

JÉSSICA DA SILVA FÉLIX

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPOPEPTÍDEOS POR *Bacillus velezensis*
VISANDO AO CONTROLE DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Marcos Rogério Tótola

**Viçosa - Minas Gerais
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

F316o
2023
Félix, Jéssica da Silva, 1996-
Otimização da produção de lipopeptídeos por *Bacillus
velezensis* visando ao controle de fungos fitopatogênicos /
Jéssica da Silva Félix. – Viçosa, MG, 2023.
1 dissertação eletrônica (56 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Marcos Rogério Tótola.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Microbiologia, 2023.
Referências bibliográficas: f. 51-56.
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.103>
Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Bacillus velezensis*. 2. Plantas - Doenças e pragas -
Controle biológico. 3. Fungos fitopatogênicos - Controle
biológico. I. Tótola, Marcos Rogério, 1965-. II. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 579.362


Jéssica da Silva Félix

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPOPEPTÍDEOS POR *Bacillus velezensis*
VISANDO AO CONTROLE DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS**

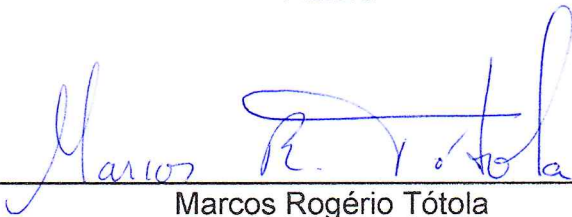
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 13 de setembro de 2023.

Assentimento:



Jéssica da Silva Félix
Autora



Marcos Rogério Tótola
Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar forças, saúde e iluminar meus caminhos.

A minha família, especialmente a minha mãe Maria das Graças, meu pai Jesus e meus irmãos Guilherme e Joaquim, que me apoiaram nas minhas decisões e nos momentos difíceis.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realizar o mestrado.

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Dr. Marcos Rogério Tótola, por ter aceitado me orientar e pelos ensinamentos passados ao longo deste trabalho.

À Michelle por toda ajuda, conversas e orientação.

Ao técnico Alex Gazolla de Castro, pelo suporte técnico e intelectual e por sempre estar disponível a me ajudar sempre que precisei.

Ao professor Dr. Paulo Roberto Cecon, pela ajuda no delineamento experimental e nas análises estatísticas.

À minha querida amiga Lutécia, pelo incentivo, apoio, ajuda e por sempre estar comigo em todos os momentos da minha jornada acadêmica.

A todos os amigos do LBBMA que sempre estiveram comigo nesses últimos anos, pelo apoio, incentivo, pelos cafés da tarde e comemorações de aniversários. Em especial à Mariana, à Tati, à Camila, ao Caio, à Luciana, à Maria Júlia, à Lívia, o Thiago e ao Jomar pela amizade fora e dentro do laboratório.

Aos amigos do programa de Pós-Graduação Matheus, Bruna e Yam pela amizade e apoio.

A todos que contribuíram de algum modo para que eu chegasse até aqui.

RESUMO

Félix, Jéssica da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2023. **Otimização da produção de lipopeptídeos por *Bacillus velezensis* visando ao controle de fungos fitopatogênicos.** Orientador: Marcos Rogério Tótola.

O gênero *Bacillus* destaca-se como um dos mais empregados no biocontrole de doenças de plantas. Esses microrganismos são encontrados em diversos ambientes, sendo reconhecidos por sua capacidade de produzir lipopeptídeos. Essas moléculas são caracterizadas como biossurfactantes de baixo peso molecular e exibem atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral, cicatrizante e antitumoral. Os lipopeptídeos se dividem em três famílias principais: surfactina, iturina e fengicina, sendo que as duas últimas apresentam elevada atividade antifúngica. Este trabalho teve como objetivo definir condições de cultivo adequadas para a produção de lipopeptídeos com atividade antifúngica por três isolados de *Bacillus velezensis* (LBBMA TR59II, LBBMA TR47II e LBBMA AP01), a fim de promover o controle de fungos fitopatogênicos. Para isso, realizou-se a otimização da produção de lipopeptídeos dos isolados em três diferentes meios de cultura (Meio Farelo de Soja adicionado de açúcar cristal, Meio 523 e Meio Mineral). Posteriormente, diferentes combinações de pH e temperatura foram investigadas. O fungo fitopatogênico modelo adotado no trabalho foi o *Colletotrichum truncatum* isolado UCBV258. Os estudos de otimização foram conduzidos utilizando-se o método de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). O meio de cultura Meio 523 propiciou as maiores produções de lipopeptídeos para *B. velezensis* LBBMA TR59II e LBBMA TR47II; para *B. velezensis* LBBMA AP01, as maiores produções de lipopeptídeos foram obtidas em Meio Mineral. Ao se considerar o custo dos ingredientes para a produção dos meios de cultivo, o Meio Farelo de Soja se mostrou o mais indicado para a produção de lipopeptídeos com ação fungicida para todos os isolados de *B. velezensis* estudados. As combinações das variáveis concentração de farelo de soja, de açúcar cristal, pH e temperatura propiciaram ganhos de eficiência de produção de lipopeptídeos (medida pela razão entre a produção de extrato bruto de lipopeptídeos liofilizado – EBEL - e a concentração inibitória mínima dos extratos brutos obtidos em cada condição) de até 59 vezes para o isolado *B. velezensis* LBBMA TR59II, 17 vezes para *B. velezensis* LBBMA TR47II 16 vezes para *B. velezensis* LBBMA AP01. Os ganhos de eficiência reportados, juntamente com o baixo custo dos ingredientes empregados no preparo dos meios de cultivo, têm o potencial de reduzir significativamente os custos de

produção de bioinsumos à base de *Bacillus* spp. visando ao controle de patógenos agrícolas.

Palavras-chave: *Bacillus velezensis*. Lipopeptídeos. Surfactina. Fengicina. Iturina. *Colletotrichum truncatum*. Controle biológico.

ABSTRACT

Félix, Jéssica da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2023. **Optimization of the production of lipopeptides by *Bacillus velezensis* aiming at the control of phytopathogenic fungi**. Adviser: Marcos Rogério Tótola.

The genus *Bacillus* stands out as one of the most employed in the biocontrol of plant diseases. These microorganisms are found in various environments, recognized for their ability to produce lipopeptides. These molecules are characterized as low molecular weight biosurfactants and exhibits antimicrobial, antifungal, antiviral, wound-healing, and antitumor activities. Lipopeptides are divided into three main families: surfactin, iturin, and fengycin, with the latter two showing high antifungal activity. This study aimed to define suitable cultivation conditions for the production of antifungal lipopeptides by three isolates of *Bacillus velezensis* (LBBMA TR59II, LBBMA TR47II, and LBBMA AP01) to promote the control of phytopathogenic fungi. Optimization of lipopeptide production from the isolates was carried out in three different culture media (Soybean Meal Medium added with crystalline sugar, Medium 523, and Mineral Medium). Subsequently, different combinations of pH and temperature were investigated. The model phytopathogenic fungus adopted in the study was *Colletotrichum truncatum* isolate UCBC258. Optimization studies were conducted using the Central Composite Rotatable Design (CCRD) method. Medium 523 provided the highest lipopeptide productions for *B. velezensis* LBBMA TR59II and LBBMA TR47II; for *B. velezensis* LBBMA AP01, the highest lipopeptide productions was obtained in Mineral Medium. Considering the cost of ingredients for media production, Soybean Meal Medium proved to be more suitable for the production of lipopeptide with fungicidal activity for all isolates of *B. velezensis*. By managing the soybean meal concentration, sugar concentration, pH and temperature, an increase in antifungal lipopeptide production (measured by the ratio between the production of lyophilized crude lipopeptide extract - EBEL - and the minimum inhibitory concentration of crude extracts obtained each condition) of up to 59 times for *B. velezensis* LBBMA TR59II, 17 times for *B. velezensis* LBBMA TR47II, and 16 times for *B. velezensis* LBBMA AP01 was obtained. The reported efficiency gains, combined with the low cost of ingredients used in media preparation, have the potential to significantly reduce the production costs of *Bacillus* spp. based bioinputs for control of agricultural pathogens.

Keywords: *Bacillus velezensis*. Lipopeptides. Surfactin. Fengycin. Iturin.
Colletotrichum truncatum. Biological control.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Superfície de resposta do EBEL (g L^{-1}) em função da concentração de farelo de soja (g L^{-1}) e de açúcar cristal comercial (g L^{-1}), após 72 horas de cultivo dos isolados de <i>B. velezensis</i> TR59II, TR47II e AP01.....	35
Figura 2- Superfície de resposta do diâmetro do halo (cm) em função da concentração de farelo de soja (g L^{-1}) e de açúcar cristal comercial (g L^{-1}), após 72 horas de cultivo dos isolados de <i>B. velezensis</i> TR59II, TR47II e AP01.	36
Figura 3 - Superfície de resposta da concentração inibitória mínima (mg L^{-1} de EBEL) em função da concentração de farelo de soja (g L^{-1}) e de açúcar cristal comercial (g L^{-1}), após 144 horas de incubação da microplaca de 96 poços dos isolados de <i>B. velezensis</i> TR59II, TR47II e AP01.....	37
Figura 4 - Superfície de resposta do rendimento de EBEL (g L^{-1}) em função das faixas de pH e temperatura ($^{\circ}\text{C}$), após 72 horas de cultivo dos isolados de <i>B. velezensis</i> TR59II em meio 7, TR59II em meio 11, TR47II em meio 3 e AP01 em meio 11.....	40
Figura 5 - Superfície de resposta do diâmetro do halo de espalhamento de óleo (cm) em função das faixas de pH e temperatura ($^{\circ}\text{C}$), após 72 horas de cultivo de três diferentes isolados <i>B. velezensis</i> TR59II em meio 7, TR59II em meio 11, TR47II em meio 3 e AP01 em meio 1.....	42
Figura 6 - Superfície de resposta da concentração inibitória mínima (mg L^{-1} de EBEL) em função das faixas de pH e temperatura ($^{\circ}\text{C}$), após 72 horas de cultivo dos isolados de <i>B. velezensis</i> TR59II em meio 7, TR59II em meio 11, TR47II em meio 3 e AP01 em meio 11.	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Níveis das variáveis independentes do Delineamento Composto Central Rotacional	23
Tabela 2- Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional para os dois ensaios	24
Tabela 3- Crescimento do isolado <i>B. velezensis</i> LBBMA TR59II (avaliado por meio da Densidade óptica a 600 nm) nos meios de cultivo 523, Meio Mineral e Meio Farelo de Soja	26
Tabela 4- Crescimento do isolado <i>B. velezensis</i> LBBMA TR47II (avaliado por meio da Densidade óptica a 600 nm) nos meios de cultivo 523, Meio Mineral e Meio Farelo de Soja	26
Tabela 5- Crescimento do isolado <i>B. velezensis</i> LBBMA AP01 (avaliado por meio da Densidade óptica a 600 nm) nos meios de cultivo 523, Meio Mineral e Meio Farelo de Soja	26
Tabela 6- Diâmetro do halo do espalhamento de óleo obtido com os sobrenadantes de <i>B. velezensis</i> LBBMA TR59II	27
Tabela 7- Diâmetro do halo do espalhamento de óleo obtido com os sobrenadantes de <i>B. velezensis</i> LBBMA TR47II	29
Tabela 8- Diâmetro do halo do espalhamento de óleo obtido com os sobrenadantes de <i>B. velezensis</i> LBBMA AP01	28
Tabela 9- Valores médios do rendimento do extrato bruto enriquecido em lipopeptídeos (EBEL), após 72 horas do cultivo de <i>B. velezensis</i> LBBMA TR59II, LBBMA TR47II e LBBMA AP01 em diferentes meios de cultura.....	29
Tabela 10- Concentração inibitória mínima dos EBEL de <i>B. velezensis</i> LBBMA TR59II, LBBMA TR47II e LBBMA AP01, obtidos em diferentes meios de cultivo, contra o fitopatógeno <i>Colletotrichum truncatum</i>	33
Tabela 11- Valores das variáveis respostas CIM e rendimento de EBEL (mg L^{-1}), razão das duas variáveis respostas, preço dos meios de cultura (por litro) e a razão das variáveis e o preço dos meios de cultura	39
Tabela 12- Matriz experimental do DCCR para investigar a combinação das fontes de carbono, farelo de soja e açúcar cristal comercial (Ensaio 1) e suas variáveis respostas obtidas dos isolados <i>B. velezensis</i> LBBMA TR59II, TR47II e AP01	33
Tabela 13- Matriz experimental do DCCR para se investigar o efeito da combinação das fontes de carbono farelo de soja e açúcar cristal comercial (Ensaio 1) sobre as variáveis resposta rendimento de EBEL, diâmetro de espalhamento de óleo, CIM e razão EBEL/CIM para os isolados de <i>B. velezensis</i> TR59II, TR47II e AP01.....	39
Tabela 14- Matriz experimental do DCCR para se investigar o efeito das combinações de pH e temperatura (Ensaio 2) sobre as variáveis resposta rendimento de EBEL, diâmetro de espalhamento de óleo, CIM e razão EBEL/CIM para os isolados de <i>B. velezensis</i> TR59II, TR47II e AP01.....	45
Tabela 15- Eficiência de produção de lipopeptídeos com atividade fungicida por <i>B. velezensis</i> LBBMA TR59II no meio original (30 g L^{-1} farelo de soja, pH 6,5 e temperatura de incubação de $30 \text{ }^\circ\text{C}$) e no meio selecionado M7 (55 g L^{-1} farelo de soja e 35 g L^{-1} açúcar cristal comercial, pH 5,8 e temperatura de incubação de $31,8 \text{ }^\circ\text{C}$).....	46
Tabela 16- Eficiência de produção de lipopeptídeos com atividade fungicida por <i>B.</i>	

velezensis LBBMA TR59II no meio original (30 g L⁻¹ farelo de soja, pH 6,5 e temperatura de incubação de 30 °C) e no meio selecionado M11 (100 g L⁻¹ farelo de soja e 35 g L⁻¹ açúcar cristal comercial, pH 7,2 e temperatura de incubação de 31,8 °C)..... 47

Tabela 17- Eficiência de produção de lipopeptídeos com atividade fungicida por *B. velezensis* LBBMA TR47II no meio original (30 g L⁻¹ farelo de soja, pH 6,5 e temperatura de incubação de 30 °C) e no meio selecionado M3 (87 g L⁻¹ farelo de soja e 17,3 g L⁻¹ açúcar cristal comercial, pH 6,5 e temperatura de incubação de 29 °C).

