



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL**

**MELAÇO DE SOJA FERMENTADO: PRODUÇÃO DE ÁCIDO GAMA
POLIGLUTÂMICO (γ -PGA) E TRATAMENTO DE SEMENTES**

ANA PAULA FRAGOSO CORRÊA DA SILVA

Araras

2023



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL**

**MELAÇO DE SOJA FERMENTADO: PRODUÇÃO DE ÁCIDO GAMA
POLIGLUTÂMICO (γ -PGA) E TRATAMENTO DE SEMENTES**

ANA PAULA FRAGOSO CORRÊA DA SILVA

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ANASTÁCIA FONTANETTI

COORIENTADORA: PROFA. DRA. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI

COORIENTADOR: PROF. DR. FABRICIO ROSSI

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Agroecologia e
Desenvolvimento Rural como requisito
parcial à obtenção do título de
MESTRE EM AGROECOLOGIA E
DESENVOLVIMENTO RURAL

Araras

2023

Fragoso Corrêa da Silva, Ana Paula

Melaço de soja fermentado: produção de ácido gama poliglutâmico (γ -PGA) e tratamento de sementes / Ana Paula Fragoso Corrêa da Silva -- 2023.
62f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, Araras

Orientador (a): Anastácia Fonatanetti

Banca Examinadora: Anastácia Fontanetti, Ederlon Flávio da Veiga Moline, Márcia Maria Rosa Magri
Bibliografia

1. Bioestimulante. 2. Fermentação microbiana . 3. Bacillus sp.. I. Fragoso Corrêa da Silva, Ana Paula. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Helena Sachi do Amaral - CRB/8
7083



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Ana Paula Fragoso Correa da Silva, realizada em 30/08/2023.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Anastacia Fontanetti (UFSCar)

Prof. Dr. Ederlon Flávio da Veiga Moline (CJ Selecta)

Profa. Dra. Marcia Maria Rosa Magri (UFSCar)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me guiado até aqui e por ser meu amparo e fortaleza em todos os momentos.

A todos da minha família, por sempre entenderem minhas necessidades, acreditarem nos meus sonhos e pelo apoio incondicional em todas as etapas da minha vida.

Aos meus colegas de profissão e trabalho, pela compreensão da importância que essa etapa do mestrado acadêmico tem para mim e pelo suporte que me deram em muitos momentos.

À minha orientadora, Profa. Dra. Anastácia Fontanetti, pela atenção desde o primeiro contato, pelos ensinamentos e principalmente por ter visto em mim potencial que nem eu mesma sabia que poderia ter.

À Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini, minha coorientadora, por todos os ensinamentos, pelo apoio e pelo tempo que dedicou a mim e ao meu trabalho durante a fase de laboratório.

Ao Prof. Dr. Fabrício Rossi, meu coorientador pelo apoio na fase da elaboração do projeto.

Ao Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM), pela infraestrutura, equipamentos e materiais disponibilizados para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural (PPGADR) e a Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), *campus* Araras, pela infraestrutura e oportunidades, desde quando ingressei como aluna especial e até o presente momento. Agradeço ainda a todos os colaboradores que diretamente ou indiretamente contribuíram para o melhor resultado desse trabalho, em especial a secretaria do PPGADR pelo apoio e orientação para a minha completa integração ao ambiente acadêmico.

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

SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	vi
1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	04
2.1 MELAÇO DE SOJA.....	04
2.2 PRODUÇÃO DE ÁCIDO GAMA POLIGLUTAMICO (γ -PGA) POR FERMENTAÇÃO MICROBIANA.....	06
2.3 BIOESTIMULANTES DE PLANTAS	08
3 OBJETIVOS	11
4 MATERIAL E MÉTODOS	12
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
6 CONCLUSÕES	44
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

ÍNDICE DE TABELAS

	Pag.
Tabela 1. Caracterização química do melaço de soja <i>in natura</i>	12
Tabela 2. Linhagens de bactérias avaliadas nos experimentos.	14
Tabela 3. Primeira contagem de germinação, segunda contagem germinação de sementes, comprimento de raiz e parte aérea, massa seca de raiz e parte aérea de plântulas de milho em função de bioestimulantes a base de melaço de soja fermentado.	42

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Fluxograma do processamento industrial da soja. Fonte: Adaptado de Guedes (2015).....	05
Figura 2. Fluxograma das etapas da pesquisa, divididas na Fase 1 do cultivo das bactérias do gênero <i>Bacillus</i> em melão de soja, na Fase 2 produção do bioestimulante e Fase 3 tratamento das sementes de milho com os bioestimulantes filtrado e não filtrado e melão de soja in natura.....	12
Figura 3. Aspectos das placas de Petri contendo meio Ágar nutriente e estriadas com as bactérias <i>B. licheniformis</i> – BLM (1), <i>B. amyloliquefaciens</i> – BAA (2) e <i>B. subtilis</i> – BSA (3). Fonte: arquivo pessoal.....	15
Figura 4. Aspectos das microplacas inoculadas com as bactérias nos meios de cultura e posicionada para inserção na leitora. Fonte: arquivo pessoal.....	17
Figura 5. Crescimento (variação de absorvância no período de 24 h) de linhagens de bactérias do gênero <i>Bacillus</i> em meio de melão de soja em quatro diferentes concentrações de açúcar redutor total (ART) em comparação com o meio Caldo nutriente (CN). M28= melão de soja 28 g L ⁻¹ ART; M56= melão de soja 56 g L ⁻¹ ART; M112= melão de soja 112 g L ⁻¹ ART; M224= melão de soja 224 g L ⁻¹ ART. Os valores se referem à média das triplicatas e desvio-padrão	24
Figura 6. Crescimento (densidade óptica) de espécies do gênero <i>Bacillus</i> em meio de melão de soja nas concentrações de 28 g L ⁻¹ (vermelho) e 56 g L ⁻¹ (verde) de açúcar redutor total (ART) em comparação com o meio Caldo E (azul) após oito dias de cultivo. Os valores se referem à média das triplicatas.....	27
Figura 7. Número de bactérias (UFC ml ⁻¹) (a), ácido gama-poliglutâmico (γ -PGA, absorvância A400 nm) (b) e ácido indolacético (AIA μ g ml ⁻¹) (c) nos meios de melão de soja nas concentrações de 28 g L ⁻¹ (M 28) e 56 g L ⁻¹ (M 56) de açúcar redutor total (ART) em comparação cultivo.....	29
Figura 8. Crescimento de <i>B. amyloliquefaciens</i> (BAA), <i>B. subtilis</i> (BSA) e <i>B. licheniformis</i> (BLM) e produção de γ -PGA em meio caldo E. Os valores se referem à média das triplicatas.....	31
Figura 9. Crescimento de <i>B. amyloliquefaciens</i> (BAA), <i>B. subtilis</i> (BSA) e <i>B. licheniformis</i> (BLM) e produção de γ -PGA (densidade óptica) em meio de melão de soja com 28 g L ⁻¹ (M28) de açúcar redutor total (ART). Os valores se referem à média das triplicatas.....	32
Figura 10. Crescimento de <i>B. amyloliquefaciens</i> (BAA), <i>B. subtilis</i> (BSA) e <i>B. licheniformis</i> (BLM) e produção de γ -PGA (densidade óptica) em meio de melão de soja com 56 g L ⁻¹ (M56) de açúcar redutor total (ART). Os valores se referem à média das triplicatas.....	34
Figura11. Espectro de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da amostra de γ -PGA Sigma® (padrão). Espectro de FTIR para a amostra obtida após extração do γ -PGA do caldo E cultivado com <i>B. amyloliquefaciens</i> por 4 dias (E4). Espectro de FTIR para a	35

amostra obtida após extração do y-PGA do meio de melaço de soja 56 g L ⁻¹ de açúcar redutor inoculado com <i>B. amyloliquefaciens</i> no tempo zero (56-0).com <i>B. amyloliquefaciens</i> no tempo zero (início do experimento)	
Figura 12. Espectro de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para a amostra obtida após extração do y-PGA do meio de melaço de soja com 56 g L ⁻¹ de açúcar redutor cultivado com <i>B. amyloliquefaciens</i> por cinco dias (56-5).....	38
Figura 13. Espectros de FTIR para as amostras obtidas após extração do y-PGA do meio de melaço de soja com 56 g/L de açúcar redutor inoculado com <i>B. amyloliquefaciens</i> no tempo zero (linha preta) em comparação com a amostra após 5 dias de crescimento da bactéria (linha vermelha).....	38
Figura 14. Espectro de FTIR para a amostra obtida após extração do y-PGA do meio de melaço de soja com 56 g/L de açúcar redutor sem inoculação da bactéria <i>B. amyloliquefaciens</i>	40
Figura 15. Espectros de FTIR para as amostras obtidas após extração do y-PGA do meio de melaço de soja com 56 g/L de açúcar redutor não inoculado (linha verde), inoculado com <i>B. amyloliquefaciens</i> no tempo zero (linha preta) em comparação com a amostra após 5 dias de crescimento da bactéria (linha vermelha) em comparação ao Espectro de FTIR da amostra de y-PGA Sigma® (amostra padrão).....	41

