tempo de geração (tg), porém sem grande interferência na concentração final de células, que se mantiveram na ordem de 10⁹ UFC.mL⁻¹ em ambos os tratamentos. Maiores velocidades de crescimento podem impactar em fermentações mais rápidas, acarretando em uma maior competitividade do microrganismo frente a outras espécies além de aumentar o rendimento de produção em um ambiente industrial. Estudos posteriores serão

realizados para avaliação do comportamento do microrganismo após as 48 horas de fermentação, identificando a influência das concentrações dos substratos na esporulação da cepa.

CONCLUSÃO

Diferentes concentrações de substrato interferem de várias formas na qualidade e rendimento de uma fermentação. Quando a concentração de sacarose e extrato de levedura foi aumentada para 18g/L, houve um aumento na velocidade específica de crescimento (μ_x) e velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), porém sem grande interferência na concentração final de células, que se mantiveram na ordem de 10^9 UFC.mL⁻¹ em ambos os tratamentos. Maiores velocidades de crescimento podem impactar em fermentações mais rápidas, acarretando em uma maior competitividade do microrganismo frente a outras espécies além de aumentar o rendimento de produção em um ambiente industrial.

AGRADECIMENTOS

À CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG pelo suporte dado ao desenvolvimento dessa dissertação (Processos: MPR-01119-16; APQ-01221-24).

REFERÊNCIAS

1. Parra JRP. Controle biológico na agricultura brasileira. Entomol. Commun., 1, 2019 <https://doi.org/10.37486/2675-1305.ec01002>.
2. Kashyap BK, Solanki MK, Pandey AK, Prabha S, Kumar P, Kumari B. *Bacillus* as plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A promising green agriculture technology. In Plant Health under Biotic Stress; Nature. Singapore Pte Ltd.: Singapore, 2019; pp. 219–236 https://doi.org/10.1007/978-981-13-6040-4_11.
3. Ngalimat MS, Yahaya RSR, Baharudin MMA, Yaminudin SM, Karin M, Ahmad AS, Sabri S. A review on the biotechnological applications of the operation group *Bacillus amyloliquefaciens*. Microorganisms 2021, 9, 614. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030614>.

4. Kumar A, Kumar R, Kumari M, Goldar S. Enhancement of plant growth by using PGPR for a sustainable agriculture: A review. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 2020, 9, 152–165. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.902.019>.
5. Chowdhury SP, Uhl J, Grosch R, Alquéres S, Pittroff S, Dietel K, Schmitt-Kopplin P, Borriss R, Hartmann A. Cyclic lipopeptides of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* colonizing the lettuce rhizosphere enhance plant defense responses toward the bottom rot pathogen *Rhizoctonia solani*. *Mol. Plant-microbe. Interact.* 2015, 28, 984–995. <https://doi.org/10.1094/MPMI-03-15-0066-R>.
6. Li B, Li Q, Xu Z, Zhang N, Shen Q, Zhang R. Responses of beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to different soilborne fungal pathogens through the alteration of antifungal compounds production. *Front. Microbiol.* 2014, 5, 636. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00636>.
7. Fan B, Wang C, Song X, Ding X, Wu L, Wu H, Gao X, Borriss R. *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The Gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. *Front. Microbiol.* 2018, 9, 2491. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02491>.
8. Dunlap CA, Bowman MJ, Rooney AP. Iturinic lipopeptide diversity in the *Bacillus subtilis* species group—Important antifungals for plant disease biocontrol applications. *Front. Microbiol.* 2019, 10, 1794. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01794>.
9. Paz ICP, Santin RCM, Guimarães AM, Rosa OPP, Dias ACF, Quecine MC, Azevedo JL, Matsumura ATS. Eucalyptus growth promotion by endophytic *Bacillus* spp. *Genet. Mol. Res.* 2012, 11:3711–3720. doi: 10.4238/2012.August.17.9. <http://dx.doi.org/10.4238/2012.August.17.9>.
10. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiologia*. 10 Porto Alegre: ArtMed, 2012, 934 p.
11. Hiss H. 2001 Cinética de processos fermentativos. In: Schmidell W, Lima UA, Aquarone E, Borzani WR. *Biotecnologia Industrial*. São Paulo: Edgard Blücher. p. 93-122.
12. Bettoli W, Morandi MAB, Lucon CMM. Controle de qualidade e conformidade de produtos e fermentados à base de *Bacillus* spp.: proposta metodológica. 2022. Embrapa, Jaguariúna. <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1146275>.

13. Lima FA. Produção de biossurfactantes por *Bacillus amyloliquefaciens* IT45. 2017. 97 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017. <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2017.62>.
14. Yan Z, Qun W, Yan C. Production of surfactin from waste distiller's grains by co-culture fermentation of two *Bacillus amyloliquefaciens* strains. *Bioresour. Technol.*, v. 235, p. 96-103, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.090>.
15. Chien AC, Hill NS, Levin PA. Cell Size Control in Bacteria. *Curr. Biol.* 22, R340–R349, May 8, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2012.02.032>.
16. Schaechter M, Maaløe O, Kjeldgaard NO. Dependency on medium and temperature of cell size and chemical composition during balanced growth of *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.* 19, 592–606, 1958.
17. Kjeldgaard NO, Maaløe O, Schaechter M. The transition between different physiological states during balanced growth of *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.* 19, 607–616, 1958.
18. Pierucci O, Helmstetter CE, Rickert M, Weinberger M, Leonard AC. Overexpression of the dnaA gene in *Escherichia coli* B/r: chromosome and minichromosome replication in the presence of rifampin. *J. Bacteriol.* 169, 1871–1877, 1987.
19. Sargent MG. Control of cell length in *Bacillus subtilis*. *J.Bacteriol.* 123, 7–19, 1975.
20. Anderson RKI, Jayaraman K. Influence of carbon and nitrogen sources on the growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* var *galleriae* for biopesticide production. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 17 (3) 225-231, 2003.
21. Morais ER, Bonomi A. 2021. Modelagem matemática e simulação de bioprocessos. In: Alterthum F, Schmidell W, Lima UA, Moraes IO. *Biotecnologia Industrial* vol. 2. São Paulo: Blucher. p. 171-240.
22. Martín MC, Rodríguez ER, Suárez MA, Rodríguez E, Pichardo T, Roque B, Capó YA. Efecto de diferentes medios de cultivo en el crecimiento y la actividad antifúngica de *Bacillus pumilus* CCIBP-C5. *Biotecnología Vegetal*. Vol. 21. No. 2: 94-102, 2021.
23. Silva RN, Melo LFA, Finkler CLL. Optimization of the cultivation conditions of *Bacillus licheniformis* BCLLNF-01 for cellulase production. *Biotechnol. Rep.* 29, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00599>.