.....47

Tabela 18- Eficiência de produção de lipopeptídeos com atividade fungicida por *B. velezensis* LBBMA AP01 no meio original (30 g L⁻¹ farelo de soja, pH 6,5 e temperatura de incubação de 30 °C) e no meio selecionado (100 g L⁻¹ farelo de soja e 35 g L⁻¹ açúcar cristal comercial, pH 7,2 e temperatura de incubação de 31,8 °C) 47

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVO	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 Controle Biológico	14
3.2 <i>Bacillus velezensis</i> como agente de controle biológico	15
3.3 Lipopeptídeos.....	16
3.4 <i>Colletotrichum truncatum</i>	18
3.5 Fatores que influenciam a produção de lipopeptídeos	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1 Microrganismos	19
4.2 Produção de lipopeptídeos em diferentes meios de cultura	20
4.2.1 Métodos de cultivo, recuperação e preservação de extrato enriquecido em lipopeptídeos.....	20
4.2.2 Ensaio de inibição da germinação de esporos e crescimento micelial de <i>C. truncatum</i>	21
4.2.3 Análises estatísticas.....	22
4.3 Adequação de parâmetros de fermentação visando à obtenção de aumento de rendimento da produção de lipopeptídeos	22
4.3.1 Análises estatísticas.....	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO:	25
5.1 Produção de lipopeptídeos em diferentes meios de cultura	25
5.2 Produção de lipopeptídeos em diferentes meios de cultura e atividade antifúngica contra <i>C. truncatum</i>	28
5.3 Otimização da produção de lipopeptídeos pela Metodologia de Superfície de Resposta	32
6. CONCLUSÃO	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores agrícolas e exportadores de alimentos do mundo. Em 2020, foi o quarto maior produtor agrícola de grãos como arroz, cevada, milho, soja e trigo (Embrapa, 2020). A grande extensão de áreas cultivadas, a adoção de monoculturas e o clima quente e úmido favorecem a incidência de espécies invasoras, insetos-praga e doenças, o que resulta em uma elevada demanda de defensivos agrícolas para o seu controle. A aplicação desses produtos químicos em larga escala para se obterem altas produtividades resulta em problemas de saúde pública, danos à natureza, altos custos de produção, redução da fertilidade do solo e seleção de pragas e patógenos resistentes, o que acarreta no uso de doses cada vez maiores de agrotóxicos para se garantir uma produção econômica (Miranda et al., 2007; Veiga et al., 2006). Em face dessa realidade, há uma grande ênfase ao desenvolvimento de novas pesquisas que viabilizem a utilização de novos métodos para o controle de pragas e fitopatógenos.

Dentre os microrganismos fitopatogênicos, os fungos se destacam por causar grandes perdas econômicas na agricultura. Estima-se que entre 20% e 50% das perdas de frutos em pré e pós-colheita são decorrentes de doenças causadas por esses microrganismos (Defilippi et al., 2018; Tariq et al., 2020), sendo necessário um elevado uso de fungicidas para seu controle. Os fungos fitopatogênicos *Botrytis cinerea*, *Fusarium* spp. e *Colletotrichum* spp. estão entre os mais relevantes economicamente, por causarem perdas expressivas no cultivo de grãos como arroz, milho, soja, trigo, dentre diversas outras culturas de importância agrícola (Gu et al., 2019).

Uma alternativa para a substituição dos produtos sintéticos empregados contra fitopatógenos é o uso de agentes de biocontrole (BCAs). BCAs ou agentes de controle biológico referem-se a organismos antagônicos que possuem propriedades para controlar pragas e doenças de plantas (Liu et al., 2014; Pérez-García et al., 2011) de forma mais segura e sustentável para o meio ambiente.

Dentre os BCAs voltados ao controle de fitopatógenos, os mais estudados pertencem ao gênero *Bacillus* (Ongena et al., 2008). Esse gênero compreende um grupo heterogêneo de bactérias Gram-positivas, aeróbias ou anaeróbias facultativas e formadoras de endósporos, característica que confere resistência à radiação, à

dessecação e a solventes orgânicos (Xiao et al., 2021). Além disso, possuem a capacidade de produzir uma grande variedade de metabólitos secundários, a exemplo de alguns biossurfactantes lipopeptídeos, que atuam como antimicrobianos (Mnif et al., 2016).

Os biossurfactantes são produzidos por diversos microrganismos e, nos últimos anos, vêm atraindo o interesse da comunidade científica por apresentarem vantagens em relação aos surfactantes sintéticos. Uma família de biossurfactantes que tem despertado grande interesse é a dos lipopeptídeos, moléculas que apresentam uma porção lipídica (hidrofóbica) ligada a uma cadeia peptídica (hidrofílica). Essas moléculas apresentam baixa toxicidade para plantas e animais, além de serem biodegradáveis e apresentarem um amplo espectro de ação (Llorens et al., 2022).

Os lipopeptídeos de *Bacillus* spp. incluem três famílias principais: as surfactinas, que apresentam ação antibiótica e antitumoral (Meena et al., 2015); as iturinas, que apresentam elevada eficácia no controle de vários fungos patogênicos (Jiang et al., 2020); e as fengicinas, as quais também exibem ação antifúngica, principalmente contra fungos filamentosos (Pérez-García et al., 2011).

Apesar do grande interesse no uso de lipopeptídeos como uma estratégia no controle de fungos fitopatogênicos, a utilização em larga escala dessas moléculas como antibacterianos e antifúngicos ainda é limitada pelo alto custo de produção em escala industrial, o qual é decorrente do custo do meio de cultura, dos processos *downstream*, especialmente da recuperação e concentração das moléculas e do baixo rendimento de produção (Khondee et al., 2015). Portanto, a otimização de fatores que influenciam a sua produção é de considerável importância para a produção desses metabólitos para uso em escala comercial.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi adequar a composição dos meios de cultivo e as variáveis pH e temperatura para elevar a produção de lipopeptídeos com atividade antifúngica pelos isolados *Bacillus velezensis* LBBMA TR59II, LBBMA TR47II e LBBMA AP01, visando ao controle de fungos fitopatogênicos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Controle Biológico

Em decorrência da expansão agrícola, o uso de agrotóxicos no Brasil vem aumentando ao longo dos anos. No ano de 2022, o Brasil ultrapassou a marca de 800 mil toneladas de venda de produtos classificados como químicos e bioquímicos, o que representou um aumento de aproximadamente 11% nas vendas em relação ao ano anterior (IBAMA, 2022). Apesar de serem bastante eficientes no controle de várias pragas, plantas invasoras e doenças em cultivos agrícolas e florestais, o uso prolongado de agrotóxicos pode provocar danos à saúde humana, desequilíbrio nos ecossistemas e a seleção de populações-alvo resistentes.

A crescente preocupação com os efeitos indesejáveis do uso extensivo de agrotóxicos tem levado os pesquisadores a buscarem estratégias mais sustentáveis e alternativas para se reduzir o uso desses compostos. Uma alternativa que vem sendo estudada e utilizada é o controle biológico, ou biocontrole. No caso específico de fitopatógenos, o biocontrole consiste no controle de um microrganismo (patógeno) por outro microrganismo (antagonista) (Michereff, 2001).

O controle biológico, no âmbito de fitopatógenos, é composto, portanto, pelo patógeno (fungo, bactéria, vírus e outros), a planta hospedeira e o antagonista, o qual possui efeito negativo sobre o patógeno, assim resultando na inibição de seu crescimento (Monteiro, 2002). Os antagonistas de modo geral agem por antibiose, produzindo substâncias com um amplo espectro de ação que inibem o crescimento do patógeno, mas também agem por competição e estimulação da resistência sistêmica induzida (ISR) pelo hospedeiro (Defilippi et al., 2018; Kulimushi et al., 2017; Li et al., 2019).

A ação por antibiose ocorre quando o antagonista produz substâncias que são inibitórias para o patógeno. Essas substâncias podem interferir em processos vitais para a sobrevivência do patógeno, como a formação ou a modificação da parede ou membrana celulares, comprometendo sua integridade e, conseqüentemente, suas atividades celulares (Defilippi et al., 2018; Ongena et al., 2005).

Quando o controle envolve o princípio da competição, o antagonista pode utilizar os mesmos recursos do ambiente necessários para o crescimento do

patógeno, a exemplo daqueles que apresentam rápida colonização da rizosfera, limitando a disponibilidade de espaço físico e de nutrientes (Tariq et al., 2020). Desse modo, o microrganismo antagonista dificulta a colonização e o estabelecimento do patógeno na planta hospedeira e, assim, proporciona proteção parcial à planta.

A estimulação da resistência sistêmica induzida (ISR) no hospedeiro pelo antagonista aumenta a resistência da planta ao ataque de patógenos. Essa indução geralmente envolve a produção de ácido jasmônico e ácido salicílico, que ativam a expressão de genes e outros mecanismos de defesa envolvidos na resposta (Desoignis et al., 2013; Llorenset al., 2022; Van Loon, 2007).

Diversos gêneros de microrganismos antagonistas são utilizados em programas de biocontrole, tais como *Streptomyces*, *Trichoderma*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, dentre outros (D'aes et al., 2010; Law et al., 2017; Parveen et al., 2019; Santos, 2014; Souza, 2019). Esses microrganismos possuem mecanismos que conferem efeito protetor à planta hospedeira contra nematoides, doenças bacterianas e fúngicas. O gênero *Bacillus* está entre os mais estudados em decorrência da capacidade de seus membros de produzir metabólitos antibacterianos, antivirais e antifúngicos, incluindo as três principais famílias de lipopeptídeos: surfactina, iturina e fengicina. Tais moléculas possuem propriedades antibacterianas e antifúngicas por meio de sua ação nas membranas celulares, que inclui o desenvolvimento de poros e lise da membrana celular (Lin et al., 2020; Sur et al., 2018).

3.2 *Bacillus velezensis* como agente de controle biológico

O gênero *Bacillus*, pertencente ao filo Firmicutes, agrupa mais de 200 espécies de bactérias em forma de bastonetes Gram-positivos, quimioheterotróficas e que possuem metabolismo aeróbio ou anaeróbio facultativo. Podem ser encontradas em diversos ambientes, como em plantas, em ambientes aquáticos e, principalmente, no solo.

O gênero *Bacillus* possui várias espécies de interesse na área industrial, alimentícia e farmacêutica. Estudos *in vitro* e *in vivo* têm revelado a eficácia de espécies de *Bacillus* na inibição de doenças causadas por diversos fitopatógenos (Santos, 2014), em uma ampla variedade de culturas.

Velho et al. (2011) demonstraram que cepas de *Bacillus* spp. possuem atividade inibitória contra *Aspergillus* spp., *Bipolaris sorokiniana* e *Fusarium*

graminearum. O isolado de *Bacillus* sp. BS061 inibiu o crescimento micelial de *Botrytis cinerea*, reduzindo significativamente a incidência da doença do mofo cinzento em pepino e morango (Kim et al., 2013). A fengicina produzida por *Bacillus velezensis* demonstrou possuir atividade contra *Rhizoctonia solani* (Sidorova et al., 2020). A iturina A foi avaliada contra *Aspergillus carbonarius*, um patógeno produtor de micotoxinas, sendo o principal composto inibidor do patógeno. A ação desse composto foi observada, a nível celular, como um intumescimento das células fúngicas, o afinamento das paredes celulares e o intumescimento das mitocôndrias quando em altas concentrações (Jiang et al., 2020).

Cao et al. (2012) demonstraram a relação da ação dos lipopeptídeos fengicina e bacilomicina de *Bacillus subtilis* SQR 9 com a diminuição significativa da incidência da murcha de *Fusarium* em pepinos, doença causada por *Fusarium oxysporum* f. sp *cucumerinum*, associada à redução de 13,4% no número de esporos germinativos do patógeno comparativamente ao controle. Defilippi et al. (2018) reportaram a redução do crescimento micelial de *Fusarium sambucinum* e *Verticillium dahliae* por *B. subtilis* B9-5 em 26 e 37%, respectivamente.

Dentre as espécies do gênero *Bacillus* empregadas em programas de biocontrole, destaca-se o *Bacillus velezensis*. Essa espécie apresenta ampla distribuição, ausência de patogenicidade e capacidade de formar endósporos, o que lhe confere forte resistência ao calor e tolerância à dessecação. Essas características permitem o desenvolvimento de produtos comerciais de fácil armazenamento e longa vida de prateleira (Bolivar-Anillo et al., 2021). Ademais, a espécie apresenta modos de ação antagônica variados contra diferentes fitopatógenos, como antagonismo, competição por nicho e indução de resistência do hospedeiro (Michereff, 2001; Monteiro, 2002).

Dentre os metabólitos secundários sintetizados por *Bacillus velezensis*, destacam-se os lipopeptídeos surfactina, fengicina e iturina, que possuem diferentes atividades e modos de ação antimicrobiana (Farace et al., 2015).

3.3 Lipopeptídeos

Os lipopeptídeos são um grupo heterogêneo de biossurfactantes produzidos por microrganismos dos gêneros *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Bacillus* e outros

(Santiago, 2019). Essas moléculas são de grande interesse na área industrial, médica e agrícola, dadas as suas propriedades tensoativas, atividade antibacteriana, anti-inflamatória, antitumoral, antiviral e antifúngica.

Os lipopeptídeos de *Bacillus* spp. são sintetizados de forma independente do ribossomo por peptídeo-sintases não ribossomais (NRPSs) (Ongena et al., 2008), o que propicia a produção simultânea de uma variedade de lipopeptídeos por um mesmo isolado bacteriano. Esse mecanismo confere uma elevada heterogeneidade estrutural entre as famílias em relação ao tipo e sequência de resíduos de aminoácidos, comprimento e ramificação da cadeia de ácidos graxos (Kulimushi et al., 2017; Ongena et al., 2008). Nos lipopeptídeos, a cadeia de ácidos graxos pode variar de 12 a 19 átomos de carbono (Larini et al., 2017).

Surfactina, iturina e fengicina são a família de lipopeptídeos mais documentada em decorrência de suas características peculiares, como baixa concentração micelar crítica (CMC) e o seu modo de ação na membrana de microrganismos susceptíveis, que envolve a formação de poros. Esse efeito resulta no desequilíbrio dos fluxos iônico e na alteração da composição dos ácidos graxos da membrana, o que interfere na permeabilidade e no seu papel como uma barreira seletiva, causando a morte celular (Sharma et al., 2023).

A surfactina foi originalmente identificada por Arima (1968) no caldo de cultura de *Bacillus subtilis* e teve sua estrutura determinada por Kanumaki et al. (1969). É conhecida por reduzir a tensão superficial da água de 72 para 27 mN/m, com uma concentração micelar crítica (CMC) em torno de 20 mg L⁻¹ (Roongsawang et al., 2011). Sua estrutura é composta por um anel de heptapeptídeo de sequência de aminoácidos Glu- Leu- Leu- Val- Asp- Leu- Leu, ligado a uma cadeia de ácidos graxos, geralmente com um número de 13 a 15 átomos de carbono (Liu et al., 2014). A surfactina atua nas membranas celulares de células bacterianas e de fungos, afetando as hifas, o desenvolvimento dos esporos e causando lise da membrana celular (Lin et al., 2020; Sur et al., 2018). Além da atividade antagônica contra patógenos, ela induz a resistência de plantas a diversos patógenos (Picchi et al., 2009; Sidorova et al., 2020).

As iturinas são conhecidas principalmente por sua atividade antifúngica, podendo por isso ser utilizadas como um eficaz agente de controle de fungos fitopatogênicos na agricultura (Joshi et al., 2008). Sua estrutura é constituída por um anel heptapeptídico ligado por uma ligação β-aminoácido a um beta-amino ácido

graxo, cujo comprimento varia entre 14 a 17 átomos de carbono. De acordo com as variações das cadeias de ácidos graxos ou diferentes posições dos aminoácidos, as iturinas são divididas em Iturinas A e C e bacilomicina D, L e F (Ongena et al., 2008), sendo a iturina A a sua principal representante. O modo de ação antifúngica baseia-se na perturbação osmótica na membrana citoplasmática da célula alvo, alterando a permeabilidade a íons, bem como promovendo sobretudo a perda de íons K^+ , o que em geral resulta na morte celular (Monteiro, 2002; Ongena et al., 2008).

A fengicina exhibe elevada atividade antifúngica, principalmente contra fungos filamentosos (Ongena et al., 2008; Velho et al., 2011). É um composto anfifílico constituído por α -aminoácidos ligados pelo N-terminal do peptídeo a uma cadeia de ácido graxo β -hidroxilado com 14 a 18 átomos de carbono, que podem ser saturados ou insaturados (Liu et al., 2014; Santiago, 2019). Apesar de seu mecanismo de ação ser menos conhecido do que os da surfactina e iturina, sabe-se que a fengicina atua na bicamada lipídica da membrana, promovendo a formação de poros e, por consequência, o efluxo do conteúdo intracelular da célula alvo (Falardeau et al., 2013).