MELAÇO DE SOJA FERMENTADO: PRODUÇÃO DE ÁCIDO GAMA POLIGLUTÂMICO (γ -PGA) E TRATAMENTO DE SEMENTES

Autor: ANA PAULA FRAGOSO CORRÊA DA SILVA

Orientadora: PROFA. DRA. ANASTÁCIA FONTANETTI

Coorientadora: PROFA. DRA. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI

Coorientador: PROF. DR. FABRICIO ROSSI

RESUMO

O melaço de soja é um coproduto da indústria processadora de soja, e por ser rico em carbono pode ser utilizado como meio de cultura para crescimento de microrganismos, produzindo importantes metabolitos, capazes de promover o desenvolvimento das plantas. O ácido gama-poliglutâmico (γ -PGA) obtido pelo processo de fermentação microbiana pode aumentar a biomassa e a atividade das raízes, otimizando a absorção de nutrientes e o rendimento das plantas. O objetivo foi avaliar o potencial do melaço de soja fermentado por bactérias do gênero *Bacillus* para a produção do biopolímero γ -PGA e o seu efeito bioestimulante no tratamento de sementes de milho. O trabalho foi conduzido em três fases. Na fase 1, três linhagens de *Bacillus subtilis* (BSA, BSS e BSM), duas linhagens de *B. amyloliquefaciens* (BAA e BAS) e uma linhagem de *B. licheniformis* (BLM) foram avaliadas em diferentes concentrações de açúcar redutor total (ART) do melaço de soja (28; 56; 112 e 224 g L⁻¹) em comparação com o meio padrão (caldo nutriente). Posteriormente, foram selecionadas as linhagens BSA, BAA e BLM para serem avaliadas em duas concentrações de ART do melaço de soja (28 e 56 g L⁻¹) em comparação com o caldo E (meio recomendado para a produção de γ -PGA) quanto ao crescimento e produção de γ -PGA e ácido indolacético (AIA) ao longo de oito dias de cultivo. Na fase 2, a linhagem de *Bacillus* com maior produção de γ -PGA foi utilizada para fermentar o melaço de soja e obter o bioestimulante. Na fase 3 as sementes de milho foram tratadas com o bioestimulante filtrado e não filtrado comparado com o meio melaço de soja 56 L⁻¹ ART e água, para avaliação da germinação e crescimento inicial das plântulas de milho. As linhagens de *Bacillus* apresentaram maior crescimento nos meios de melaço de soja nas concentrações 28 e 56 g L⁻¹ de ART em comparação ao caldo nutriente; a concentração de 224 g L⁻¹ de ART inibiu o crescimento das linhagens estudadas. A linhagem BSA apresentou crescimento superior as linhagens BAA e BLM, com maior crescimento no meio de melaço 56 g L⁻¹ ART. A linhagem BSA nos meios melaço de soja 28 e 56 g L⁻¹ ART apresentou maior crescimento e produção AIA comparado com o caldo E. A linhagem BAA no meio melaço de soja 56 g L⁻¹ ART apresentou a maior produção de γ -PGA em comparação as linhagens BSA e BLM. O γ -PGA produzido pela fermentação

do melaço de soja 56 g L⁻¹ ART fermentado por BAA apresentou pureza semelhante ao sintético (γ -PGA Sigma®). O bioestimulante (melaço de soja 56 g L⁻¹ ART fermentado por BAA) filtrado e não filtrado não influenciaram a germinação e o desenvolvimento inicial das plântulas de milho. São necessários estudos complementares para avaliar os efeitos do bioestimulante ao longo do desenvolvimento das plantas de milho.

Palavras-chave: *Bacillus* sp., bioestimulante, fermentação microbiana, microrganismos promotores de crescimento de plantas.

FERMENTED SOY MOLASSES: PRODUCTION OF GAMMA POLYGLUTAMIC ACID (γ -PGA) AND SEED TREATMENT

Author: ANA PAULA FRAGOSO CORRÊA DA SILVA

Adviser: PROFA. DRA. ANASTÁCIA FONTANETTI

Co-adviser: PROFA. DRA. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI

Co-adviser: PROF. DR. FABRÍCIO ROSSI

ABSTRACT

Soy molasses is a co-product of the soy processing industry, and because it is rich in carbon, it can be used as a culture medium for the growth of microorganisms, producing important metabolites, capable of promoting plant development. Gamma-polyglutamic acid (γ -PGA) obtained by the microbial fermentation process can increase root biomass and activity, optimizing nutrient absorption and plant yield. The objective was to evaluate the potential of soybean molasses fermented by bacteria of the genus *Bacillus* for the production of the biopolymer γ -PGA and its biostimulant effect in the treatment of corn seeds. The work was conducted in three phases. In phase 1, three strains of *Bacillus subtilis* (BSA, BSS and BSM), two strains of *B. amyloliquefaciens* (BAA and BAS) and one strain of *B. licheniformis* (BLM) were evaluated at different concentrations of total reducing sugar (ART) of soy molasses (28; 56; 112 and 224 g L⁻¹) compared to the standard medium (nutrient broth). Subsequently, the BSA, BAA and BLM strains were selected to be evaluated in two concentrations of ART from soy molasses (28 and 56 g L⁻¹) in comparison with broth E (recommended medium for the production of γ -PGA) as to the growth and production of γ -PGA and indoleacetic acid (IAA) over eight days of cultivation. In phase 2, the *Bacillus* strain with the highest production of γ -PGA was used to ferment soy molasses and obtain the biostimulant. In phase 3, corn seeds were treated with the filtered and unfiltered biostimulant compared to 56 L⁻¹ ART soy molasses medium and water, to evaluate the germination and initial growth of corn seedlings. *Bacillus* strains showed greater growth in soy molasses media at concentrations of 28 and 56 g L⁻¹ of ART compared to nutrient broth; the concentration of 224 g L⁻¹ of ART inhibited the growth of the studied strains. The BSA line showed higher growth than the BAA and BLM lines, with greater growth in the 56 g L⁻¹ ART molasses medium. The BSA strain in soy molasses media 28 and 56 g L⁻¹ ART showed greater growth and IAA production compared to broth E. The BAA strain in soy molasses 56 g L⁻¹ ART medium showed the highest γ -PGA production compared to BSA and BLM strains. The γ -PGA produced by the fermentation of soy molasses 56 g L⁻¹ ART fermented by BAA showed purity similar to the synthetic one (γ -PGA Sigma®). The biostimulant (soy molasses 56 g L⁻¹ ART fermented by BAA)

filtered and unfiltered did not influence the germination and initial development of corn seedlings. Additional studies are needed to evaluate the effects of the biostimulant throughout the development of corn seedlings.

Keywords: *Bacillus sp.*, bioestimulant, microbial fermentation, plant growth-promoting microorganisms

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de grãos, com destaque para a soja e milho. De acordo com o 11º Levantamento da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) para a safra 2022/23 a estimativa de produção é de 154.603,4 milhões de toneladas de soja e de 129.961,6 milhões de toneladas de milho (BRASIL, 2023). A exportação prevista é de 95,64 e 48 milhões de toneladas de grãos de soja e milho, respectivamente (BRASIL, 2023).

Para manter os índices produtivos, a exigência atual por fertilizantes no Brasil é elevada. Entre os anos de 1995 e 2020 a demanda nacional, em especial de nitrogênio, potássio e fósforo, aumentou de quatro para dezesseis milhões de toneladas. Em contrapartida, a produção nacional de fertilizantes reduziu, diante do desinvestimento nas indústrias estatais (RAJÃO et al., 2023). Cerca de 70% dos fertilizantes utilizados na produção agrícola brasileira são importados: 95% do potássio, 80% do nitrogênio e 55% do fosfato (OLIVEIRA; MALAGOLLI; CELLA, 2019), preocupante vulnerabilidade do agronegócio.

Diante das mudanças geopolíticas mundiais e os reflexos no fornecimento de fertilizantes, somado a necessidade de adequar os sistemas de produção e mitigar os efeitos dos eventos climáticos extremos, é necessário e urgente, desenvolver tecnologias que possam contribuir com a redução da emissão dos gases de efeito estufa (CO₂, N₂O e CH₄) e consumo de energia, por meio da otimização de uso dos fertilizantes e da água pelas plantas.

Dentre essas tecnologias estão os bioestimulantes de plantas definidos como:

Bioestimulantes são produtos que estimulam os processos de nutrição das plantas, independentemente do estado nutricional do produto, com o único objetivo de melhorar uma ou mais das seguintes características da planta ou de sua rizosfera: (a) eficiência no uso de nutrientes, (b) tolerância ao estresse abiótico, (c) características de qualidade e/ou (d) disponibilidade de nutrientes confinados ao solo/rizosfera” (EUROPEAN BIOSTIMULANTS INDUSTRY COUNCIL, 2023).

Os bioestimulantes de plantas se enquadram nos níveis de transição agroecológica proposto por Gliessman (2010), pois podem aumentar a eficiência e eficácia de práticas convencionais reduzindo e, ou eliminando a utilização de insumos caros e escassos, como os fertilizantes sintéticos e, assim, contribuir com a sustentabilidade dos sistemas de produção.

Na última década o uso e consequente produção de bioestimulantes têm sido estimuladas mundialmente. ZANDONADI (2016) destaca os esforços da organização das indústrias, por meio da Coalizão de Bioestimulantes nos Estados Unidos da América, do Conselho da Indústria de Bioestimulantes da Europa e da Associação Brasileira das Indústrias de Tecnologia em Nutrição Vegetal.

A produção de bioestimulantes de plantas por fermentação microbiana, depende da seleção de microrganismos e do meio utilizado para o cultivo que permitirá o crescimento adequado deles e a produção dos metabólitos de interesse para as plantas.

Utilizar resíduos ou coprodutos da agroindústria como meio para o crescimento de microrganismos pode ser uma maneira mais econômica e sustentável para produzir bioestimulantes de plantas. Um exemplo, dessa oportunidade vinda da agroindústria de processamento de soja é o melaço.