3.4 *Colletotrichum truncatum*

O gênero *Colletotrichum* constitui um grupo monofilético de ascomicetos com mais de 200 espécies, considerado um dos principais fungos patogênicos para plantas (Damm et al., 2019). *Colletotrichum* spp. são os agentes causadores da antracnose em mais de 3.000 espécies de plantas (Da silva et al., 2020; Boufleur et al., 2021), a qual leva à redução da produtividade de um grande número de culturas em todo o mundo (Da silva et al., 2020).

A antracnose é uma das principais doenças que acomete as plantações de soja no Brasil, principalmente em regiões tropicais, como no Cerrado (Henning et al., 2014), e no sul do Brasil, em épocas chuvosas (Galli et al., 2007). No Brasil, a doença foi relatada pela primeira vez em 1961 no estado do Rio Grande do Sul (Dias et al., 2016). Os sintomas da antracnose consistem de lesões escuras nos cotilédones, vagens, e caules, bem como de necroses características nas nervuras abaxiais nas folhas da planta hospedeira (Dias et al., 2019). A doença afeta todos os estádios de crescimento da planta, reduzindo de forma significativa a produção de grãos. Além

disso, pode causar apodrecimento dos frutos antes e depois da colheita, reduzindo sua qualidade e sua comercialização (Chen et al., 2018).

3.5 Fatores que influenciam a produção de lipopeptídeos

A produção de lipopeptídeos por *Bacillus* spp. tem despertado grande interesse na busca por estratégias de controle de fungos fitopatogênicos. Ao longo dos últimos anos, diversos estudos têm sido conduzidos com o objetivo de se aprimorarem as condições de fermentação e de cultivo, visando à produção eficiente e ao desenvolvimento de métodos mais econômicos de purificação e concentração de lipopeptídeos. Independentemente de sua utilização como agentes no controle de fitopatógenos ser muito estudada e de possuírem diversas vantagens para o meio ambiente, se comparados aos surfactantes e agrotóxicos químicos, o baixo rendimento e os altos custos de produção têm sido um empecilho para sua utilização em larga escala (Reis, 2016).

O processo fermentativo tem grande influência no rendimento de produção dos lipopeptídeos e nas características das moléculas produzidas (Larini et al., 2017). Assim, a otimização dos processos fermentativos e/ou a utilização de fontes de carbono de baixo custo podem ser alternativas para o aumento da produção dessas moléculas e viabilizar o seu uso comercial de forma competitiva no que concerne aos aspectos econômicos.

Um dos principais aspectos abordados nos estudos de processos fermentativos é a influência dos parâmetros utilizados no cultivo dos microrganismos, tais como tipo e concentração das fontes de carbono e de nitrogênio, pH, temperatura, agitação e oxigenação, os quais afetam significativamente o crescimento das células, a atividade celular, a síntese dos metabólitos secundários (Sidorova et al., 2020; Souza, 2019) e, por conseguinte, o custo de produção.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismos

O trabalho foi realizado utilizando-se os isolados de *B. velezensis* LBBMA TR59II, LBBMA TR47II e LBBMA AP01, pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (LBBMA/DMB/UFV). Esses isolados são mantidos em ultrafreezer a -80 °C. As linhagens TR59II e TR47II foram isoladas de amostras de solo da Ilha da Trindade (Da Silva et al., 2015). A linhagem AP01 foi isolada a partir de uma placa de Petri obtida em uma aula prática de Microbiologia Geral oferecida pelo Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa (Oliveira, 2017). Todos os isolados foram previamente classificados como produtores de lipopeptídeos com atividade antifúngica. Para o ensaio de inibição, foi utilizado o isolado fúngico fitopatogênico *Colletotrichum truncatum*, cedido pelo Laboratório de Controle Biológico de doenças do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

4.2 Produção de lipopeptídeos em diferentes meios de cultura

4.2.1 Métodos de cultivo, recuperação e preservação de extrato enriquecido em lipopeptídeos

Os isolados de *B. velezensis* foram reativados em meio TSA (Tryptic Soy Agar), composto por (g L⁻¹) hidrolisado pancreático de caseína (15); hidrolisado papaico de soja (5); cloreto de sódio (5) e ágar bacteriológico (15) a 30 °C, até o aparecimento das colônias (aproximadamente 24 horas). Para o preparo dos inóculos, uma colônia foi transferida para tubos de vidro (10 cm comprimento e 3 cm de diâmetro) contendo 6 mL de caldo TSB (Tryptic Soy Broth), seguindo-se incubação em um agitador orbital a 200 rpm e 30 °C por 18 horas, em triplicata. Uma alíquota de cada inóculo foi transferida para frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 30 mL dos meios de cultura M523, Meio Mineral (MM) e Meio Farelo de Soja (MFS), em volume suficiente para se obter uma densidade óptica a 600nm (D.O._{600nm}) de 0,05. O meio M523 contém (g L⁻¹): sacarose (10); caseína hidrolisada (8); extrato de levedura (4); K₂PO₄ (2); MgSO₄.7H₂O (0,3). O MM contém (g L⁻¹): K₂HPO₄ (13,9); KH₂PO₄ (2,7); extrato de levedura (0,05); NH₄NO₃ (1,0); glicose (40,0) e 50 mL da solução de micronutrientes (EDTA (0,5); MgSO₄.7H₂O (3,0); MnSO₄.4H₂O (0,5); NaCl (1,0); CaCl₂.2H₂O (0,1); CoCl₂.6H₂O (0,1); ZnSO₄.7H₂O (0,1); FeSO₄.7H₂O (0,1); CuSO₄.5H₂O (0,01); Na₂MoO₄.2H₂O (0,01); NaSeO₄ (0,01); Na₂WO₄.2H₂O (0,01); NiCl₂.6H₂O (0,02). O

MFS foi preparado adicionando-se 30 g L⁻¹ de farelo de soja em água. A suspensão foi esterilizada em autoclave a 121 °C por 30 minutos, filtrado em tecido Voal e o líquido obtido (MFS) foi novamente autoclavado.

Os frascos foram mantidos por 72 horas a 30 °C, sob agitação de 200 rpm. Alíquotas da cultura (1 mL) foram retiradas a cada 24 horas para avaliação do crescimento microbiano, por meio da avaliação da densidade óptica a 600_{nm} em um espectrofotômetro Genesys 10S UV-Vis (Thermo Scientific), e para avaliação da produção de biossurfactantes pelo teste de espalhamento de óleo em placa (Almeida, 2022). Resumidamente, adicionaram-se 70 mL de água destilada à base de uma placa de Petri (150 x 20 mm) e, no centro da superfície da água, adicionaram-se 20 µL de petróleo. Após a formação de uma camada homogênea de óleo sobre a superfície da fase aquosa, adicionaram-se 10 µL do sobrenadante da cultura centrifugada a 12.300 g por 5 minutos no centro da superfície líquida. A presença e a avaliação semiquantitativa da concentração de biossurfactantes foram determinados pelo diâmetro do halo de espalhamento do óleo, medido 30 segundos após a adição do sobrenadante.

Após 72 horas de cultivo, o pH do volume restante das culturas foi ajustado para 2,0 com HCl 3 mol L⁻¹, seguindo-se armazenamento em geladeira por aproximadamente 24 horas. Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação por 15 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 4 mL de água destilada, ajustando-se o pH para 7,0 com NaOH 3 mol L⁻¹. O material foi novamente centrifugado por 15 minutos a 10.000 rpm para remoção de restos celulares. Os sobrenadantes foram recolhidos, congelados (- 80 °C) e liofilizados em um liofilizador L101 (LIOTOP). O rendimento (g/L) do extrato bruto enriquecido em lipopeptídeos (EBEL) foi determinado gravimetricamente.

4.2.2 Ensaio de inibição da germinação de esporos e crescimento micelial de *C. truncatum*

Os EBEL obtidos na etapa anterior foram avaliados quanto à atividade de inibição do crescimento micelial de *C. truncatum* em microplacas de 96 poços. Para isso, preparam-se soluções estoque a 2.000 mg L⁻¹ de EBEL em água destilada. Após

autoclavagem, essas soluções foram submetidas a diluições seriadas, de modo a se obter, em cada poço da microplaca, um volume de 50 µL de solução de EBEL nas concentrações (finais) de 1.000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25 e 15,6 mg L⁻¹. Em seguida, foram adicionados em cada poço 50 µL de uma suspensão de esporos de *C. truncatum* na concentração de 2x10⁵ conídios mL⁻¹. O controle consistiu da adição de 50 µL de água destilada no lugar das soluções de EBEL. As microplacas foram incubadas a 25 °C por 6 dias e o crescimento do fungo foi acompanhado por leituras de densidade óptica a 620 nm a cada 24 horas, utilizando-se uma leitora de microplaca Power Wave XS (BioTek). Cada uma das três repetições biológicas foi analisada com duas repetições técnicas, empregando-se a média dessas duas repetições para as análises estatísticas. A porcentagem de inibição do crescimento fúngico foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = 1 - \frac{(A_t - A_0)}{A_c} \times 100$$

A_t: Absorbância 620_{nm} da microplaca após os períodos de incubação (48, 96 e 144 horas).

A₀: Absorbância 620_{nm} da microplaca na hora inicial (branco das leituras).

A_c: Absorbância 620_{nm} da microplaca dos poços do controle após os períodos de incubação (48, 96 e 144 horas).

Neste trabalho, a concentração inibitória mínima (CIM) foi estabelecida como aquela capaz de inibir o crescimento fúngico em pelo menos 90%.

4.2.3 Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram expressos como a média ± desvio padrão de três repetições e os dados foram analisados pelo software GraphPad Prism (versão 5.04).

4.3 Adequação de parâmetros de fermentação visando à obtenção de aumento de rendimento da produção de lipopeptídeos

Visando obter-se maior rendimento da produção de lipopeptídeos pelos isolados de *B. velezensis*, foram conduzidos novos experimentos para se avaliar o efeito da combinação de doses de duas fontes de carbono e de combinações de

temperatura e pH. Os níveis dos fatores em cada tratamento foram definidos utilizando-se o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). O DCCR é um delineamento desenvolvido por Box e Wilson como um método de otimização utilizado em processos industriais, onde normalmente o erro experimental é pequeno e o número de combinações entre os níveis de fatores a serem investigados são reduzidos (Conagin, 1982). Os experimentos foram conduzidos avaliando-se dois fatores por vez, com três repetições no ponto central.

Primeiramente, foi investigada a combinação de doses das fontes de carbono farelo de soja e açúcar cristal comercial (Ensaio 1). Com essas condições estabelecidas, foram avaliados os efeitos das combinações de temperatura e pH (Ensaio 2). Os níveis das variáveis independentes estudadas em cada ensaio estão apresentados na Tabela 1, e a matriz do planejamento experimental está apresentada na Tabela 2. As variáveis respostas utilizadas em ambos os ensaios foram a concentração de EBEL (em mg L⁻¹), determinada a partir do rendimento do extrato bruto; o diâmetro do halo de espalhamento de óleo; e a Concentração inibitória mínima dos EBEL obtidos em cada tratamento, determinada por meio do ensaio de atividade antifúngica (itens 4.2.1 e 4.2.2).

Tabela 1- Níveis das variáveis independentes do Delineamento Composto Central Rotacional

	Variáveis Independentes	Níveis				
		- 1.41	-1	0	+1	+1.41
Ensaio 1	Farelo de Soja (g L ⁻¹)	10	23	55	87	100
	Açúcar Cristal Comercial (g L ⁻¹)*	10	17,3	35	52,7	60
Ensaio 2	pH	5,5	5,8	6,5	7,2	7,5
	Temperatura	25	26,2	29	31,8	33

*Fabricante: Cia. Agrícola Pontenovense

Tabela 2- Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional para os dois ensaios

Unidade Experimental	Variável 1	Variável 2	Ensaio 1		Ensaio 2	
			Farelo de Soja (g L ⁻¹)	Açúcar Comercial (g L ⁻¹)	PH	Temperatura
1	-1	-1	23	17,3	5,8	26,2
2	-1	+1	23	52,7	5,8	31,8
3	+1	-1	87	17,3	7,2	26,2
4	+1	+1	87	52,7	7,2	31,8
5	0	-1,41	55	10	6,5	25
6	0	+1,41	55	60	6,5	33
7	0	0	55	35	6,5	29
8	0	0	55	35	6,5	29
9	0	0	55	35	6,5	29
10	-1,41	0	10	35	5,5	29
11	+1,41	0	100	35	7,5	29

Os cultivos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado. As unidades experimentais foram mantidas a 30 °C em uma incubadora com agitação orbital Forma Orbital Shaker (Thermo) a 200 rpm. Alíquotas foram retiradas após 72 horas de cultivo para avaliação do crescimento, por meio da leitura da densidade óptica a 600 nm (D.O._{600nm}). Avaliou-se também a presença e concentração relativa de biossurfactantes pelo método do espalhamento de óleo em placa. O restante da cultura foi utilizado para determinação da concentração de extrato bruto enriquecido em lipopeptídeos (item 3.2.1) obtido em cada condição de cultivo. A concentração inibitória mínima foi determinada conforme descrito no item 3.2.2, empregando-se nessa avaliação 3 repetições técnicas para cada unidade experimental. Os resultados das três repetições foram expressos pela média ± desvio padrão. Os dados obtidos em todas as avaliações acima relacionadas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparados pelo teste de Tukey a 95 % de confiança.

4.3.1 Análises estatísticas

Os dados do experimento anterior foram submetidos à metodologia de superfície de resposta. Os modelos foram escolhidos com base na significância dos coeficientes de regressão utilizando-se o teste “t”, adotando-se o nível de 5% de probabilidade, no coeficiente de determinação (r^2) e no comportamento do fenômeno em estudo.

As avaliações foram realizadas utilizando-se o software SAEG, versão 9.1 (UFV, 2007) e o software SigmaPlot (versão 12.0).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

5.1 Produção de lipopeptídeos em diferentes meios de cultura

O perfil de crescimento de *B. velezensis* LBBMA TR59II ao longo das 72 horas de cultivo demonstrou maior densidade de células (inferida pela densidade óptica a 600 nm - D.O._{600nm}) na avaliação realizada após 24 horas de cultivo, decrescendo a partir daí nas duas avaliações seguintes, após 48 e 72 horas (Tabela 3). O meio farelo de soja (MFS) proporcionou uma produção de células cerca de duas vezes superior à obtida nos outros dois meios de cultura.

Os isolados *B. velezensis* LBBMA TR47II e LBBMA AP01 apresentaram um padrão de crescimento similar entre si, retratado por uma maior densidade óptica em MFS até 48 horas do cultivo, seguindo-se redução da concentração de células. Nos meios MM e M523, os dois isolados continuaram a crescer até o encerramento da avaliação, às 72 horas (Tabelas 4 e 5), o que resultou em uma maior concentração de células nesses dois meios na fase final do cultivo.

Ao se compararem os maiores valores de densidade óptica dos isolados nos três meios de cultura, os maiores valores de densidade óptica do isolado *B. velezensis* LBBMA TR59II é alcançado após 24 horas de cultivo em MFS. Já para os isolados *B. velezensis* LBBMA TR47II e LBBMA AP01, a maior concentração de células é obtida após 48 horas no MFS e 72 horas nos meios MM e M523.

É relevante destacar que os valores de densidade óptica apresentados não fornecem uma visão detalhada do crescimento bacteriano durante o período de incubação avaliado, visto que as leituras foram realizadas em intervalos de 24 horas.

Tabela 3- Crescimento do isolado *B. velezensis* LBBMA TR59II (avaliado por meio da Densidade óptica a 600 nm) nos meios de cultivo 523, Meio Mineral e Meio Farelo de Soja

	24 horas	48 horas	72 horas	
Densidade óptica (600 nm)				
M523	2,58 C a	1,38 C b	1,41 B b	DMS: 0,154
MM	3,66 B a	1,39 B b	1,58 B b	DMS: 0,373
MFS	6,37 A a	3,41 A b	3,81 A b	DMS: 0,410
	DMS: 0,471	DMS: 0,299	DMS: 0,260	

*M523: meio 523; MM: Meio Mineral, MFS: Meio Farelo de Soja. Números seguidos da mesma letra maiúscula, na coluna, e de letra minúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os cultivos foram efetuados em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 30 mL de meio de cultura, mantidos em agitador orbital a 200 RPM e 30 °C. Os números representam a média e o desvio-padrão de três repetições.

Tabela 4- Crescimento do isolado *B. velezensis* LBBMA TR47II (avaliado por meio da Densidade óptica a 600 nm) nos meios de cultivo 523, Meio Mineral e Meio Farelo de Soja

	24 horas	48 horas	72 horas	
Densidade óptica (600 nm)				
M523	3,22 B c	4,43 B b	8,88 A a	DMS: 1,013
MM	3,98 B b	4,61 B b	8,66 A a	DMS: 1,244
MFS	7,53 A b	8,81 A a	5,41 B c	DMS: 0,692
	DMS: 1,037	DMS: 0,891	DMS: 1,094	

*M523: meio 523; MM: Meio Mineral, MFS: Meio Farelo de Soja. Números seguidos da mesma letra maiúscula, na coluna, e de letra minúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os cultivos foram efetuados em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 30 mL de meio de cultura, mantidos em agitador orbital a 200 RPM e 30 °C. Os números representam a média e o desvio-padrão de três repetições.

Tabela 5- Crescimento do isolado *B. velezensis* LBBMA AP01 (avaliado por meio da Densidade óptica a 600 nm) nos meios de cultivo 523, Meio Mineral e Meio Farelo de Soja

	24 horas	48 horas	72 horas	
Densidade óptica (600 nm)				
M523	3,58 A b	4,28 A b	10,16 A a	DMS: 3,737
MM	3,60 A a	3,95 A a	7,81 A a	DMS: 4,461
MFS	4,86 A a	5,39 A a	2,47 B a	DMS: 5,614
	DMS: 3,224	DMS: 5,160	DMS: 5,258	

*M523: meio 523; MM: Meio Mineral, MFS: Meio Farelo de Soja. Números seguidos da mesma letra maiúscula, na coluna, e de letra minúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os cultivos foram efetuados em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 30 mL de meio de cultura, mantidos em agitador orbital a 200 RPM e 30 °C. Os números representam a média e o desvio-padrão de três repetições.

Nos ensaios de espalhamento de óleo, constatou-se que os sobrenadantes dos três isolados de *B. velezensis*, cultivados nos três meios de cultura, continham compostos com atividade de superfície, um indício da presença de lipopeptídeos sabidamente produzidos por esses isolados (Tabela 6, 7 e 8). Exceto para o *B. velezensis* LBBMA TR59II cultivado em M523, cujo maior valor de halo de espalhamento foi alcançado após 72 horas de cultivo, a máxima concentração de agentes de superfície, em todas as demais combinações isolado x tempo de cultivo, foi alcançada em 24 ou 48 horas. Os valores máximos de diâmetro de espalhamento de óleo oscilaram entre 23 e 53 mm.

Tabela 6- Diâmetro do halo do espalhamento de óleo obtido com os sobrenadantes de *B. velezensis* LBBMA TR59II

	Meio de cultura *	24 horas	48 horas	72 horas	
		Diâmetro (mm)			
TR59II	M523	40 A b	41 A b	53 A a	DMS: 0,561
	MM	33 B ab	36 A a	27 B b	DMS: 0,931
	MFS	29 B b	36 A a	31 B ab	DMS: 0,619
		DMS:0,647	DMS: 0,799	DMS: 0,711	

*M523: meio 523; MM: meio Mineral, MFS: Meio Farelo de Soja. Números seguidos da mesma letra maiúscula, na coluna, e de letra minúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para condições de cultivo dos isolados bacterianos, ver Tabela 1.

Tabela 7- Diâmetro do halo do espalhamento de óleo obtido com os sobrenadantes de *B. velezensis* LBBMA TR47II

	Meio de cultura *	24 horas	48 horas	72 horas	
		Diâmetro (mm)			
TR47II	M523	30 AB b	44 A a	40 AB ab	DMS: 0,948
	MM	43 A a	45 A a	46 A a	DMS: 1,768
	MFS	23 B a	30 B a	28 B a	DMS: 1,187
		DMS: 1,794	DMS: 0,829	MDS:1,237	

*M523: meio 523; MM: meio Mineral, MFS: Meio Farelo de Soja. Números seguidos da mesma letra maiúscula, na coluna, e de letra minúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para condições de cultivo dos isolados bacterianos, ver Tabela 1.

Tabela 8- Diâmetro do halo do espalhamento de óleo obtido com os sobrenadantes de *B. velezensis* LBBMA AP01

AP01	Meio de cultura *	24 horas	48 horas	72 horas	DMS
		Diâmetro (mm)			
	M523	30 A b	41 A a	40 AB ab	0,945
	MM	43 A a	44 A a	46 A a	2,252
	MFS	33 A a	30 A a	28 B a	2,306
		DMS: 2,467	DMS: 1,892	DMS:1,276	

*M523: meio 523; MM: meio Mineral, MFS: Meio Farelo de Soja. Números seguidos da mesma letra maiúscula, na coluna, e de letra minúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para condições de cultivo dos isolados bacterianos, ver Tabela 1.

5.2 Produção de lipopeptídeos em diferentes meios de cultura e atividade antifúngica contra *C. truncatum*

O rendimento de extrato bruto enriquecido em lipopeptídeos (EBEL) produzido por *B. velezensis* LBBMA TR59II diferiu significativamente nos três meios de cultura. O maior rendimento foi obtido em Meio Mineral (MM), ao passo que a produção em Meio Farelo de Soja (MFS) foi o mais baixo (Tabela 7). O maior rendimento de EBEL obtido com o isolado *B. velezensis* LBBMA TR47II foi também obtido em MM (cerca de duas vezes superior ao obtido nos demais meios). No entanto, para este isolado, o rendimento de EBEL não diferiu quando cultivado em MFS ou M523 (Tabela 9). Para o isolado *B. velezensis* LBBMA AP01, não houve diferença significativa na produção de EBEL nos três meios testados.

Em relação à comparação da produção de EBEL pelos três isolados em um mesmo meio de cultura, não foi observada diferença significativa para os meios M523 e MFS (Tabela 9). No meio MM, o isolado *B. velezensis* LBBMA TR59II destacou-se como o maior produtor, diferindo estatisticamente do isolado *B. velezensis* LBBMA TR47II.

Os componentes do meio de cultura desempenham um papel crucial na síntese dessas moléculas, incluindo fatores nutricionais e físico-químicos (fonte de carbono, temperatura, pH, disponibilidade de oxigênio, de nitrogênio e agitação) (Sidorova et al., 2020; Souza, 2019; Inés et al., 2015), dessa forma, fatores que afetam a sua produção, juntamente com as estratégias que permitem aumentar a produção destes compostos são investigados por pesquisadores.

Tabela 9- Valores médios do rendimento do extrato bruto enriquecido em lipopeptídeos (EBEL), após 72 horas do cultivo de *B. velezensis* LBBMA TR59II, LBBMA TR47II e LBBMA AP01 em diferentes meios de cultura

Meio de cultura*	TR59II	TR47II	AP01	
	EBEL (mg L ⁻¹)			
M523	1477 B a	855 B a	1033 A a	DMS: 669,081
MM	2200 A a	1277 A b	1521 A ab	DMS: 890,670
MFS	1133 C a	655 B a	1277 A a	DMS: 1439,310
	DMS: 324,865	DMS: 285,328	DMS: 1767,944	

*M523: meio 523; MM: Meio Mineral, MFS: Meio Farelo de Soja. Números seguidos da mesma letra maiúscula, na coluna, e de letra minúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os cultivos foram efetuados em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 30 mL de meio de cultura, mantidos em agitador orbital a 200 RPM e 30 °C. Os números representam a média e o desvio-padrão de três repetições.

A concentração inibitória mínima (CIM) do EBEL produzido por *B. velezensis* LBBMA TR59II em M523 contra *C. truncatum* foi de 250 mg L⁻¹. Já os EBEL obtidos em MM e MFS apresentaram uma CIM quatro vezes maior (1.000 mg L⁻¹). Esses dados indicam que o EBEL obtido em M523 contém uma concentração mais elevada de lipopeptídeos com atividade antifúngica (ou uma menor concentração de impurezas) do que os EBEL obtidos em MM e MFS.

Para o isolado *B. velezensis* LBBMA TR47II, a CIM do EBEL obtido após o cultivo em M523 foi de 250 mg L⁻¹, de 1.000 mg L⁻¹ em MM e 500 mg L⁻¹ em MFS. Quando se avaliam os dados referentes ao teste de espalhamento de óleo, observa-se que o maior halo de espalhamento de óleo foi obtido com o sobrenadante obtido no MM (46 mm, Tabela 7), um indício de maior concentração de lipopeptídeos. Contudo, a CIM do EBEL obtido nesse meio de cultura foi a mais alta (1.000 mg L⁻¹, Tabela 9). Esses dados sugerem que, durante o crescimento em MM, este isolado produz uma menor proporção de iturina e/ou fengicina, que possuem atividade

antifúngica (Ongena, 2005), e, portanto, maior CIM, e uma maior proporção de surfactina, a qual possui maior atividade surfactante (Deleu et al., 1999).

Em relação ao isolado *B. velezensis* LBBMA AP01, as CIM dos EBEL foram de 1.000 mg L⁻¹ em M523, 250 mg L⁻¹ em MM e 500 mg L⁻¹ em MFS, após 144 horas de incubação. Analisando-se os dados referentes ao espalhamento de óleo (Tabela 8), rendimento de produção de EBEL (Tabela 9) e CIM (Tabela 10), conclui-se que, para o isolado *B. velezensis* LBBMA AP01, o meio mais eficaz para a produção das três famílias de lipopeptídeos é o meio MM.

Tabela 10- Concentração inibitória mínima dos EBEL de *B. velezensis* LBBMA TR59II, LBBMA TR47II e LBBMA AP01, obtidos em diferentes meios de cultivo, contra o fitopatógeno *Colletotrichum truncatum*

	Meio de cultura*	48 horas	96 horas	144 horas
		CIM (mg L ⁻¹)		
TR59II	M523	*	250	250
	MM	*	*	1000
	MFS	500	1000	1000
TR47II	M523	62,5	125	250
	MM	250	500	1000
	MFS	*	500	500
AP01	M523	500	500	1000
	MM	500	125	250
	MFS	*	250	500

* M523: meio 523; MM: Meio Mineral, MFS: Meio Farelo de Soja. * Indica que não houve inibição do crescimento de *C. truncatum* superior a 90% na maior dose avaliada (1.000 mg L⁻¹). Para condições de cultivo dos isolados bacterianos, ver Tabela 3.

O conjunto dos dados reportados acima levam a concluir que, durante o cultivo, e independentemente do meio de cultura empregado, os isolados *B. velezensis* LBBMA TR59II, LBBMA TR47II e LBBMA AP01 produzem outros metabólitos distintos da surfactina, fengina e iturina. Esses compostos acabam sendo recuperados juntamente com os lipopeptídeos durante o processo de precipitação ácida, resultando numa menor concentração de agentes surfactantes e fungicidas na massa seca final que constitui os EBEL. Nesse aspecto, uma análise de metatranscriptômica e metabolômica nesses cultivos (especialmente comparando-se os dados entre diferentes meios de cultivo, cujas CIM dos EBEL obtidos são bem distintas) podem indicar quais vias metabólicas estão sendo expressas nas diferentes etapas e

condições de cultivo. O conhecimento desses metabólitos sem ação surfactante ou fungicida e das vias que levam à sua produção pode servir de base para trabalhos de silenciamento de genes que resulte em aumento da produção das moléculas de interesse (lipopeptídeos com ação fungicida).

Para se determinar qual o meio de cultivo mais adequado comercialmente para a produção de lipopeptídeos pelos isolados avaliados, sem se levar em conta as diferenças dos tempos de cultivo correspondentes aos menores valores de CIM (ver observação acima), foram considerados os custos dos componentes necessários à produção de cada meio. Calculou-se também a razão entre o rendimento de EBEL e a CIM em cada meio de cultivo. Essa razão indica quantas vezes o meio de cultivo pode ser diluído para ainda assim ter-se uma concentração de lipopeptídeos suficiente para inibir a germinação de pelo menos 90% dos esporos de *C. truncatum*. Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11- Valores das variáveis respostas CIM e rendimento de EBEL (mg L^{-1}), razão das duas variáveis respostas, preço dos meios de cultura (por litro) e a razão das variáveis e o preço dos meios de cultura

	Meio de cultura*	CIM 72h (mg L^{-1})	EBEL (mg L^{-1})	Razão (EBEL/CIM) ¹	Custo (por litro)	Razão / Custo ²
TR59II	M523	500	1.400	2,8	R\$ 6,33	0,44
	MM	1000	2.200	2,2	R\$ 4,84	0,45
	MFS	1000	1.100	1,1	R\$ 0,24	4,58
TR47II	M523	250	800	3,2	R\$ 6,33	0,50
	MM	1000	1.200	1,2	R\$ 4,84	0,24
	MFS	500	600	1,2	R\$ 0,24	5,00
AP01	M523	500	1.030	2,06	R\$ 6,33	0,32
	MM	250	1.520	6,08	R\$ 4,84	1,25
	MFS	500	1.270	2,54	R\$ 0,24	10,58

* M523: meio 523; MM: Meio Mineral, MFS: Meio Farelo de Soja. ¹ - informa quantas vezes o caldo de cultivo (sem passar por processo de concentração dos lipopeptídeos) naquele meio de cultura pode ser diluído e ainda assim manter uma atividade de inibição da germinação de pelo menos 90% dos esporos de *C. truncatum* (quanto maior, melhor). ² - medida indireta da eficiência econômica; considera a diluição máxima para ainda se manter a inibição da germinação de pelo menos 90% dos esporos de *C. truncatum* para cada R\$1,00 gasto com os componentes dos meios de cultura estudados (quanto maior, melhor).

Levando-se em consideração somente a razão Rendimento/CIM, o M523 é o meio de cultura mais indicado para a produção de lipopeptídeos com ação fungicida por *B. velezensis* LBBMA TR59II e LBBMA TR47II. Para *B. velezensis* LBBMA AP01, o meio mais favorável é o MM (Tabela 11). No entanto, quando se considera também o custo dos ingredientes (por litro), conclui-se que o MFS é o mais indicado para a produção de lipopeptídeos com ação fungicida por todos os isolados de *B. velezensis* estudados. Isso decorre do elevado custo com os reagentes que compõem os meios M523 e MM.

A análise dos dados apresentados nas Tabelas 6 a 10 demonstra que o MFS, a despeito de não apresentar os melhores resultados de rendimento de EBEL, espalhamento de óleo e CIM, é a melhor opção para a produção comercial de lipopeptídeos visando à obtenção de biofungicidas, dado o custo significativamente mais baixo. Por essa razão, esse meio foi selecionado para se prosseguir com os estudos de otimização da produção de lipopeptídeos com ação fungicida.