O melaço de soja é rico em carboidratos, tais como: sacarose, frutose, glicose, pinitol e os oligossacarídeos rafinose, estaquiose e verbascose (QURESHI, LOLAS, BLASCHEK, 2001), com potencial para ser utilizado como substrato fermentado por microrganismos, produzindo bioestimulantes de plantas.

Entre os microrganismos estudados para a produção de bioestimulantes destacam-se as bactérias do gênero *Bacillus*, importantes promotoras do crescimento e da produção vegetal (KUNDAN et al., 2015; BRAGA JUNIOR et al., 2018). Essas bactérias podem atuar diretamente nas plantas estimulando a produção de fitohormônios (ARAÚJO e HUNGRIA, 1999), e, ou serem empregadas na produção dos bioestimulantes, pois ao crescerem, produzem e liberam no meio de cultura metabólitos que podem ser utilizados pelas plantas.

O ácido gama-poliglutâmico (γ -PGA) é uma homopoliamida que pode ser produzido por fermentação microbiana. Ele é formado por unidades de ácido D e L – glutâmico, amplamente utilizado em diversos setores industriais como o alimentício e farmacêutico (ZHANG et al., 2017).

Na agricultura, o γ -PGA tem sido empregado para aumentar a biomassa e a atividade das raízes das plantas, promovendo eficiência na absorção de nutrientes como nitrogênio, fósforo e potássio, com consequente aumento no rendimento das plantas (ZHANG et al., 2017). Por apresentar elevada solubilidade, o γ -PGA pode sequestrar moléculas de água (CANDELA e FOUET, 2006), colaborando para atenuar os efeitos do estresse hídrico nas sementes e plantas.

As bactérias *B. subtilis* e *B. licheniformis* produzem ácido gama-poliglutâmico (γ -PGA) como reserva de energia e nutrientes. A produção do γ -PGA ocorre como componente da cápsula desses microrganismos, nessa síntese a extração é facilitada em função da solubilidade em meio aquoso (KASPARY, 2022). Além dos *Bacillus* supracitados, outros como: *B. megaterium*, *B. amyloliquefaciens* e *B. pumilus* também produzem γ -PGA (XU et al., 2013).

Diante do exposto, as perguntas norteadoras desse trabalho foram:

(a) O melaço de soja pode ser utilizado como substrato e fonte de carbono para fermentação e produção de γ -PGA?

(b) Qual a concentração de açúcar redutor total do melaço de soja mais adequado para o crescimento microbiano e produção de γ -PGA?

(c) Quais linhagens de *Bacillus* são mais eficientes na fermentação do melaço de soja e produção de γ -PGA?

(d) O melaço de soja fermentado pode ser utilizado como bioestimulante no tratamento de sementes de milho?

O objetivo foi avaliar o potencial do melaço de soja fermentado por bactérias do gênero *Bacillus* para a produção de γ -PGA e o seu efeito bioestimulante no tratamento de sementes de milho.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Melaço de soja

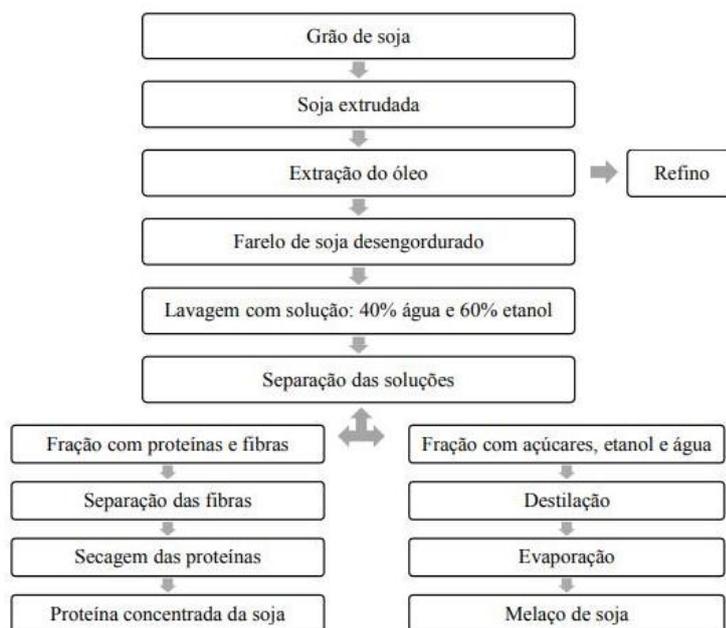
O processamento industrial da soja para a obtenção do óleo bruto e consequente, o óleo refinado, também produz o farelo proteico (GUEDES, 2015) (Figura 1). O farelo proteico é o produto com maior demanda da agroindústria da soja, por ser amplamente empregado na alimentação animal (MANDARINO e ROESSING, 2001) e, no processo para sua obtenção são produzidos subprodutos, também denominados coprodutos ou resíduos do beneficiamento, como o melaço de soja (SCHNEIDER, 2016).

O melaço de soja é um xarope viscoso, de cor marrom e sabor agridoce, gerado durante a obtenção do extrato proteico de soja. O processo de produção do extrato proteico envolve a etapa de extração, com solução etanólica 60% (v/v), a qual insolubiliza as proteínas e fibras da soja, que são retiradas e desidratadas, sendo obtida a proteína concentrada de soja. (PECIN, 2018). A fração líquida resultante é composta de açúcares, etanol e água, sendo que por destilação e evaporação, o etanol é totalmente recuperado da fração líquida e os sólidos concentrados remanescentes formam o melaço de soja (GUEDES, 2015).

Aproximadamente 57,3% da massa seca do melaço de soja corresponde a carboidratos como a sacarose (28,4%), estaquiose (18,6%) e rafinose (9,68%), além de lipídios (21,2%), proteínas (9,44%), fibras (5,7%) e cinzas (6,36%) (SIQUEIRA et al., 2008).

Para cada um quilo de soja processada, 15,7% deste volume torna-se melaço de soja (SIQUEIRA, 2007). Parte do melaço produzido é utilizado como suplemento em rações animais, principalmente de ruminantes. Porém, têm sido desenvolvidos estudos que avaliam o uso de melaço de soja na indústria alimentícia, para melhorar as características microbiológicas e o tempo de prateleira dos produtos (BATISTA et al., 2021). E as pesquisas também caminham para a bioenergética, estudando a viabilidade econômica e industrial da produção de etanol e subprodutos dessa atividade, a partir da fermentação do melaço de soja (SIQUEIRA, 2007).

Figura 1. Fluxograma do processamento industrial da soja. Fonte: Adaptado de Guedes (2015).



Apesar do melaço de soja ser uma matéria-prima de valor agregado, principalmente devido a elevada riqueza nutricional, a maior parte ainda é descartada (CALDEIRÃO et al., 2015), indicando oportunidades para o desenvolvimento de pesquisas aplicadas ao emprego deste coproduto como insumo para a produção agrícola.

O melaço de soja, por ser rico em carboidratos (QURESHI, LOLAS, BLASCHEK, 2001), tem potencial para ser utilizado como meio de crescimento de microrganismos, que podem produzir e liberar no meio, durante o seu crescimento, metabólitos utilizados em processos industriais e ou como bioestimulantes de plantas.

Alguns trabalhos já avaliaram o melaço de soja como meio de cultura para crescimento de microrganismos e produção de metabólitos. FABRINI et al. (2016) concluíram que esse coproduto pode ser empregado como única fonte de carbono em meio de crescimento de *Pycnoporus sanguineus* e produção de lacase. Barbosa, Morais e Cardoso (2014) verificaram que o melaço de soja na concentração de 250 g L⁻¹ reduz o tempo de fermentação para a produção de lipase por *Candida rugosa*. COSTA (2023) observou que o *Lactobacillus* sp

consome os açúcares redutores presentes no melão de soja produzindo ácido láctico.

Especificamente sobre a produção do bioestimulante de plantas, destacamos a produção do ácido gama-poliglutâmico (γ -PGA) por meio da fermentação de grãos de soja por *B. subtilis* e *B. licheniformis* (KASPARY, 2022). Sabendo que o melão de cana-de-açúcar já tem sido utilizado como substrato para crescimento de *Corynebacterium glutamicum*, produtora do γ -PGA (RÖDER et al., 2015) e como fermentável por *B. subtilis* para a produção de γ -PGA (ZHANG et al., 2012). Vislumbra-se o potencial do melão de soja como meio de crescimento para linhagens de *Bacillus* para a produção de γ -PGA.

2.2 Produção de ácido gama poliglutâmico (γ -PGA) por fermentação microbiana.

O ácido gama-poliglutâmico (γ -PGA) é uma homopoliamida formado por unidades de ácido D e L–glutâmico amplamente utilizado em diversos setores industriais, como os alimentícios, cosméticos, medicamentos e na agricultura (ZHANG et al., 2012).

Alguns trabalhos já avaliaram os efeitos do γ -PGA na produção vegetal. Zhang et al. (2017) verificaram que o γ -PGA melhorou a absorção de nitrogênio, fósforo e potássio pelas plantas e, portanto, aumentou a biomassa vegetal. Os mesmos autores verificaram que γ -PGA fortaleceu a capacidade de absorção de nutrientes pelas plantas por estimular o aumento da biomassa e da atividade das raízes. O γ -PGA acelerou o metabolismo do nitrogênio no repolho chinês, melhorando o crescimento da planta (XU et al., 2014). Na cultura do trigo Xu et al. (2013) verificaram que a aplicação do γ -PGA otimizou o aproveitamento de fertilizantes e estimulou o crescimento e a produção da gramínea. Recentemente alguns polissacarídeos e polipeptídeos/peptídeos encontraram usos como bioestimulantes, principalmente contra o estresse hídrico entre eles está o γ -PGA (SATISH et al., 2023).