5.3 Otimização da produção de lipopeptídeos pela Metodologia de Superfície de Resposta

Os valores das variáveis-resposta rendimento de EBEL, diâmetro do halo de espalhamento de óleo (DHEO) e CIM obtidos em função da combinação de doses de açúcar comercial e farelo de soja utilizando-se o DCCR, para os três isolados de *B. velezensis*, estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12- Matriz experimental do DCCR para investigar a combinação das fontes de carbono, farelo de soja e açúcar cristal comercial (Ensaio 1) e suas variáveis respostas obtidas dos isolados *B. velezensis* LBBMA TR59II, TR47II e AP01

Unidade Experimental	Variáveis independentes		Variáveis resposta								
	Farelo de Soja (g L ⁻¹)	Açúcar cristal Comercial (g L ⁻¹)	----- EBEL (mg L ⁻¹) -----			---- Diâmetro do halo (cm) ----			----- CIM (mg L ⁻¹) -----		
			TR59II	TR47II	AP01	TR59II	TR47II	AP01	TR59II	TR47II	AP01
1	23	17,3	2.100	7.700	507	3,5	2,1	2,7	1000	1000	1000
2	23	52,7	2.000	1.200	970	1,3	1,6	2,6	500	*	*
3	87	17,3	3.500	2.400	1.670	6,4	6,2	5,3	125	250	250
4	87	52,7	5.300	2.700	2.600	5,6	6,3	5,1	250	250	250
5	55	10	2.200	1.500	930	4,5	5,2	4,0	250	500	500
6	55	60	5.100	2.100	1.700	2,4	2,6	3,5	250	1000	500
7	55	35	3.300	1.800	1.270	2,8	2,6	3,6	125	1000	500
8	55	35	4.100	1.800	1.330	3,1	3,2	2,8	250	500	500
9	55	35	3.100	1.800	1.300	1,8	3,0	3,9	125	*	500
10	10	35	1.200	700	600	1,8	0,75	1,3	*	*	*
11	100	35	4.800	2.700	2.630	7,6	6,3	5,2	125	125	125

* indica que não houve inibição do crescimento de *C. truncatum* superior a 90% na maior dose avaliada (1.000 mg L⁻¹). EBEL: rendimento do extrato bruto enriquecido com lipopeptídeos; CIM: concentração inibitória mínima.

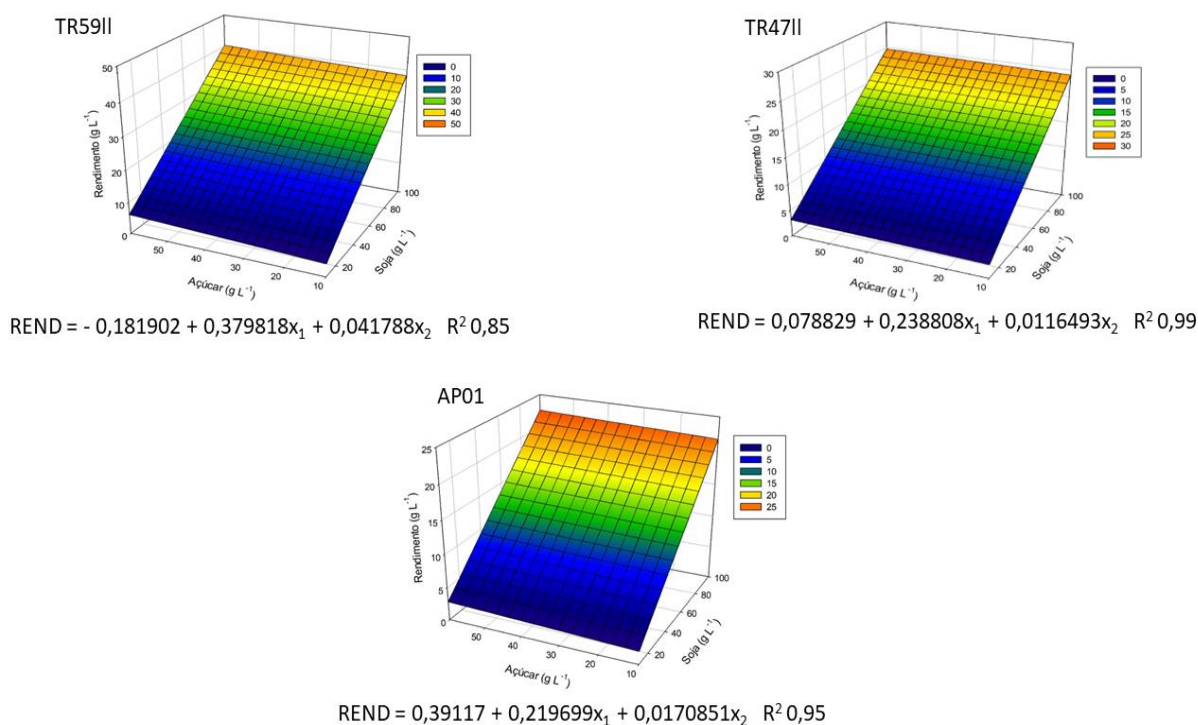
As equações ajustadas das variáveis dependentes analisadas em função da concentração de farelo de soja e de açúcar comercial, obtidas a partir dos dados experimentais obtidos (Tabela 12), estão apresentadas nas figuras 1, 2 e 3.

O rendimento do extrato bruto enriquecido com lipopeptídeos (g L^{-1}) aumentou significativamente com o aumento da concentração de farelo de soja nos meios de cultivo, para os três diferentes isolados (Figura 1). O isolado *B. velezensis* TR59II destacou-se por apresentar uma estimativa de resposta cerca de duas vezes superior à obtida com os isolados *B. velezensis* TR47II e *B. velezensis* AP01.

Considerando-se uma dada concentração de açúcar cristal comercial dentro da faixa de concentrações utilizadas (10 a 60 g L^{-1}), a cada aumento de 10 g L^{-1} de farelo de soja no meio de cultivo, o rendimento de EBEL de *B. velezensis* TR59II aumenta $0,38 \text{ g L}^{-1}$. Já para os demais isolados, o rendimento de EBEL aumenta $0,24$ e $0,22 \text{ g L}^{-1}$ para os isolados *B. velezensis* TR47II e AP01, respectivamente. Por outro lado, fixando-se a concentração de farelo de soja dentro da faixa utilizada (10 a 100 g L^{-1}), tem-se que a cada 10 g L^{-1} de açúcar cristal comercial por litro no meio de cultivo, o rendimento de EBEL de *B. velezensis* TR59II aumenta $0,4 \text{ g L}^{-1}$ e, para os demais isolados, cerca de $0,1 \text{ g L}^{-1}$ (Figura 1).

Embora tenha havido resposta significativa do EBEL para ambas as fontes de carbono, não foi possível encontrar um ponto de máximo para nenhum dos isolados, uma vez que não houve coeficientes negativos e significativos para os preditores x_1^2 e x_2^2 que representam, respectivamente, aqueles referentes às concentrações de farelo de soja e de açúcar cristal comercial no meio de cultivo.

Figura 1 - Superfície de resposta do EBEL (g L^{-1}) em função da concentração de farelo de soja (g L^{-1}) e de açúcar cristal comercial (g L^{-1}), após 72 horas de cultivo dos isolados de *B. velezensis* TR59II, TR47II e AP01.

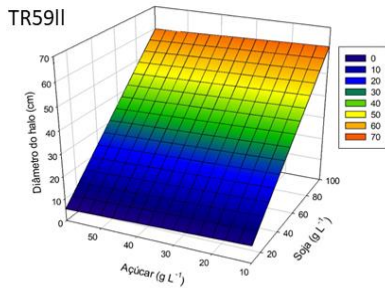


O espalhamento de óleo obtido com os sobrenadantes dos cultivos aumenta significativamente com o aumento da concentração de farelo de soja e diminui com o aumento da concentração de açúcar cristal comercial (Figura 2).

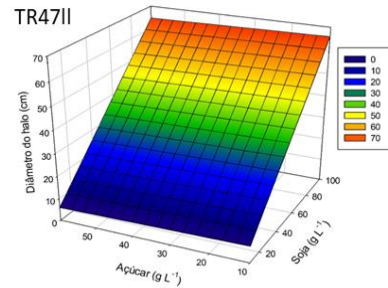
B. velezensis TR47II é o isolado que melhor responde ao aumento da concentração de farelo de soja no meio de cultivo; fixando-se uma concentração de açúcar dentro da faixa utilizada (10 a 60 g L^{-1}), estima-se um aumento do diâmetro do halo de espalhamento de óleo em $6,5 \text{ mm}$ para cada 10 g L^{-1} de farelo de soja adicionados ao meio de cultivo.

O diâmetro do halo de espalhamento de óleo obtido com os sobrenadantes das culturas respondeu negativamente à adição de açúcar cristal ao meio de cultivo (Figura 2). O isolado *B. velezensis* TR59II foi o que apresentou a maior redução em resposta ao aumento da concentração de açúcar no meio de cultivo. Para essa variável, o maior valor estimado médio, para os três isolados bacterianos estudados, é obtido no maior nível de farelo de soja estudado (100 g L^{-1}) e no menor nível de açúcar.

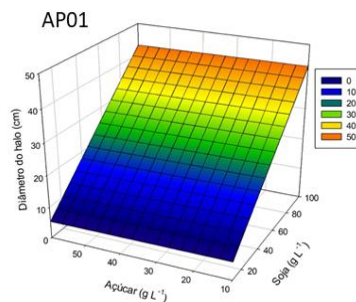
Figura 2- Superfície de resposta do diâmetro do halo (cm) em função da concentração de farelo de soja (g L^{-1}) e de açúcar cristal comercial (g L^{-1}), após 72 horas de cultivo dos isolados de *B. velezensis* TR59II, TR47II e AP01.



$$\text{ESP} = 1,94184 + 0,603241x_1 - 0,0433932x_2 \quad R^2 0,80$$



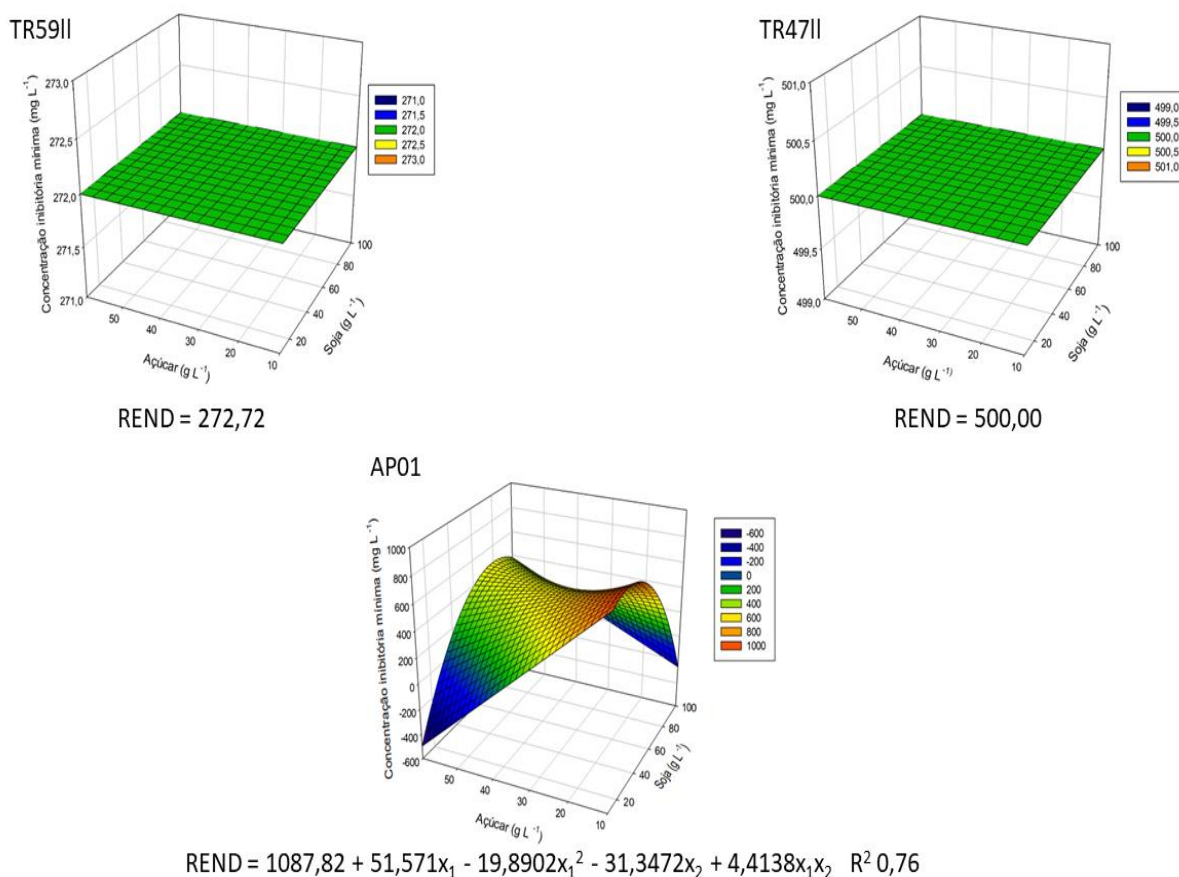
$$\text{ESP} = 1,04554 + 0,652283x_1 - 0,0280885x_2 \quad R^2 0,90$$



$$\text{ESP} = 1,64488 + 0,417751x_1 - 0,0079679x_2 \quad R^2 0,91$$

Dentro da faixa de concentrações testadas para as duas fontes de carbono, a concentração inibitória mínima não respondeu significativamente ao aumento das concentrações nem de farelo de soja e nem de açúcar cristal comercial para os isolados *B. velezensis* TR59II e *B. velezensis* TR47II (Figura 3). Calculou-se, dessa forma, a concentração inibitória mínima média dos EBEL obtidos nos diferentes meios de cultivo, cujos valores foram de 272,7 e 500,0 mg L^{-1} para os isolados *B. velezensis* TR59II e *B. velezensis* TR47II, respectivamente. Em relação ao isolado *B. velezensis* AP01, a concentração de ambas as fontes de carbono afetou significativamente a CIM, destacando-se que, nesse caso, a resposta dependeu de uma interação significativa entre ambas as fontes de carbono.

Figura 3 - Superfície de resposta da concentração inibitória mínima (mg L⁻¹ de EBEL) em função da concentração de farelo de soja (g L⁻¹) e de açúcar cristal comercial (g L⁻¹), após 144 horas de incubação da microplaca de 96 poços dos isolados de *B. velezensis* TR59II, TR47II e AP01.



De acordo com os modelos ajustados, não foi possível encontrar um ponto de máximo dentro da faixa de concentração de farelo de soja e açúcar cristal comercial utilizadas. Entretanto, a combinação desses fatores resultou em diferenças no rendimento de extrato bruto enriquecido em lipopeptídeos, o que influenciou o valor de diluição dos sobrenadantes das culturas capaz de ainda manter uma atividade de inibição de *C. truncatum* superior a 90% (Tabela 13). Esse valor foi estimado pela razão entre o rendimento de EBEL e a CIM. A título de exemplo, para o isolado *B. velezensis* LBBMA TR59II, o cultivo no meio de cultura correspondente à unidade experimental 1 resultou em um produto cuja diluição para manter a atividade de inibição de *C. truncatum* em pelo menos 90% é de apenas 2,1 vezes; já o cultivo no meio correspondente à unidade experimental 11 resulta em um sobrenadante que

pode ser diluído 38,4 vezes e ainda assim manter sua atividade de inibição de *C. truncatum*.