O γ -PGA pode ser obtido por quatro métodos: 1) síntese química, 2) síntese de peptídeos, 3) biotransformação e 4) fermentação microbiana. A

fermentação microbiana é o método mais econômico e apresenta vantagens em relação aos demais, principalmente quando utiliza matéria-prima advinda de resíduos da agroindústria, minimizando a poluição ambiental, e obtendo produtos com elevada pureza em condições de reação moderadas (LUO et al., 2016).

As bactérias *B. subtilis* e *B. licheniformis* produzem γ -PGA como reserva de energia e nutrientes. A produção do γ -PGA ocorre como componente da cápsula do microrganismo e nessa síntese a extração do biopolímero é facilitada em função de sua solubilidade em meio aquoso (KASPARY, 2022). Além desses microrganismos, o *B. megaterium*, *B. amyloliquefaciens* e *B. pumilus* também podem produzir γ -PGA (XU et al., 2013).

Diante do exposto e sabendo que *B. subtilis*, *B. licheniformis* são microrganismos facilmente cultivados, reconhecidos como GRAS, acrônimo para Generally Recognized As Safe, ou “geralmente reconhecido como seguro” (SCHALLMEY et al., 2004) e o *B. amyloliquefaciens* ser uma bactéria próxima filogeneticamente das anteriores, estas foram escolhidas para serem avaliadas quanto a produção de γ -PGA neste estudo.

Relacionando coprodutos da agroindústria como substrato fermentado por microrganismos, a literatura destaca o melaço de cana-de-açúcar como fermentável adequado para a produção de ácido D e L –glutâmico (52,1 g L⁻¹ de γ -PGA) (ZHANG et al., 2012), sinalizando assim o potencial de outros tipos de melaço, como o de soja, para esse fim.

De acordo com os requisitos nutricionais, as bactérias produtoras de γ -PGA são divididas em dois grupos: um grupo denominado dependente de ácido L-glutâmico, o qual inclui as bactérias que necessitam de ácido L-glutâmico já presente no meio de cultivo para estimular a produção de γ -PGA, e o outro grupo que não necessita da presença ou adição extracelular de ácido L-glutâmico e é designado de independente de ácido L-glutâmico (XU et al., 2013).

As bactérias do gênero *Bacillus* a depender da cepa, são enquadradas tanto como dependentes, quanto como independentes da presença de ácido L-

glutâmico para a produção de γ -PGA, há linhagens de *B. subtilis* e *B. licheniformis* nas duas formas (MEDEIROS, 2020).

Nas linhagens dependentes do ácido L-glutâmico a obtenção do aminoácido utilizado para produção de γ -PGA é exógena. Entretanto, para estes microrganismos quando na presença de L-glutamina, o aminoácido pode ser convertido em ácido L-glutâmico, através da reação catalisada pela glutamina 2-oxoglutarato aminotransferase. O ácido L-glutâmico exógeno também pode ser convertido em L-glutamina com a ajuda da enzima glutamina sintetase (MEDEIROS, 2020).

As bactérias independentes do ácido L-glutâmico utilizam também outra via, onde o ácido glutâmico necessário para a produção de γ -PGA pode ser gerado a partir de fonte de carbono através do ciclo do ácido tricarboxílico. Esta fonte de carbono é transformada em α -cetoglutarato que juntamente com o sulfato de amônio são convertidos em ácido L-glutâmico, catalisada pela glutamato desidrogenase na ausência de glutamina (MEDEIROS, 2020). Essa é a razão pela qual a dosagem de açúcares redutores totais (ART), como fonte de carbono, é importante tanto para o desenvolvimento dos microrganismos quanto para a produção de γ -PGA por eles.

2.3 Bioestimulantes de plantas

Bioestimulantes são substâncias naturais ou sintéticas, provenientes da mistura de biorreguladores vegetais (auxinas, giberelinas, citocininas, etileno etc.) podendo conter, outras substâncias como aminoácidos, nutrientes e vitaminas aplicados nas plantas ou no tratamento das sementes (KLAHOLD et al., 2006). Para a European Biostimulants Industry Council (2023) bioestimulantes são:

Produtos que estimulam os processos de nutrição das plantas, independentemente do estado nutricional do produto, com o único objetivo de melhorar uma ou mais das seguintes características da planta ou de sua rizosfera: (a) eficiência no uso de nutrientes, (b) tolerância ao estresse abiótico, (c) características de qualidade e/ou (d) disponibilidade de nutrientes confinados ao solo/rizosfera.

A classificação de bioestimulante é baseada na sua fonte de origem: algas marinhas e seus extratos, ácidos húmicos e fúlvicos, hidrolisados de proteínas e compostos contendo nitrogênio, biopolímeros, compostos inorgânicos, fungos e bactérias benéficas (DU JARDIM, 2015).

O ácido indolacético (IAA) é um composto com efeito biorregulador. O AIA da classe das auxinas é considerado o principal fitohormônio responsável pelo alongamento de células, estimulando a síntese celular ou desinibindo a ação de enzimas que atuam sobre as microfibrilas da parede celular, o que resulta em aumento da plasticidade da membrana, promovendo a formação de raízes adventícias no caule e a expansão radicular (TAIZ e ZEIGER, 2012).

Os aminoácidos, assim como ácidos húmicos, ácidos fúlvicos e as algas marinhas, fazem parte de compostos chamados biorreguladores (GÓMEZ-MERINO e TREJO-TÉLLEZ, 2015; NARDI et al., 2016). Embora as plantas sejam capazes de produzir seus próprios aminoácidos, alguns trabalhos demonstram que ao fornecer aminoácidos de forma exógena às plantas pode trazer ganhos significativos nos processos de desenvolvimento delas (LEHNINGER, 2006), pois os aminoácidos desempenham diversas funções nas plantas.

O aminoácido ácido L-glutâmico (componente do ácido gama-poliglutâmico), apresenta diversas funções biológicas, como precursor da síntese de clorofila (YARONSKAYA et al., 2006), regulador do carbono e do metabolismo do nitrogênio (ROBINSON et al., 1991).

Os bioestimulantes podem ser produzidos por processos biológicos, como a fermentação, onde as bactérias promotoras de crescimento de plantas quando em meio de cultura adequado, produzem biorreguladores.

As bactérias do gênero *Bacillus* podem influenciar o crescimento das plantas, aumentar a produção, solubilizar fosfato e potássio, proteger as plantas contra patógenos (SOUSA et al., 2018) e, quando em meio de cultura apresentam potencial para a produção de biorreguladores.

O gênero *Bacillus*, é conhecido pela produção de fitohormônios como: giberelinas, ácidos lácticos e succínico e AIA (ARAUJO, 2010), sendo que as bactérias *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. amyloliquefaciens* e *B.*

pumilus produzem ácido gama-poliglutâmico como reserva de energia e nutrientes (XU et al., 2013; KASPARY, 2022).

Quando o bioestimulante é produzido por processos biológicos, apresenta a vantagem de conter células da bactéria promotora de crescimento de plantas, aumentando as chances de obter resultados positivos em função da sua aplicação nas plantas.

Os efeitos dos bioestimulantes no tratamento de sementes e desenvolvimento de plantas na literatura são controversos. SANTOS et al. (2014) avaliaram efeitos de três bioestimulantes comerciais, cuja composição incluía aminoácidos, micronutrientes e fitohormônios como: auxinas, citocininas e giberelina e verificaram efeitos positivos em todas as etapas de desenvolvimento do milho, principalmente nas variáveis relacionadas as raízes. Já Buchelt et al. (2019) não encontraram efeitos da aplicação de bioestimulantes comerciais, com diferentes concentrações de giberelina, cinetina, auxina e ácido giberélico, na germinação de sementes de milho. Para os autores os bioestimulantes podem ter efeito mais pronunciado em situações de estresse.

A aplicação do aminoácido ácido L-glutâmico, via tratamento de sementes nas concentrações de 75, 150 e 300 mg L⁻¹, não favoreceu o desenvolvimento de plântulas de feijão (*Phaseolus vulgaris*), interferindo negativamente na germinação, quando o potencial osmótico foi igual ou inferior a -0,2 Mpa (CARVALHO et al., 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o potencial do melaço de soja fermentado por bactérias do gênero *Bacillus* na produção de ácido gama-poliglutâmico (γ -PGA) e o seu efeito biostimulante no tratamento de sementes de milho.

3.2 Específicos

Avaliar o crescimento de seis linhagens de *B. subtilis*, *B. licheniformis* e *B. amyloliquefaciens* em de melaço de soja com diferentes concentrações de açúcar redutor total;

Avaliar o crescimento e produção de ácido gama-poliglutâmico e ácido indolacético em melaço de soja com duas concentrações de açúcar redutor total (28 e 56 g L⁻¹) em comparação com o caldo E, por *B. subtilis*, *B. licheniformis* e *B. amyloliquefaciens*;

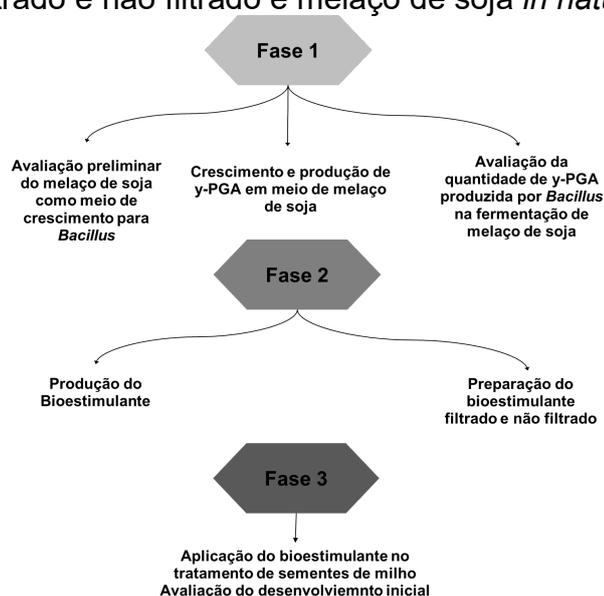
Indicar as linhagens de *Bacillus*, a concentração de açúcar redutor e o tempo de crescimento para a produção de ácido gama-poliglutâmico;

Avaliar o efeito bioestimulante do melaço de soja fermentado, filtrado e não filtrado, no tratamento de sementes de milho.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos durante os meses de setembro de 2022 a julho de 2023 em três fases, conforme fluxograma (Figura 2).