A partir dos dados obtidos na etapa anterior, definiu-se uma composição de meio de cultivo para se prosseguir com a definição da melhor combinação dos fatores temperatura e pH (Ensaio 2). Os critérios adotados na seleção do meio de cultivo foram a razão EBEL/CIM (Tabela 13) e o custo total com ingredientes para o preparo do meio de cultivo (dados não-apresentados).

Para o isolado *B. velezensis* LBBMA TR59II, as melhores combinações entre as duas fontes de carbono foram as que compõem as unidades experimentais 7 (55 g L⁻¹ de farelo de soja e 35 g L⁻¹ de açúcar cristal comercial), com um valor EBEL/MIC de 26,93, e a unidade experimental 11 (100 g L⁻¹ de farelo de soja e 35 g L⁻¹ de açúcar cristal comercial), com um valor EBEL/CIM de 38,40. Para o isolado *B. velezensis* LBBMA TR47II, a melhor combinação foi a unidade experimental 3 (87 g L⁻¹ de farelo de soja e 17,3 g L⁻¹ de açúcar cristal comercial), com valor de EBEL/CIM de 9,73. Para o isolado *B. velezensis* LBBMA AP01, a combinação mais adequada foi também a unidade experimental 11, onde se obteve uma razão EBEL/CIM de 21,07.

Os resultados obtidos demonstram a influência das fontes de carbono e suas combinações na produção dos lipopeptídeos com atividade surfactante e antifúngica pelos isolados de *B. velezensis* estudados.

Tabela 13- Matriz experimental do DCCR para se investigar o efeito da combinação das fontes de carbono farelo de soja e açúcar cristal comercial (Ensaio 1) sobre as variáveis resposta rendimento de EBEL, diâmetro de espalhamento de óleo, CIM e razão EBEL/CIM para os isolados de *B. velezensis* TR59II, TR47II e AP01.

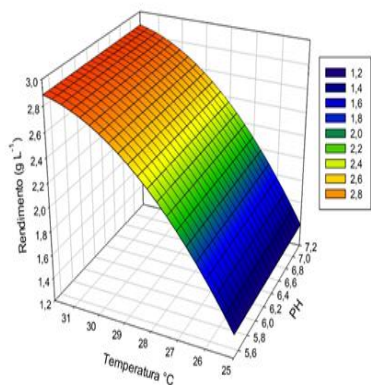
Unidade Experimental	Farelo de Soja (g L ⁻¹)	Açúcar Comercial (g L ⁻¹)	EBEL TR59II	ESPAL TR59II	CIM TR59II	EBEL/CIM TR59II	EBEL TR47II	ESPAL TR47II	CIM TR47II	EBEL/CIM TR47II	EBEL AP01	ESPAL AP01	CIM AP01	EBEL/CIM AP01
1	23	17,3	2.100	3,5	1.000	2,10	730	2,1	1.000	0,73	570	2,7	1.000	0,57
2	23	52,7	2.030	1,3	500	4,07	1.200	1,6	*		970	2,6	*	
3	87	17,3	3.500	6,4	125	28,00	2.430	6,2	250	9,73	1.670	5,3	250	6,67
4	87	52,7	5.330	5,6	250	21,33	2.770	6,3	250	11,07	2.600	5,1	250	10,40
5	55	10	2.200	4,5	250	8,80	1.530	5,2	500	3,07	930	4,0	500	1,87
6	55	60	5.130	2,4	250	20,53	2.130	2,6	1.000	2,13	1.700	3,5	500	3,40
7	55	35	3.370	2,8	125	26,93	1.800	2,6	1.000	1,80	1.270	3,6	500	2,53
8	55	35	4.170	3,1	250	16,67	1.800	3,2	500	3,60	1.330	2,8	500	2,67
9	55	35	3.170	1,8	125	25,33	1.870	3,0	*		1.300	3,9	500	2,60
10	10	35	1.270	1,8	*		770	0,7	*		600	1,3	*	
11	100	35	4.800	7,6	125	38,40	2.770	6,3	1.000	2,77	2.630	5,2	125	21,07

* indica que não houve inibição do crescimento de *C. truncatum* superior a 90% na maior dose avaliada (1.000 mg L⁻¹). EBEL: rendimento do extrato bruto enriquecido com lipopeptídeos (em mg L⁻¹). ESPAL: diâmetro do halo de espalhamento de óleo (em cm). CIM: concentração inibitória mínima do EBEL (em mg L⁻¹). EBEL/CIM: razão em rendimento do extrato bruto enriquecido com lipopeptídeos e concentração inibitória mínima (adimensional).

As equações ajustadas das variáveis dependentes analisadas em função das diferentes combinações de pH e temperatura (Ensaio 2), obtidas a partir dos dados experimentais obtidos (Tabela 12), estão apresentadas nas figuras 4 a 6.

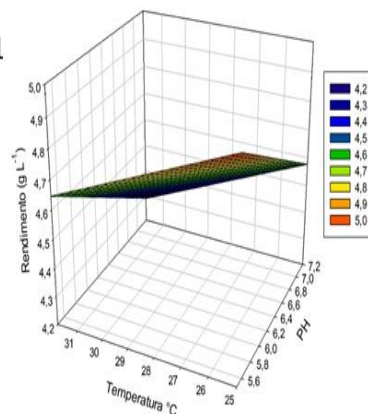
Figura 4 - Superfície de resposta do rendimento de EBEL (g L^{-1}) em função das faixas de pH e temperatura ($^{\circ}\text{C}$), após 72 horas de cultivo dos isolados de *B. velezensis* TR59II em meio 7, TR59II em meio 11, TR47II em meio 3 e AP01 em meio 11.

TR59II M7



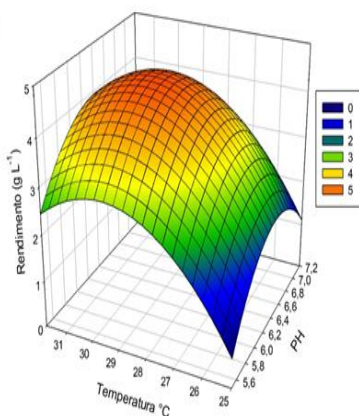
$$\text{EBEL} = -24,1973 + 1,65664x_2 - 0,0253155x_2^2 \quad R^2 = 0,57$$

TR59II M11



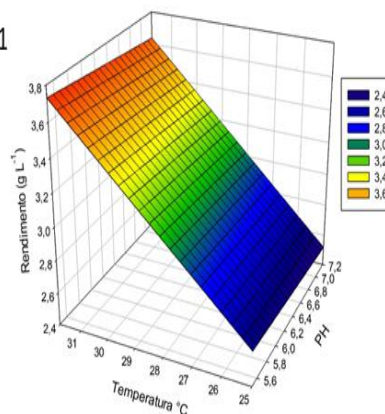
$$\text{EBEL} = 7,15197 - 0,210185x_1 - 0,0424453x_2 \quad R^2 = 0,194$$

TR47II M3



$$\text{EBEL} = -169,241 + 22,09446x_1 - 1,71765x_1^2 + 6,95671x_2 - 0,11777x_2^2 \quad R^2 = 0,51$$

AP01 M11



$$\text{EBEL} = -1,19604 - 0,0555556x_1 + 0,16456x_2 \quad R^2 = 0,19$$

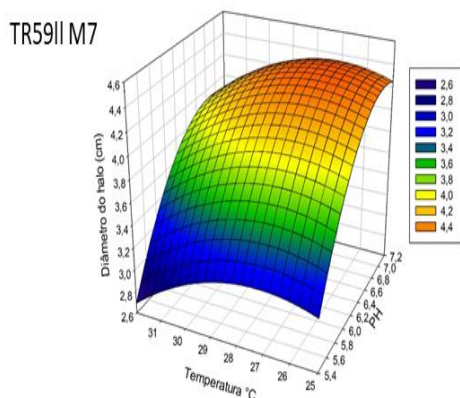
O modelo ajustado para o rendimento do extrato bruto enriquecido com lipopeptídeos (EBEL) (g L^{-1}) obtido para o isolado LBBMA TR59II cultivado no meio 7 (55 g L^{-1} de farelo de soja e 35 g L^{-1} de açúcar comercial), revelou que o pH, na faixa utilizada, não influenciou o rendimento da produção do EBEL, sendo essa variável, portanto, excluída da equação. Ao se analisar o gráfico de superfície de resposta, observa-se uma tendência para aumento da produção de

EBEL com o aumento da temperatura. Quando o mesmo isolado é cultivado em meio 11 (100 g L⁻¹ de farelo de soja e 35 g L⁻¹ de açúcar comercial), o modelo ajustado indica uma influência de ambas as variáveis (pH e temperatura) sobre a produção de EBEL. Segundo o modelo, o aumento do pH e/ou da temperatura está associado a uma diminuição na produção do EBEL. Desse modo, torna-se necessário o ajuste de ambas as variáveis para se atingir o valor máximo na produção de lipopeptídeos.

De acordo com o modelo estabelecido para o isolado LBBMA TR47II cultivado em meio 3 (87 g L⁻¹ de farelo de soja e 17,3 g L⁻¹ de açúcar comercial), ambos os fatores estudados exerceram influência significativa na produção de EBEL. A partir da derivação da equação, é possível determinar que a condição ótima para a produção de EBEL pode ser alcançada em pH 6,4 e temperatura de 29,5 °C.

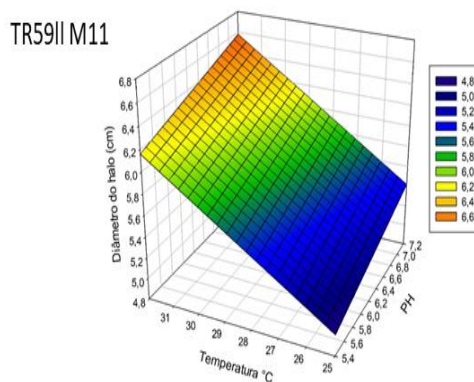
Para o isolado LBBMA AP01 cultivado em meio 11 (100 g L⁻¹ de farelo de soja e 35 g L⁻¹ de açúcar comercial), não foi possível determinar os valores ótimos dos fatores pH e temperatura para a produção de EBEL. No entanto, com base no gráfico de superfície de resposta, nota-se que a temperatura influencia a produção de EBEL, indicando que um aumento na temperatura está associado a um aumento na produção.

Figura 5 - Superfície de resposta do diâmetro do halo de espalhamento de óleo (cm) em função das faixas de pH e temperatura (°C), após 72 horas de cultivo de três diferentes isolados *B. velezensis* TR59II em meio 7, TR59II em meio 11, TR47II em meio 3 e AP01 em meio 1.

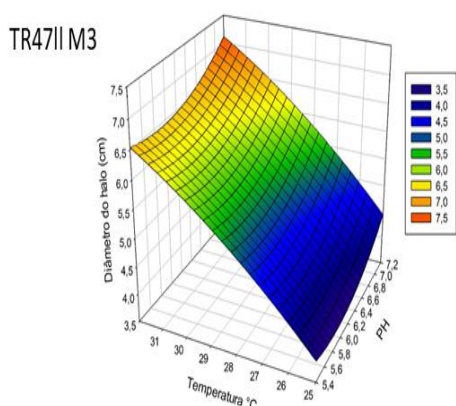


$$ESP = -36,3633 + 7,53381x_1 - 0,546307x_1^2 + 1,08961x_2 - 0,0200817x_2^2$$

$$R^2 = 0,70$$

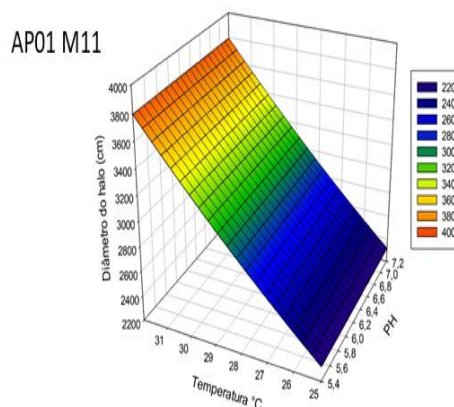


$$ESP = -0,405997 + 0,233589x_1 + 0,165720x_2 \quad R^2 = 0,187$$



$$ESP = -3,72843 - 4,98184x_1 + 0,420709x_1^2 + 1,28671x_2 - 0,0158932x_2^2$$

$$R^2 = 0,81$$



$$ESP = 35,4456 - 3,33119x_1 + 0,322485x_1^2 - 1,86159x_2 + 3,73428x_2^2$$

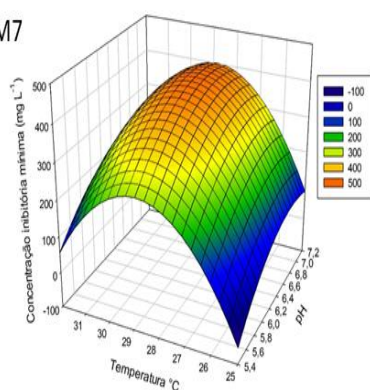
$$R^2 = 0,87$$

A avaliação da variável espalhamento de óleo em placa revela que o modelo ajustado com regressão quadrática indica a influência de ambos os fatores na formação do halo de espalhamento para o isolado LBBMA TR59II cultivado em Meio 7. A condição ótima para obtenção de um maior diâmetro de halo foi definida derivando-se a equação, estabelecendo-se o pH de 6,8 e a temperatura de 27 °C como ótimas. Não foi possível definir uma condição ótima para o diâmetro do halo de espalhamento de óleo quando o mesmo isolado foi cultivado no meio 11. Entretanto, ao se observar a superfície de resposta, nota-se que o aumento da temperatura e do pH influenciam no aumento do diâmetro do halo, ou seja, na produção de lipopeptídeos com ação de superfície.

Para os isolados LBBMA TR47II e LBBMA AP01, não foi possível determinar um ponto de máximo para o diâmetro do halo de espalhamento, apesar dos modelos de regressão apresentarem modelos quadráticos. Contudo, pela análise da superfície de resposta, evidencia-se que o aumento da temperatura influencia no aumento do diâmetro do halo obtido com os sobrenadantes dos dois isolados.

Figura 6 - Superfície de resposta da concentração inibitória mínima (mg L⁻¹ de EBEL) em função das faixas de pH e temperatura (°C), após 72 horas de cultivo dos isolados de *B. velezensis* TR59II em meio 7, TR59II em meio 11, TR47II em meio 3 e AP01 em meio 11.