Figura 2. Fluxograma das etapas da pesquisa, divididas na Fase 1 do cultivo das bactérias do gênero *Bacillus* em melaço de soja, na Fase 2 produção do bioestimulante e Fase 3 tratamento das sementes de milho com os bioestimulantes filtrado e não filtrado e melaço de soja *in natura*.



4.1 Avaliação preliminar do melaço de soja como meio de crescimento para linhagens de *Bacillus*

4.1.1 Caracterização do melaço de soja

O melaço de soja utilizado foi fornecido pela empresa CJ Selecta, localizada em Araguari, Minas Gerais. A caracterização do melaço de soja (*in natura*) foi realizada no Laboratório de Fertilizantes Corretivos e Subprodutos do Departamento de Ciência do Solo da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) da Universidade de São Paulo (USP) (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização química do melação de soja *in natura*

Determinações	Unidades	Valores
pH	g ml ⁻¹	6,00
Densidade	g L ⁻¹	1,31
Matéria Orgânica	g L ⁻¹	370,58
Carbono Orgânico	g L ⁻¹	205,88
Resíduo Mineral + Orgânico	g L ⁻¹	528,62
Resíduo Mineral Total	g L ⁻¹	158,04
Resíduo Mineral Insolúvel	g L ⁻¹	0,04
Resíduo Mineral Solúvel	g L ⁻¹	158,00
Nitrogênio	g L ⁻¹	7,98
Fósforo	g L ⁻¹	6,07
Potássio	g L ⁻¹	20,50
Sódio	mg L ⁻¹	110,00
Cálcio	g L ⁻¹	0,18
Magnésio	g L ⁻¹	1,51
Enxofre	g L ⁻¹	1,44
Cobre	mg L ⁻¹	25,50
Ferro	mg L ⁻¹	210,00
Manganês	mg L ⁻¹	0,50
Zinco	mg L ⁻¹	24,00

A concentração de açúcar redutor total (ART) do melação de soja foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (MILLER, 1959) e realizada no Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM), no Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), *campus* de Araras.

Amostras do melação de soja foram diluídas em água destilada (25X, 50X e 75X), no balão volumétrico em duplicata. Pipetou-se 1 ml de cada amostra diluída para balões volumétricos de 100 ml, em seguida adicionou-se 30 ml de água destilada e 2,5 ml de ácido clorídrico concentrado e homogeneizou-se. Os balões foram levados para banho-maria a 65°C por 15 minutos. As amostras foram resfriadas em água corrente e em seguida adicionou-se 2,8 ml de NaOH 12N e completou-se o volume do balão até o menisco com água destilada. Retirou-se 1 ml de cada solução preparada, transferindo-se para tubos de ensaio, onde adicionou-se 1 ml da solução estoque de ADNS e 1 ml de água destilada. As amostras foram submetidas ao banho térmico a 100°C por 5 minutos, os tubos em seguida foram resfriados em água corrente e receberam

5 ml de água destilada, perfazendo um total de 8 ml. Os tubos foram homogeneizados por 5 segundos em vórtex e realizou-se a leitura da absorbância a 540 nm em espectrofotômetro digital (Thermo® Biomate 3). O mesmo procedimento foi realizado utilizando-se água ao invés da amostra para obter-se o branco da reação, utilizado para calibrar o aparelho.

A concentração de ART foi determinada a partir de uma curva-padrão de glicose, com a seguinte fórmula:

$$ART (g L^{-1}) = [(A 540 nm + 0,0466) / 0,7293] \times diluição amostra$$

Foi calculada a média dos valores obtidos para as diluições para expressar a concentração de ART no melão de soja.

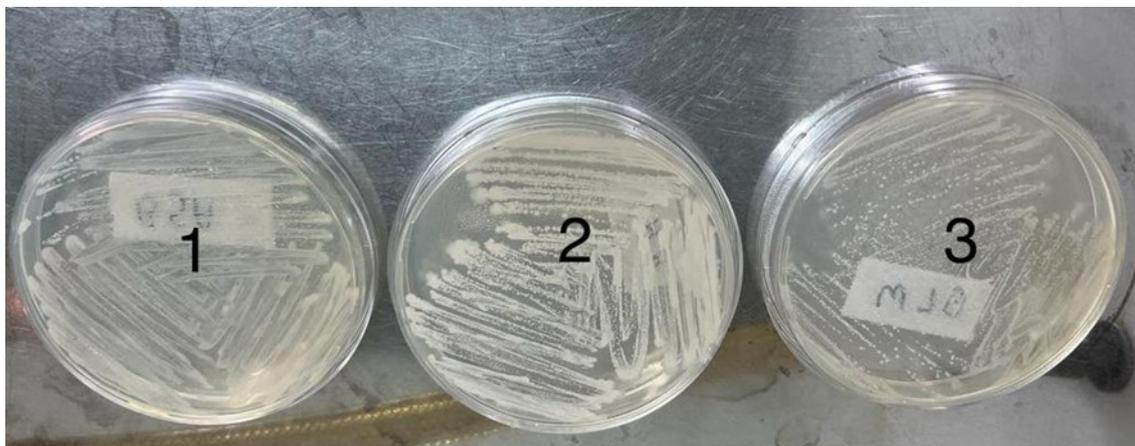
4.1.2 Linhagens de bactérias

Nos experimentos foram avaliadas seis linhagens de bactérias do gênero *Bacillus* (Tabela 2). As bactérias estavam sendo conservadas em meio Ágar Nutriente, em *slants* sob óleo mineral, a 4°C. Cerca de 48 horas anteriores ao início dos experimentos, as bactérias foram repicadas em placas contendo Ágar Nutriente e incubadas a 35°C, por 48 horas (Figura 3).

Tabela 2. Linhagens de bactérias avaliadas nos experimentos.

Código	Espécie	Origem	Fornecedor
BSS	<i>Bacillus subtilis</i>	Coleção de cultura (CCT2471)	LAMAM
BSA	<i>Bacillus subtilis</i>	Coleção de cultura (CCT7719)	MB Enzymes
BSM	<i>Bacillus subtilis</i>	Isolado de endosfera de cana-de-açúcar (ENDO26)	LAMAM
BAA	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Coleção de cultura (CCT7690)	MB Enzymes
BAS	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Isolado de produto comercial da Ecolmax	LAMAM
BLM	<i>Bacillus licheniformis</i>	Isolado de rizosfera de cana-de-açúcar (RIZ4)	LAMAM

Figura 3. Aspectos das placas de Petri contendo meio Ágar nutriente e estriadas com as bactérias *B. licheniformis* – BLM (1), *B. amyloliquefaciens* – BAA (2) e *B. subtilis* – BSA (3). Fonte: arquivo pessoal.



4.1.3 Preparo dos meios de cultura

Foram utilizados os seguintes meios de cultura:

1) Caldo nutriente: 1,5 g L⁻¹ extrato de carne; 1,5 g L⁻¹ extrato de levedura; 5 g L⁻¹ peptona; 5 g L⁻¹ cloreto de sódio; água destilada. Para meio Ágar nutriente, foram adicionados 20 g L⁻¹ de ágar.

2) Caldo E: 20 g L⁻¹ ácido L-glutâmico; 12 g L⁻¹ ácido cítrico; 80 g L⁻¹ glicerol, 7 g L⁻¹ cloreto de amônio; 0,5 g L⁻¹ fosfato dipotássico; 0,5 g L⁻¹ sulfato de magnésio; 0,04 g L⁻¹ cloreto férrico; 0,15 g L⁻¹ cloreto de cálcio; 0,42 g L⁻¹ sulfato de manganês (MEDEIROS, 2020).

3) Meio melão de soja 28 g L⁻¹ de ART: 65 ml de melão de soja para 1000 ml de água destilada.

4) Meio melão de soja 56 g L⁻¹ de ART: 130 ml de melão de soja para 1000 ml de água destilada.

5) Meio melão de soja 112 g L⁻¹ de ART: 260 ml de melão de soja para 1000 ml de água destilada.

6) Meio melão de soja 224 g L⁻¹ de ART: 520 ml de melão de soja para 1000 ml de água destilada.

Os meios de cultura tiveram o pH corrigido para 7,0 com solução de NaOH 1 M e após isso, foram esterilizados em autoclave a 120°C, por 15 minutos, 1 atm.

4.1.4 Avaliação inicial do crescimento das linhagens de *Bacillus* em melação de soja com diferentes concentrações de ART.

Foram avaliados o crescimento das seis linhagens de *Bacillus* (Tabela 2) nos meios de cultura: caldo nutriente, melação de soja 28 g L⁻¹ de ART (açúcar redutor total), melação de soja 56 g L⁻¹ de ART, melação de soja 112 g L⁻¹ de ART e melação de soja 224 g L⁻¹ de ART. As concentrações de ART basearam-se nos resultados de Medeiros (2020).