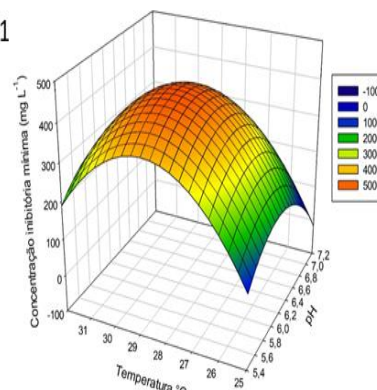
TR59II M7



$$\text{CIM} = -21257,3 + 1196,28x_1 - 88,8650x_1^2 + 1222,86x_2 - 21,1791x_2^2$$

$$R^2 = 0,64$$

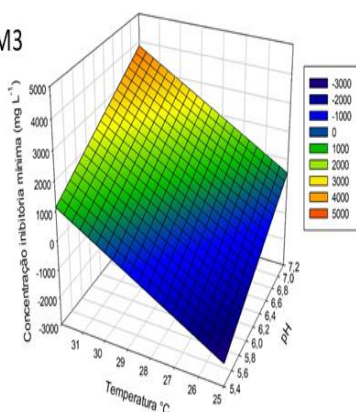
TR59II M11



$$\text{CIM} = -20247,0 + 1938,66x_1 - 158,961x_1^2 + 1024,23x_2 - 17,7476x_2^2$$

$$R^2 = 0,65$$

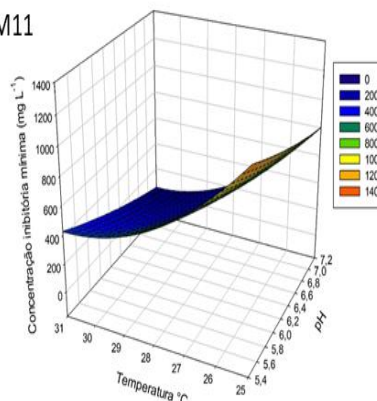
TR47II M3



$$\text{CIM} = -22277,8 + 1508,84x_1 + 476,641x_2$$

$$R^2 = 0,28$$

AP01 M11



$$\text{CIM} = 23397,2 - 613,621x_1 + 31,9045x_1^2 - 1331,33x_2 + 21,5253x_2^2$$

$$R^2 = 0,75$$

A análise dos modelos ajustados para o isolado LBBMA TR59II (Figura 6) revela a influência de ambos os fatores na produção de lipopeptídeos (fengicina

e/ou iturina; Deleu et al., 1999) capazes de inibir o crescimento do fungo fitopatogênico *C. truncatum*.

Não foi encontrada condição ótima para se atingir o menor valor da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em ambos os meios testados (7 e 11), uma vez que o delineamento apresentou ponto de máximo, e não de mínimo. Dessa forma, diferentes combinações de pH e temperatura podem apresentar melhor resultado de inibição.

Em relação ao isolado LBBMA TR47II, não foi possível determinar a melhor combinação dos fatores para se alcançar a menor CIM, uma vez que se trata de um modelo linear, não havendo termos quadráticos. Portanto, novas faixas de ambos os fatores devem ser investigadas para que se possa determinar um valor mínimo de CIM em resposta à temperatura e pH durante o cultivo desse isolado.

O modelo ajustado obtido para o isolado LBBMA AP01 mostrou um ponto de mínimo em relação à faixa de temperatura estudada. Ao se analisar a superfície de resposta, é possível observar que os menores valores de CIM são obtidos em valores de pH entre 6,0 e 7,0.

Fonte de carbono, pH, temperatura e aeração são fatores que afetam a produção de lipopeptídeos. Outros fatores também são descritos como capazes de afetar a produção dessas moléculas, a exemplo da concentração de cátions divalentes no meio de cultivo (Inés et al., 2015). Lin et al. (2007) estimularam a produção de iturina A de *Bacillus amyloliquefaciens* B128 pela adição de Fe^{2+} , após a adequação da concentração de diferentes fontes de carbono e do pH inicial. Abushady et al. (2005) relataram o aumento da produção de surfactina com a adição $MnSO_4$ e $FeSO_4$ ao meio de cultura.

Na tabela 14 encontram-se os valores dos dados experimentais obtidos após os dois ensaios de otimização, a matriz experimental e a razão EBEL/CIM, a qual define qual é a diluição máxima do sobrenadante de cada cultura capaz de manter uma atividade de inibição de pelo menos 90% do crescimento de *C. truncatum*.

Tabela 14- Matriz experimental do DCCR para se investigar o efeito das combinações de pH e temperatura (Ensaio 2) sobre as variáveis resposta rendimento de EBEL, diâmetro de espalhamento de óleo, CIM e razão EBEL/CIM para os isolados de *B. velezensis* TR59II, TR47II e AP01.

Unidade Experimental	pH	Temperatura	EBEL	ESPAL	CIM	EBEL/CIM	EBEL	ESPAL	CIM	EBEL/CIM	EBEL	ESPAL	CIM	EBEL/CIM	EBEL	ESPAL	CIM	EBEL/CIM
			TR59II	TR59II	TR59II	TR59II	TR59II	TR59II	TR59II	TR59II	TR59II	TR59II	TR47II	TR47II	TR47II	TR47II	AP01	AP01
			M7	M7	M7	M7	M11	M11	M11	M11	M3	M3	M3	M3	M11	M11	M11	M11
1	5,8	26,2	1.500	3,95	250	6,00	2.870	6,4	125	22,96	2.000	4,1	250	8,00	2.400	4,0	1000	2,40
2	5,8	31,8	3.530	2,90	125	28,27	4.870	7,5	250	19,47	3.470	6,8	1000	3,47	3.870	5,9	500	7,73
3	7,2	26,2	1.500	4,65	125	12,00	3.800	6,8	125	30,40	2.230	4,3	500	4,47	2.130	4,5	250	8,53
4	7,2	31,8	3.300	4,00	125	26,40	4.030	6,9	62,5	64,53	3.670	7	1000	3,67	5.200	7,2	125	41,60
5	6,5	25	1.900	3,85	125	15,20	6.000	4,2	250	24,00	2.530	4,5	125	20,27	2.770	4,5	1000	2,77
6	6,5	33	2.200	3,85	125	17,60	3.770	6	125	30,13	2.500	6,5	500	5,00	2.200	6,1	125	17,60
7	6,5	29	2.300	4,05	500	4,60	3.900	5,1	500	7,80	5.130	5,8	250	20,53	3.600	5,0	250	14,40
8	6,5	29	2.230	4,35	500	4,47	3.870	5,2	500	7,73	5.830	6,0	250	23,33	3.570	4,4	250	14,27
9	6,5	29	2.800	4,30	250	11,20	7.170	4,8	250	28,67	2.530	4,9	500	5,07	3.870	5,0	250	15,47
10	5,5	29	2.770	3,40	250	11,07	5.370	5,4	500	10,73	3.300	5,3	1000	3,30	3.370	3,9	250	13,47
11	7,5	29	2.470	3,85	500	4,93	4.470	6,5	125	35,73	2.070	7	500	4,13	2.400	6,1	250	9,60

EBEL: rendimento do extrato bruto enriquecido com lipopeptídeos (em mg L⁻¹). ESPAL: diâmetro do halo de espalhamento de óleo (em cm). CIM: concentração inibitória mínima do EBEL (em mg L⁻¹). EBEL/CIM: razão em rendimento do extrato bruto enriquecido com lipopeptídeos e concentração inibitória mínima (adimensional).

Apesar de não ter sido possível encontrar pontos de ótimo em todos os parâmetros investigados (rendimento do extrato bruto enriquecido em lipopeptídeos, diâmetro do halo de espalhamento de óleo e concentração inibitória mínima) para os isolados estudados após os dois ensaios de otimização (combinações de concentrações de farelo de soja e açúcar comercial e combinações de pH e temperatura), foi obtido um aumento de 26 vezes da razão EBEL/CIM obtida com o isolado *B. velezensis* LBBMA TR59II, quando cultivado em M7, e de 59 vezes quando cultivado em M11. Para o isolado *B. velezensis* TR47II, o aumento dessa relação foi de 19 vezes e, para o isolado *B. velezensis* LBBMA AP01, o aumento foi de 16 vezes (Tabelas 15 a 19). Esse ganho de eficiência, expresso pela razão EBEL/CIM, é muito superior à elevação do custo com ingredientes necessários à preparação do meio sem otimização e dos meios otimizados.

Tabela 15- Eficiência de produção de lipopeptídeos com atividade fungicida por *B. velezensis* LBBMA TR59II no meio original (30 g L⁻¹ farelo de soja, pH 6,5 e temperatura de incubação de 30 °C) e no meio selecionado M7 (55 g L⁻¹ farelo de soja e 35 g L⁻¹ açúcar cristal comercial, pH 5,8 e temperatura de incubação de 31,8 °C).

TR59II	Meio original				Após otimização (M7)			
	EBEL	CIM	Razão EBEL/CIM	Custo*	EBEL	CIM	Razão EBEL/CIM	Custo
	1100	1000	1,1	0,24	3.530	125	28,27	0,60

* Refere-se ao custo com a aquisição dos ingredientes para o preparo de 1 litro do meio de cultivo (em R\$/litro), com base em valores praticados no comércio. EBEL - Rendimento do extrato bruto enriquecido com lipopeptídeos (mg L⁻¹); CIM – concentração de EBEL (mg L⁻¹) necessária para se inibir a germinação de esporos e subsequente crescimento de *C. truncatum* em pelo menos 90%.

Tabela 16- Eficiência de produção de lipopeptídeos com atividade fungicida por *B. velezensis* LBBMA TR59II no meio original (30 g L⁻¹ farelo de soja, pH 6,5 e temperatura de incubação de 30 °C) e no meio selecionado M11 (100 g L⁻¹ farelo de soja e 35 g L⁻¹ açúcar cristal comercial, pH 7,2 e temperatura de incubação de 31,8 °C).

TR59II	Meio original				Após otimização (M11)			
	EBEL	CIM	Razão EBEL/CIM	Custo*	EBEL	CIM	Razão EBEL/CIM	Custo
	1100	1000	1,1	0,24	4.030	62,5	64,53	0,96

* Refere-se ao custo com a aquisição dos ingredientes para o preparo de 1 litro do meio de cultivo (em R\$/litro), com base em valores praticados no comércio. EBEL - Rendimento

do extrato bruto enriquecido com lipopeptídeos (mg L^{-1}); CIM – concentração de EBEL (mg L^{-1}) necessária para se inibir a germinação de esporos e subsequente crescimento de *C. truncatum* em pelo menos 90%.

Tabela 17- Eficiência de produção de lipopeptídeos com atividade fungicida por *B. velezensis* LBBMA TR47II no meio original (30 g L^{-1} farelo de soja, pH 6,5 e temperatura de incubação de $30 \text{ }^\circ\text{C}$) e no meio selecionado M3 (87 g L^{-1} farelo de soja e $17,3 \text{ g L}^{-1}$ açúcar cristal comercial, pH 6,5 e temperatura de incubação de $29 \text{ }^\circ\text{C}$).

TR47II	Meio original				Após otimização (M3)			
	EBEL	CIM	Razão EBEL/CIM	Custo*	EBEL	CIM	Razão EBEL/CIM	Custo
	600	500	1,2	0,24	5.830	250	23,33	0,77

* Refere-se ao custo com a aquisição dos ingredientes para o preparo de 1 litro do meio de cultivo (em R\$/litro), com base em valores praticados no comércio. EBEL - Rendimento do extrato bruto enriquecido com lipopeptídeos (mg L^{-1}); CIM – concentração de EBEL (mg L^{-1}) necessária para se inibir a germinação de esporos e subsequente crescimento de *C. truncatum* em pelo menos 90%.

Tabela 18- Eficiência de produção de lipopeptídeos com atividade fungicida por *B. velezensis* LBBMA AP01 no meio original (30 g L^{-1} farelo de soja, pH 6,5 e temperatura de incubação de $30 \text{ }^\circ\text{C}$) e no meio selecionado (100 g L^{-1} farelo de soja e 35 g L^{-1} açúcar cristal comercial, pH 7,2 e temperatura de incubação de $31,8 \text{ }^\circ\text{C}$).

AP01	Meio original				Após otimização (M11)			
	EBEL	CIM	Razão EBEL/CIM	Custo*	EBEL	CIM	Razão EBEL/CIM	Custo
	1270	500	2,54	0,24	5.200	125	41,60	0,96

* Refere-se ao custo com a aquisição dos ingredientes para o preparo de 1 litro do meio de cultivo (em R\$/litro), com base em valores praticados no comércio. EBEL - Rendimento do extrato bruto enriquecido com lipopeptídeos (mg L^{-1}); CIM – concentração de EBEL (mg L^{-1}) necessária para se inibir a germinação de esporos e subsequente crescimento de *C. truncatum* em pelo menos 90%.

Yoneda et al. (2006) propuseram, em sua patente, a otimização da produção de surfactina por uma linhagem geneticamente modificada de *Bacillus subtilis* SD901 (FERM BP-7666) utilizando um meio de cultura contendo farelo de soja e outros componentes (KHPO , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, extrato de levedura, maltose, L-triptofano, L-arginina). Após a otimização, a produção de surfactina atingiu concentrações de até 50 g L^{-1} em cultura, valor muito superior ao comumente reportado por outros autores. Abdel-Mawgoud et al. (2008) obtiveram aumento da produção de surfactina por *Bacillus*

subtilis BS5 em três vezes, atingindo uma produção de 1,12 g L⁻¹, com uma formulação de meio de sais minerais modificado com melão e NaNO₃.

A produção de lipopeptídeos é significativamente influenciada por fatores relacionados ao cultivo, tais como fontes de carbono e nitrogênio, temperatura, pH, agitação e aeração, dentre outros (Abdel-Mawgoud et al., 2008). Destaca-se que a fonte de carbono é um dos fatores-chaves da produção, representando cerca de 30% do custo de produção (Rangarajan et al., 2015).

Considerando-se a aplicação de *B. velezensis* para o controle de fungos fitopatogênicos, deve-se destacar que sua ação depende da presença e da concentração de lipopeptídeos no produto comercial e na calda preparada para aplicação foliar. Para haver efetividade no controle, é necessário que, após a diluição do produto comercial na água de aplicação, a concentração das moléculas com efeito fungicida (particularmente fengicina e iturina) seja suficiente para impedir a germinação de esporos e o subsequente crescimento das hifas dos patógenos. Assim, a definição de uma variável que indique a diluição máxima alcançável pelo produto comercial é essencial para se definir a melhor condição de cultivo de *B. velezensis* visando ao seu uso como agente de biocontrole. Neste trabalho, essa variável foi definida como sendo a razão entre o rendimento de produção de extrato liofilizado enriquecido em lipopeptídeos (EBEL) e a concentração inibitória mínima (Tabelas 11 a 18). Demonstrou-se que essa razão é muito influenciada pelas condições de cultivo. Pode-se a partir dela e do custo com os componentes do meio de cultivo calcular-se qual o custo com insumos para se obter uma cultura suficiente para se preparar 100 litros de calda para aplicação. Tomando-se como exemplo os dados apresentados na Tabela 14 para *B. velezensis* TR59II, tem-se que, na condição original de cultivo (30 g L⁻¹ farelo de soja, pH 6,5 e temperatura de incubação de 30 °C), são gastos R\$21,80 com os ingredientes do meio de cultura para cada 100 litros de calda para aplicação foliar (100/EBEL/CIM) x R\$/litro). Já na condição otimizada, esse custo é de apenas R\$1,48, uma redução de quase 15 vezes.

Tendo-se em consideração o elevado custo associado a processos biotecnológicos, conclui-se que a definição das condições de cultivo mais apropriadas para a produção de lipopeptídeos é uma etapa importante para se viabilizar a produção dessas biomoléculas em escala comercial. Isso é especialmente relevante quando essas moléculas são empregadas em larga

escala, a exemplo do seu uso para o controle de fitopatógenos que afetam culturas agrícolas estabelecidas em milhões de hectares somente no Brasil. Além disso, o ganho de eficiência nos processos biotecnológicos, como aqui reportado, serve como indutor de novas pesquisas correlatas, com foco no controle de fitopatógenos e no desenvolvimento de estratégias mais sustentáveis para a produção de culturas agrícola.

6. CONCLUSÕES

Parâmetros de cultivo como fonte de carbono, pH e temperatura afetam a produção dos lipopeptídeos pelos isolados de *B. velezensis* LBBMA TR59II, LBBMA TR47II e LBBMA AP01.