Inicialmente foi preparado o pré-inóculo para as bactérias em meio caldo nutriente, transferindo três alçadas da cultura bacteriana (reativada em placas com meio ágar nutriente) para tubos Falcon de 50 ml contendo 10 ml de meio esterilizado. Os tubos foram incubados sob agitação de 150 rpm, a 35°C por 24 horas. Em seguida, foi determinada a densidade óptica a 600 nm em espectrofotômetro ThermoBiomate® de cada suspensão bacteriana e diluída em caldo nutriente para aproximadamente 0,1 ml com caldo nutriente. Foram transferidas cinco alíquotas de 1,5 ml para microtubos estéreis de 2 ml, os quais foram centrifugados a 8000 rpm por 8 minutos, o sobrenadante descartado e as células suspendidas novamente em cada um dos meios acima citados. Essas suspensões, uma para cada meio de cultura, constituíram os inóculos bacterianos.

Aos poços de uma microplaca modelo 'Costar 96 Flat Bottom Transparent Polystyrene' estéril com tampa, contendo 96 poços, foram adicionados assepticamente 180 µL do meio de cultura estéril e 20 µL do inóculo bacteriano acima descrito, em triplicata. Foram também realizados os seguintes tratamentos controles: caldo nutriente, melação de soja 28 g L⁻¹ de ART, melação de soja 56 g L⁻¹ de ART, melação de soja 112 g L⁻¹ de ART e melação de soja 224 g L⁻¹ de ART, sem inoculação das bactérias. A microplaca foi levada à leitora de microplacas Tecan Infinite™ M200 (Figura 4) e incubada a 35°C e 160 rpm de agitação (aproximadamente 5 mm de amplitude orbital)

por 24 horas. O crescimento celular foi monitorado pela medida de absorbância a 600 nm a cada 15 minutos.

Figura 4. Aspectos das microplacas inoculadas com as linhagens de *Bacillus* nos meios de cultura e posicionada para inserção na leitora. Fonte: arquivo pessoal.



Os resultados obtidos para cada meio e cada bactéria foram analisados inicialmente descontando-se os valores das absorbâncias obtidas nos tratamentos controles em cada medida de tempo. Em seguida foi calculada a variação de absorbância utilizando-se a seguinte fórmula, para cada meio e cada bactéria:

$$\text{Variação de absorbância} = \text{Absorbância final} - \text{Absorbância inicial}$$

Os resultados (médias e desvios-padrão) foram expressos em variação de absorbância para cada meio e bactéria após 24 horas de cultivo em cada meio respectivo.

4.2 Avaliação do crescimento das linhagens de *Bacillus* selecionadas e produção de ácido gama-poliglutâmico (γ -PGA) e ácido indolacético (AIA) em melão de soja.

4.2.1 Crescimento das linhagens de *Bacillus* e avaliação de ácido gama-poliglutâmico (γ -PGA) (absorbância 400 nm).

Baseado nos resultados do ensaio relatado no item 4.1.4, as linhagens de *Bacillus* (*B. subtilis* - BSA; *B. amyloliquefaciens* – BAA; e *B. licheniformis* – BLM) foram avaliadas quanto ao crescimento e produção do ácido gama-poliglutâmico nos meios: caldo E, melão de soja 28 g L⁻¹ e 56 g L⁻¹ de ART.

As linhagens foram cultivadas em frascos Erlenmeyers de 500 ml contendo 200 ml dos meios de cultura como volume final, a 35°C, por oito dias. O tempo de oito dias baseou-se nos resultados de Medeiros (2020).

O inóculo para cada bactéria foi preparado em meio caldo nutriente, transferindo três alçadas da cultura bacteriana crescida previamente em placas com meio ágar nutriente para tubos Falcon de 50 ml contendo 20 ml de meio. Os tubos foram incubados a 35°C por 24 horas. A densidade óptica a 600 nm foi determinada e ajustada para 0,1 com meio caldo nutriente, sendo a suspensão bacteriana considerada como inóculo para os experimentos.

Os frascos Erlenmeyers foram inoculados com 2 ml da suspensão bacteriana (inóculo), em triplicata para cada meio e bactéria, tendo sido preparado um frasco a mais para retirada da amostra no tempo inicial (0 h), para cada meio e bactéria. Os frascos foram incubados a 35°C e 150 rpm, sendo retirados 10 ml de amostra diariamente (em tubos Falcon), por um período de oito dias. Uma alíquota de 1,5 ml foi retirada para análise de crescimento por densidade óptica, sendo a seguir os tubos Falcon armazenados em freezer até o momento das demais análises.

A alíquota de 1,5 ml foi transferida para microtubos de 2 ml e centrifugadas a 13000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado, e uma alíquota de 1,5 ml de água destilada foi transferida para os microtubos, sendo esses homogêneos em agitador de tubos até completa ressuspensão das células. Foi determinada a densidade óptica a 600 nm das

amostras em espectrofotômetro ThermoBiomate®, utilizando o meio de cultivo respectivo (sem células, submetido ao mesmo procedimento utilizado para as amostras) de cada amostra como branco para calibrar o equipamento (absorbância zero). As amostras foram diluídas em água destilada quando necessário.

Ao final do oitavo dia de cultivo, após a retirada das amostras, os volumes remanescentes dos frascos das triplicatas foram vertidos em frascos esterilizados de 500 ml (Boeco), constituindo uma única amostra, sendo a seguir armazenados em freezer para uso posterior. Dessa amostra única para cada tratamento, foi retirado um volume de 1 ml e procedeu-se à diluição seriada e plaqueamento em meio ágar nutriente. As placas foram incubadas a 35°C por 48 horas, para quantificação do número de unidades formadoras de colônias (UFC ml⁻¹).

4.2.2 Qualidade do ácido gama-poliglutâmico (γ -PGA) pelo Método Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR)

O método de Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR) produz espectros de infravermelho de γ -PGA com picos correspondentes a ligações específicas no composto (OGUNLEYE et al., 2015).

O objetivo foi avaliar por meio dos espectros de FTIR, a presença do ácido gama-poliglutâmico (γ -PGA) nas amostras do meio de melaço não inoculado e inoculado com a bactéria *B. amyloliquefaciens* no tempo zero (inicial) e após cinco dias de crescimento, em comparação com a amostra do meio caldo E cultivado com a mesma bactéria por quatro dias. A amostra em questão foi selecionada por ter sido a que teve maiores valores do biopolímero segundo o método Espectrofotométrico UV_VIS.

Os espectros de FTIR das amostras obtidas após extração do γ -PGA (caldo E após 4 dias de crescimento de *B. amyloliquefaciens*; melaço de soja 56 g L⁻¹ de ART sem inoculação da bactéria e após inoculação da bactéria nos tempos zero e 5 dias de crescimento e do γ -PGA Sigma®) foram investigados utilizando um espectrômetro FTIR modelo Tensor II (Bruker). Foi utilizado o

método de ATR em um intervalo de 500 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} , com resolução de 2 cm^{-1} e número de varreduras igual a 64.

4.2.3 Quantificação de ácido indolacético (AIA) em melão de soja fermentado

Para quantificar o ácido indolacético (AIA) produzido pelas bactérias nos três meios citados no item anterior ao final de oito dias de cultivo, uma alíquota de 1 mL de amostra foi centrifugada durante 3 minutos a 3000 rpm. Logo após, 0,5 ml do sobrenadante foi transferido para microtubo no qual foi adicionado 0,5 ml do reagente de Salkowsky (98 mL de ácido perclórico 35% e 2 mL de cloreto de ferro 0,5 M dissolvido em água destilada), seguido de leve agitação para homogeneizar a mistura, a qual foi mantida em temperatura ambiente, em ambiente escuro por 30 minutos (GORDON e WEBER, 1951).

A absorbância das amostras foi determinada a 530 nm em espectrofotômetro ThermoBiomate® contra o branco da reação (meio de cultura no lugar da amostra submetido aos mesmos procedimentos empregados para a amostra). A quantificação do AIA foi feita com base na equação abaixo, determinada a partir de uma curva-padrão de ácido indolacético, conforme descrito em Bispo (2022):

$$AIA (\mu\text{gml}^{-1}) = [(A \text{ 530 nm} + 0,0099) / 0,038] \times \text{diluição amostra}$$

4.2.4 Quantificação do ácido gama-poliglutâmico (γ - PGA) pelo método Espectrofotométrico UV-VIS

O ácido gama-poliglutâmico foi quantificado seguindo a metodologia adaptada de Medeiros (2020), procedendo-se inicialmente a extração do biopolímero. Alíquotas de 1,0 ml das amostras coletadas ao final de oito dias de cultivo foram transferidas para microtubos de 2 ml e centrifugados a 13000 rpm por 20 min para remoção das células bacterianas. Foram coletados 300 μL do sobrenadante e adicionados em 1,2 ml de metanol resfriado (1:4 v/v). O microtubo foi agitado manualmente e deixado em repouso por 10 minutos sob temperatura de 4°C. Para precipitação do polímero, o microtubo foi centrifugado novamente a 13000 rpm por 20 min. O sobrenadante foi

descartado e o microtubo deixado invertido em estufa BOD a 30°C por 20 minutos para evaporação do metanol. Foram adicionados 300 µL de água destilada seguido de agitação em agitador de tubos, constituindo a solução aquosa de ácido gama-poliglutâmico.

A quantificação do ácido gama-poliglutâmico foi realizada pelo método espectrofotométrico UV-VIS de complexação com brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). A solução CTAB deve apresentar concentração de 0,1 M. Esta solução foi homogeneizada com solução de cloreto de sódio (NaCl) na concentração de 1 M em mesmo volume. Em microtubo de 2 ml foram adicionados 300 µL de solução aquosa de ácido gama-poliglutâmico, 1,2 ml de solução tampão fosfato pH 7,0 e 300 µL de CTAB 0,1M/NaCl 1M (1:4:1 v/v). O conteúdo foi mantido em banho maria a 30 °C por 25 minutos. A seguir, foi realizada a leitura em espectrofotômetro ThermoBiomate® a 400 nm, utilizando água como branco da reação.

4.3 Efeito bioestimulante do melão de soja fermentado no tratamento de sementes de milho

O experimento foi conduzido no laboratório de Produção Vegetal e Recursos Florestais no *campus* da UFSCar de Araras, SP, no mês de maio de 2023. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com cinco repetições e quatro tratamentos. Os tratamentos foram: bioestimulante filtrado, bioestimulante não filtrado, melão de soja 56 g L⁻¹ de ART estéril e água estéril.

O bioestimulante consistiu no melão de soja com 56 g L⁻¹ de ART inoculado com *B. amyloliquefaciens* e fermentado durante cinco dias. Para a produção do bioestimulante filtrado, o caldo fermentado passou primeiro pelo filtro de 0,8 µm e posteriormente pelo filtro de 0,45 µm, visando reter as células da bactéria.

As sementes de milho utilizadas foram da variedade IAC Airan, que foram desinfetadas por imersão em álcool 70% por 2 minutos e hipoclorito de sódio a 1%, durante 15 minutos, seguido por lavagens sucessivas com água destilada esterilizada (BHATTACHARYYA, GARLADINNE, LEE, 2014). A

aplicação dos tratamentos foi realizada em uma amostra de 200 g de sementes, sendo essas colocadas em sacos plásticos transparentes. Após a aplicação de 10 ml das soluções, conforme os tratamentos, os sacos foram inflados com ar e agitados por um minuto (BUCHELT et al., 2019).

Posteriormente, as sementes secas foram semeadas sobre duas folhas de papel germitest e cobertas por outra folha (umedecidas com água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso seco) e enroladas. Cada repetição foi composta por dois rolos de papel germitest com 50 sementes cada. Os rolos foram depositados em câmara de germinação (BOD) com temperatura de 25 °C por sete dias (BRASIL, 2009).

Aos quatro dias, após início do teste, foi realizada a avaliação de primeira contagem de germinação (%), contando o número de sementes normais germinadas. Aos sete dias foram avaliados: germinação (%), número de sementes normais germinadas; comprimento do sistema radicular e da parte aérea do milho (cm plântula⁻¹), utilizando-se régua. Posteriormente, foram destacadas das sementes o sistema radicular e a parte aérea das plântulas de milho, essas foram acondicionadas em sacos de papel e levadas à estufa com circulação de ar na temperatura de 65°C por 48 h, para obtenção da massa seca do sistema radicular e da parte aérea do milho (mg plântula⁻¹).

4.5 Formas de análise dos resultados

Os dados referentes ao crescimento das linhagens de *Bacillus*, produção de γ -PGA e AIA foram analisados pela estatística descritiva.

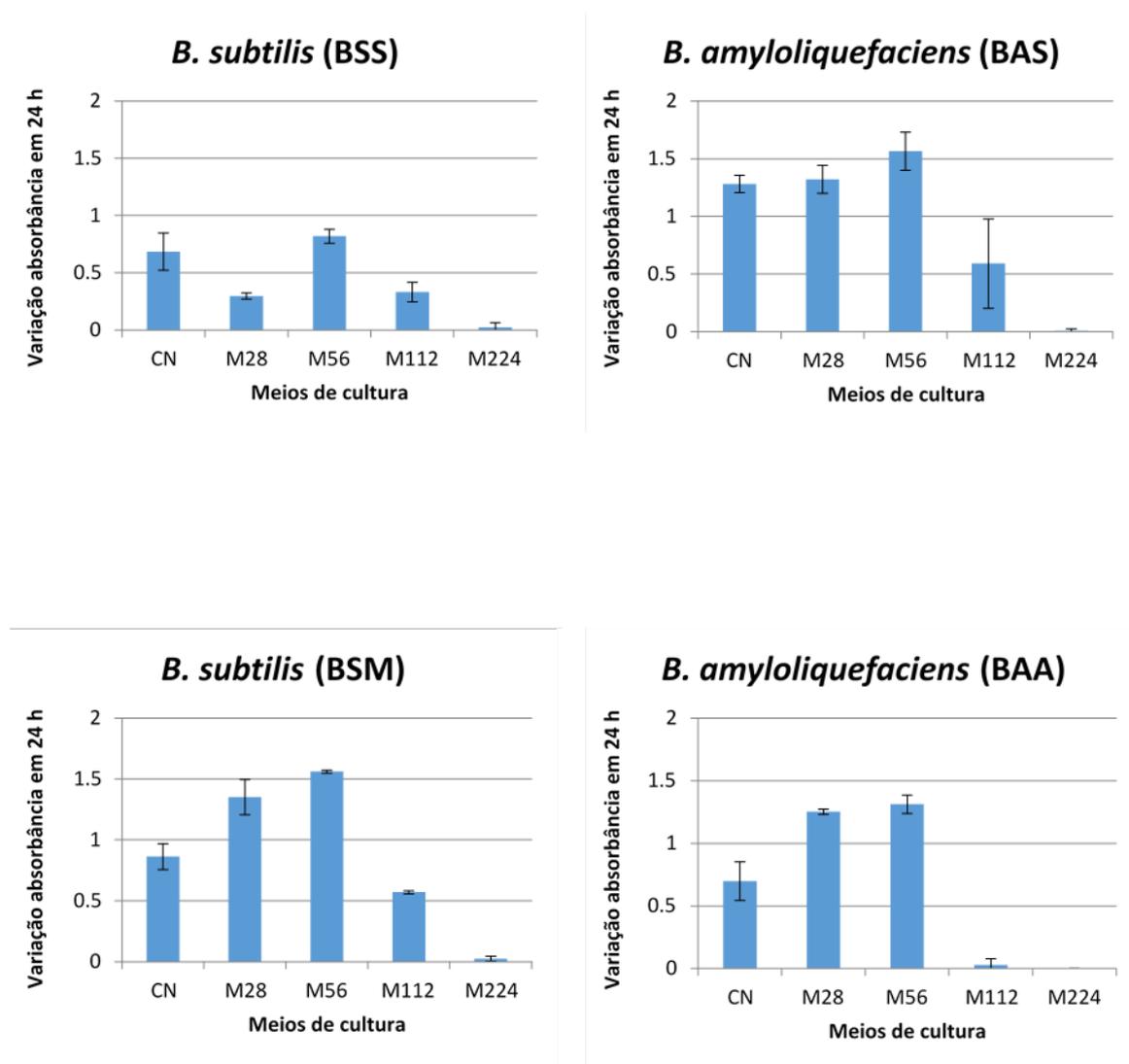
Os dados de primeira contagem de germinação e germinação foram transformados utilizando a expressão \sqrt{x} , visando atender os critérios de normalidade. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas utilizando o teste Tukey em nível de 5 % de significância.

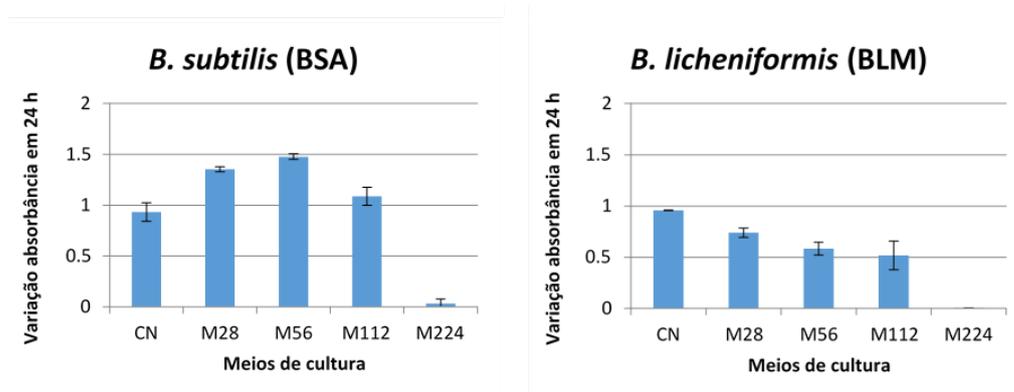
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação preliminar do crescimento das linhagens de *Bacillus* em melaço de soja com diferentes concentrações de ART

Os resultados do crescimento das seis linhagens de *Bacillus* em melaço de soja com diferentes concentrações de ART em comparação com o meio caldo nutriente indicaram que nos meios de melaço com 28 e 56 g L⁻¹ de ART houve maior crescimento das bactérias, ou seja, maior variação da absorbância ao final de 24 horas de cultivo (Figura 5). Com exceção das linhagens *B. subtilis* (BSS) e *B. licheniformis* (BLM), o crescimento nos meios de melaço de soja nas concentrações de 28 e 56 g L⁻¹ de ART foi mais expressivo do que em caldo nutriente. A concentração de 224 g L⁻¹ de ART no melaço foi inibitória para o crescimento de todas as linhagens (Figura 5).

Figura 5. Crescimento (variação de absorbância no período de 24 h) de linhagens de bactérias do gênero *Bacillus* em meio de melaço de soja em quatro diferentes concentrações de açúcar redutor total (ART) em comparação com o meio Caldo nutriente (CN). M28= melaço de soja 28 g L⁻¹ ART; M56= melaço de soja 56 g L⁻¹ ART; M112= melaço de soja 112 g L⁻¹ ART; M224= melaço de soja 224 g L⁻¹ ART. Os valores se referem à média das triplicatas e desvio-padrão.