Ensaio de otimização baseado em Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), as condições ótimas de cultivo do isolado TR59II para a obtenção de maior halo de espalhamento de óleo foram definidas como 55 g L⁻¹ de farelo de soja, 35 g L⁻¹ de açúcar comercial, pH de 6,8 e temperatura de 27 °C. Para esse mesmo isolado, duas condições ótimas para se atingir o menor valor da Concentração Inibitória Mínima (CIM) contra o patógeno *Colletotrichum truncatum* foram estabelecidas: uma em 55 g L⁻¹ de farelo de soja e 35 g L⁻¹ de açúcar comercial, pH 6,7 e temperatura de 28,8 °C e outra em 100 g L⁻¹ de farelo de soja, 35 g L⁻¹ de açúcar comercial, pH 6,1 e temperatura de 28,8 °C. Para o isolado LBBMA TR47II, condições ótimas de cultivo foram obtidas apenas para a produção de EBEL, estabelecida em 87 g L⁻¹ de farelo de soja, 17,3 g L⁻¹ de açúcar comercial, pH 6,4 e temperatura de 29,5 °C. Já para o isolado LBBMA AP01, não foi possível encontrar condições ótimas para nenhuma das variáveis respostas dentro dos intervalos investigados.

A análise da relação entre o rendimento de extrato bruto enriquecido em lipopeptídeos (EBEL) e a concentração inibitória mínima (EBEL/CIM) permitiu definir as condições de cultivo mais favoráveis. Em comparação ao meio e condições de cultivo previamente adotadas de pH e temperatura, nas condições estabelecidas pela análise da relação EBEM/CIM, obteve-se um aumento de 59 vezes para o isolado *B. velezensis* LBBMA TR59II, de 19 vezes para o isolado *B. velezensis* LBBMA TR47II e de 16 vezes para o isolado *B. velezensis* LBBMA AP01.

O meio de cultivo preparado a base de farelo de soja e açúcar comercial (sacarose), apesar de não propiciar o maior rendimento de produção de lipopeptídeos, foi o que apresentou o maior potencial (melhor relação custo/benefício) para a produção comercial de lipopeptídeos com vistas ao seu uso no controle de fungos fitopatogênicos.

Novos estudos em escalas piloto e industrial devem ser realizados com vistas a se avaliar a viabilidade técnica e econômica da utilização do farelo de soja para a produção comercial de lipopeptídeos para sua aplicação no controle de doenças fúngicas em plantas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MAWGOUD, A. M.; ABOULWAFI, M. M.; HASSOUNA, N. A. H. Optimization of surfactin production by *Bacillus subtilis* isolate BS5. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 150, n. 3, p. 305–325, 2008.

ABUSHADY et al. Molecular Characterization of *Bacillus subtilis* Surfactin Producing Strain and the Factors Affecting its Production. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 7, n. 3, 2005.

ALMEIDA, M. Produção de surfactina pela linhagem geneticamente modificada *Bacillus subtilis* lbbma ri4914 isrfa utilizando glicerol como fonte de carbono. **Universidade Federal de Viçosa**, 2022.

ARAGÃO, Adalberto et al. o agro no brasil e no mundo: uma síntese do período de 2000 a 2020. Disponível em: . Acesso em: 24 abril. 2023

ASAKA, O; SHODA, M. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 11, p. 4081–4085, 1996.

BOLIVAR-ANILLO, H. J. et al. as Potential Biocontrol Agent against *Botrytis cinerea*. **Biology**, v. 10, n. 492, p. 2–26, 2021.

BOUFLEUR, Thais R.; CIAMPI-GUILLARDI, Maisa; TIKAMI, Ísis; ROGÉRIO, Flávia; THON, Michael R.; SUKNO, Serenella A.; MASSOLA JÚNIOR, Nelson S.; BARONCELLI, Riccardo. Soybean anthracnose caused by *Colletotrichum* species: current status and future prospects. **Molecular Plant Pathology**, [S.L.], v. 22, n. 4, p. 393-409, 20 fev. 2021.

CONAGIN, A. Delineamentos "compostos centrais ortogonais, rotacionais e divisíveis em blocos". *Revista Científica do Instituto Agrônomo*, v. 41, n. 5, 1982.

CHEN, S. et al. Inherent Resistance to 14 α -Demethylation Inhibitor Fungicides in *Colletotrichum truncatum* Is Likely Linked to *CYP51A* and/or *CYP51B* Gene Variants. **Phytopathology**, v. 108, n.11, p. 1224-1336, 2018.

D'AES, J. et al. Biosurfactants in plant-*Pseudomonas* interactions and their importance to biocontrol. **Environmental Microbiology Reports**, v. 2, n. 3, p. 359–372, 2010.

DAMM, U.; SATO, T.; ALIZADEH, A.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W.. The *Colletotrichum dracaenophilum*, *C. magnum* and *C. orchidearum*

species complexes. *Studies In Mycology*, [S.L.], v. 92, n. 1, p. 1-46, 1 mar. 2019. Westerdijk Fungal Biodiversity Institute.

DA SILVA, F. S. P. et al. Unexplored Brazilian oceanic island host high salt tolerant biosurfactant-producing bacterial strains. **Extremophiles**, v. 19, p. 561–572, 2015.

DA SILVA, L.L., MORENO, H.L.A., CORREIA, H.L.N. *et al.* *Colletotrichum*: species complexes, lifestyle, and peculiarities of some sources of genetic variability. **Appl Microbiol Biotechnol** 104, 1891–1904 (2020).

DEFILIPPI, S. et al. Fungal Competitors Affect Production of Antimicrobial Lipopeptides in *Bacillus subtilis* Strain B9–5. **Journal of Chemical Ecology**, v. 44, p. 374–383, 2018.

DELEU, M. et al. Interfacial and emulsifying properties of lipopeptides from *Bacillus subtilis*. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 152, n. 1–2, p. 3–10, 1999.

DESOIGNIES, N. et al. Systemic resistance induced by *Bacillus* lipopeptides in *Beta vulgaris* reduces infection by the rhizomania disease vector *Polymyxa betae*. **Molecular Plant Pathology**, v. 14, n. 4, p. 416–421, 2013.

DIAS, Moab D.; DIAS-NETO, Justino J.; SANTOS, Maria D.M.; FORMENTO, Angela Norma; BIZERRA, Lincoln V.A.s.; FONSECA, Maria Esther N.; BOITEUX, Leonardo S.; CAFÉ-FILHO, Adalberto C. Current Status of Soybean Anthracnose Associated with *Colletotrichum truncatum* in Brazil and Argentina. **Plants**, [S.L.], v. 8, n. 11, p. 459, 29 out. 2019. MDPI AG.

DIAS, MOAB DIANY; PINHEIRO, Valdeci Fernandes; CAFÉ-FILHO, Adalberto Corrêa. Impact of anthracnose on the yield of soybean subjected to chemical control in the north region of Brazil. **Summa Phytopathologica**, [S.L.], v. 42, n. 1, p. 18-23, mar. 2016. FapUNIFESP (SciELO).

FALARDEAU, J. et al. Ecological and Mechanistic Insights Into the Direct and Indirect Antimicrobial Properties of *Bacillus subtilis* Lipopeptides on Plant Pathogens. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, p. 869–878, 2013.

FARACE, G. et al. Cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* activate distinct patterns of defence responses in grapevine. **Molecular Plant Pathology**, v. 16, n. 2, p. 177–187, 2015.

GALLI, J. A.; PANIZZI, R. DE C.; VIEIRA, R. D. Resistência de variedades de soja à morte de plântulas causada por *Colletotrichum truncatum*.

Arquivos do Instituto Biológico, v. 74, n. 2, p. 163–165, jun. 2007.

Goswami et al. Antifungal properties of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* DS9 against *Colletotrichum falcatum*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 55, n. 11, p. 1245-1342, 2015.

GU, KAI-Xin. et al. A β 2-tubulin dsRNA derived from *Fusarium asiaticum* confers plant resistance to multiple phytopathogens and reduces fungicide resistance. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 152, p. 36- 46, 2019.

GUILLÉN-NAVARRO, Karina; LÓPEZ-GUTIÉRREZ, Tomás; GARCÍA-FAJARDO, Verónica; GÓMEZ-CORNELIO, Sergio; ZARZA, Eugenia; LAROSA-GARCÍA, Susana de; CHAN-BACAB, Manuel. Broad-Spectrum Antifungal, Biosurfactants and Bioemulsifier Activity of *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*—A Potential Biocontrol and Bioremediation Agent in Agriculture. *Plants*, [S.L.], v. 12, n. 6, p. 1374, 20 mar. 2023. MDPI AG.

HENNING, A. A. et al. Manual de identificação de doenças de soja. 5.ed. Londrina: Embrapa Soja, 2014.

INÈS, M; DHOUHA, G. Lipopeptide surfactants: production, recovery and pore forming capacity. **Peptides**, [S.L.], v. 71, p. 100-112, set. 2015. Elsevier BV.

IBAMA. Relatórios de comercialização de agrotóxicos. Brasília,2022. JIANG, C. et al. *Bacillus subtilis* inhibits *Aspergillus carbonarius* by producing iturin A, which disturbs the transport, energy metabolism, and osmotic pressure of fungal cells as revealed by transcriptomics analysis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 330, p. 108783, 2020.

KAKINUMA, A. et al. Determination of fatty acid in surfactin and elucidation of the total structure of surfactin. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 33, n. 6, p. 973–976, 1969.

KHONDEE, N. et al. Lipopeptide biosurfactant production by chitosan-immobilized *Bacillus* sp. GY19 and their recovery by foam fractionation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 93, p. 47–54, 2015.

KIM, P. IL et al. Production of biosurfactant lipopeptides iturin A, fengycin, and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 138–145, 2010.

KIM, Y. S. et al. *Bacillus* sp. BS061 suppresses powdery mildew and

gray mold. **Mycobiology**, v. 41, n. 2, p. 108–111, 2013.

KULIMUSHI, P. Z. et al. Stimulation of fengycin-type antifungal lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* in the presence of the maize fungal pathogen *Rhizomucor variabilis*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. MAY, p. 1–12, 2017.

LARINI, M. M. et al. Surfactina: estrutura, aplicações e fatores envolvidos em sua produção. **Evidência - Ciência e Biotecnologia**, v. 17, n. 2, p. 105–118, 2017.

LAW, J. W. F. et al. The potential of streptomyces as biocontrol agents against the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae* (*Pyricularia oryzae*). **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 3, 2017.

Lin, H.-Y., Rao, Y.K., Wu, W.-S., Tzeng, Y.-M. Ferrous ion enhanced lipopeptide antibiotic iturin a production from *Bacillus amyloliquefaciens* B128. **International Journal of Applied Science and Engineering**, v. 5, p. 123–132, 2007.

LIN, N. et al. Efficacy of nanoparticle encapsulation on suppressing oxidation and enhancing antifungal activity of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus subtilis*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 193, n. May, p. 111143, 2020.

LIU, J. et al. Interaction of antimicrobial cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* influences their effect on spore germination and membrane permeability in fungal plant pathogens. **Fungal Biology**, v. 118, n. 11, p. 855–861, 2014.

LLORENS, E.; AGUSTÍ-BRISACH, C. Biocontrol of Plant Diseases by Means of Antagonist Microorganisms, Biostimulants and Induced Resistance as Alternatives to Chemicals. **Plants**, v. 11, n. 24, p. 3521, 2022.

MICHEREFF, S. J. Fundamentos de Fitopatologia. **Universidade Federal Rural De Pernambuco**, 2001.

MIRANDA, A. C. DE; MOREIRA, J. C.; PERES, F. Neoliberalismo, uso de agrotóxicos e a crise da soberania alimentar no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 7–14, 2007.

MNIF, I. et al. Purification and identification of *Bacillus subtilis* SPB1 lipopeptide biosurfactant exhibiting antifungal activity against *Rhizoctonia bataticola* and *Rhizoctonia solani*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, p. 6690–6699, 2016.

OLIVEIRA, M. BIOSURFACTANTES E NANOPARTÍCULAS DE PRATA E COBRE: SÍNTESE E EFEITO SOBRE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS. **Universidade Federal de Viçosa**, 2017.

ONGENA, M. et al. Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, n. 1, p. 29–38, 2005.

ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 115–125, 2008.

PARVEEN, G. et al. Role of rhizobia in suppressing the root diseases of soybean under soil amendment. **Planta Daninha**, v. 37, p. 1–8, 2019.

PÉREZ-GARCÍA, A.; ROMERO, D.; DE VICENTE, A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: Biotechnological applications of *Bacilli* in agriculture. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 187–193, 2011.

PICCHI, D. G. et al. Cyclic peptide from plant biomass: Chemical features and diversity, biosynthesis and biological activities. **Quimica Nova**, v. 32, n. 5, p. 1262–1277, 2009.

RANGARAJAN, V.; CLARKE, K. G. Process development and intensification for enhanced production of *Bacillus* lipopeptides. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 31, n. 1–2, p. 46–68, 2015.

REIS, C. B. L. DOS. Produção de Quitinases e Biossurfactantes Fúngicos Por Processos Fermentativos. **Universidade Federal de Santa Catarina**, 2016.

ROONGSAWANG, N.; WASHIO, K.; MORIKAWA, M. Diversity of nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 1, p. 141–172, 2011.

SANTIAGO, M. R. F. Produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis*: caracterização, otimização e aplicação na indústria de Produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* : caracterização , otimização e aplicação na indústria de petróleo. **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, 2019.

SANTOS, D. Isolamento E Seleção De Bactérias Antagonistas a Fitopatógenos E Detecção De Genes Associados À Produção De Compostos

Bioativos. **Universidade Federal de Sergipe**, p. 58, 2014.

SHARMA, D. et al. Biosurfactants: Forthcomings and Regulatory Affairs in Food-Based Industries. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 28, n. 6, p. 1–14, 2023.

SIDOROVA, T. M. et al. Optimization of laboratory cultivation conditions for the synthesis of antifungal metabolites by bacillus subtilis strains. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, n. 7, p. 1879–1885, 2020.

SOUZA, C. PRODUÇÃO E PROCESSO DE DOWNSTREAM DE LIPOPEPTÍDEOS FUNGICIDAS PRODUZIDOS PELO *Bacillus subtilis* CNPMS 22. **Universidade Federal do Ceará**, p. 105, 2019.

SUR, S.; ROMO, T. D.; GROSSFIELD, A. Selectivity and Mechanism of Fengycin, an Antimicrobial Lipopeptide, from Molecular Dynamics. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 122, n. 8, p. 2219–2226, 2018.

TARIQ, M. et al. Biological control: a sustainable and practical approach for plant disease management. **Acta Agriculturae Scandinavica Section B: Soil and Plant Science**, v. 70, n. 6, p. 507–524, 2020.

TSUZUKI, T. Yoneda patent. v. 2, n. 12, 2006.

VAN LOON, L. C. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. **European Journal of Plant Pathology**, v. 119, n. 3, p. 243–254, 2007.

VEIGA, M. M. et al. Pesticide pollution in water systems in a small rural community in Southeast Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 11, p. 2391–2399, 2006.

VELHO, R. V. et al. Production of lipopeptides among *Bacillus* strains showing growth inhibition of phytopathogenic fungi. **Folia Microbiologica**, v. 56, n. 4, p. 297–303, 2011.

XIAO, J. et al. Activity of Fengycin and Iturin A Isolated From *Bacillus subtilis* Z-14 on *Gaeumannomyces graminis* Var. *tritici* and Soil Microbial Diversity. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 1–14, 2021.

Yoneda, C. T. et al. Production process of Surfactin. Procurador: Showa Denko K.K. Patente número US 7,011,969 B2. Depósito: 28 set. 2001. Concessão: 14 mar. 2006.