Baseado nos resultados de crescimento em 24h, foram selecionadas para as próximas etapas experimentais as linhagem *B. subtilis* (BSA), *B. amyloliquefaciens* (BAA) e *B. licheniformis* (BLM) e os meios de melação de soja com 28 e 56 g L⁻¹ de ART.

A escolha da linhagem de *B. subtilis* (BSA), deveu-se ao fato de que foi a que apresentou resultados mais consistentes com relação ao crescimento nos meios de cultura, quando comparada as outras duas linhagens dessa espécie e por ser uma linhagem proveniente de coleção de cultura. A mesma justificativa e critérios de escolha se aplicam à *B. amyloliquefaciens* (BAA)

Quanto a *B. licheniformis*, embora o crescimento nos meio de melação de soja tenha sido menor que no meio caldo nutriente, é uma espécie de *Bacillus* empregada na produção do ácido gama-poliglutâmico (MEDEIROS, 2020), somado ao fato de neste experimento só ter sido testada uma linhagem dessa espécie.

Quanto aos meios de melação de soja com 28 e 56 g L⁻¹ de ART a escolha foi determinada pelos melhores resultados de crescimento das linhagens supracitadas em 24h de cultivo (Figura 5).

5.2 Avaliação do crescimento das linhagens selecionadas e produção de ácido gama-poliglutâmico (γ -PGA) e ácido indolacético (AIA) por densidade óptica em espectrofotômetro

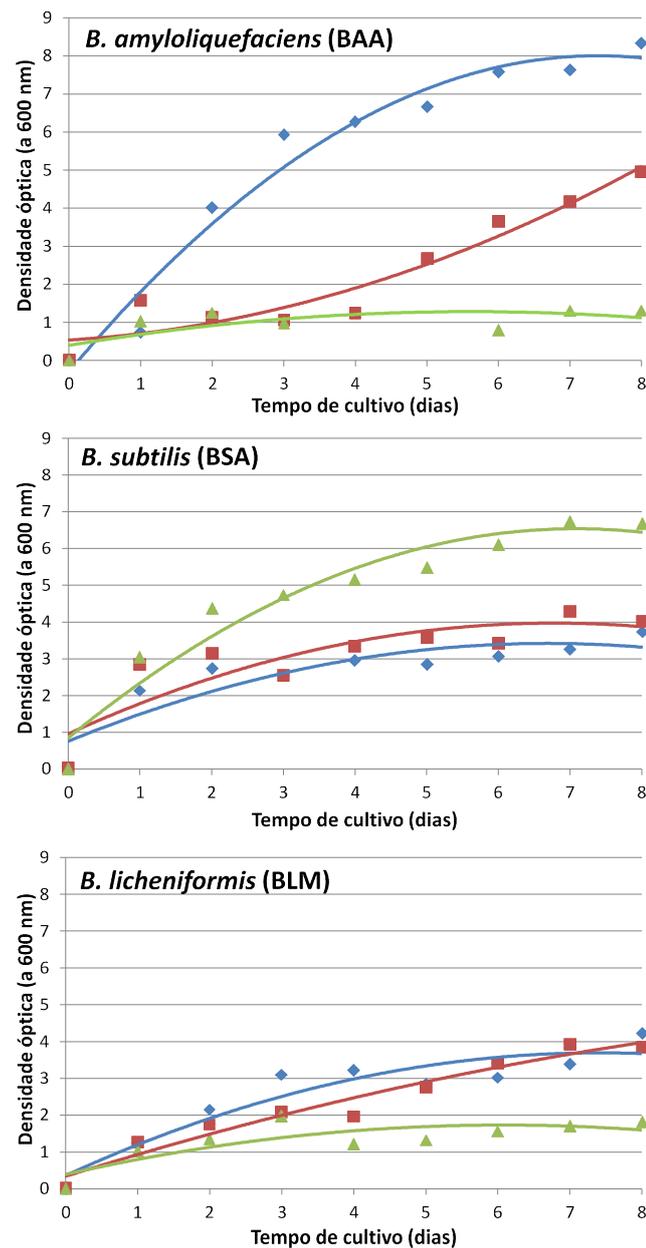
O *B. subtilis* (BSA) apresentou maior crescimento em relação à *B. amyloliquefaciens* (BAA) e *B. licheniformis* (BLM) nos meios de melação de soja durante 8 dias de cultivo, quando comparado com o caldo E (Figura 6). Entre

os meios de melação de soja, o meio com 56 g L⁻¹ de ART proporcionou maior crescimento da *B. subtilis* (BSA) (Figura 6) .

Para *B. licheniformis* (BLM), as curva de crescimento entre caldo E e meio de melação de soja com 28 g L⁻¹ de ART foram semelhantes (Figura 6). Houve pouco crescimento de *B. licheniformis* e *B. amyloliquefaciens* (BAA) em meio de melação com 56 g L⁻¹ de ART (Figura 6).

A diferença na fonte de carbono dos meios interfere no crescimento das bactérias. O caldo E é o meio recomendado para produção de γ -PGA (MEDEIROS, 2020), onde o glicerol é a fonte de carbono. Já no melação de soja as fontes de carbono predominantes são estaquiose, rafinose e sacarose (COSTA, 2023). Aparentemente o *B. subtilis* (BSA) aproveitou melhor o carbono advindo dos açúcares do melação de soja na concentração de 56 g L⁻¹ de ART, quando comparado com os demais.

Figura 6. Crescimento (densidade óptica) de espécies do gênero *Bacillus* em meio de melaço de soja nas concentrações de 28 g L⁻¹ (vermelho) e 56 g L⁻¹ (verde) de açúcar redutor total (ART) em comparação com o meio Caldo E (azul) após oito dias de cultivo. Os valores se referem à média das triplicatas.



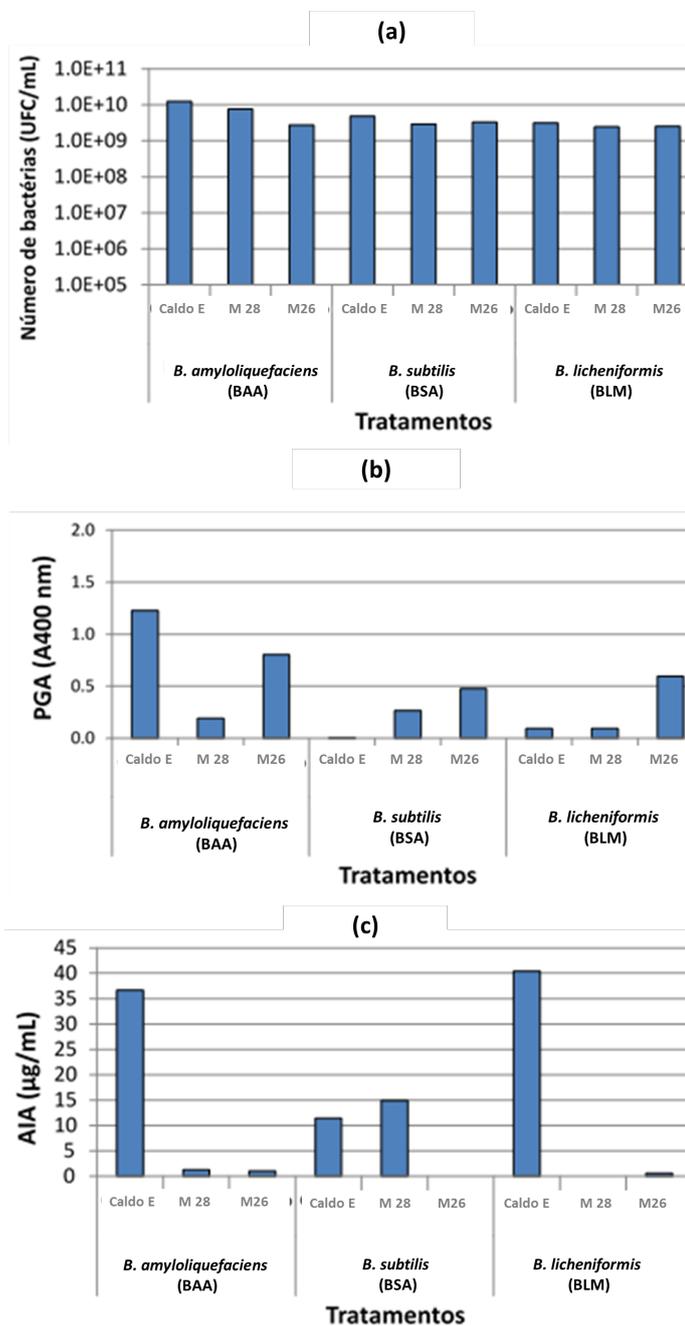
O número de UFC dos *Bacillus* selecionados (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*) foi semelhante nos dois meios de melaço de soja e no caldo E (Figura 7 a), indicando crescimento e atividade dos microrganismos após oito dias de cultivo.

Analisando a produção de γ -PGA por absorvância 400 nm, para o *B. amyloliquefaciens* (BAA) a maior produção ocorreu no meio caldo E. Já para a *B. licheniformis* (BLM) e *B. subtilis* (BSA), a produção do γ -PGA foi observada mais expressivamente no meio melaço de soja 56 g L⁻¹ de ART quando comparado ao caldo E (Figura 7 b).

Quanto a produção de ácido indolacético (AIA), observou-se que o *B. amyloliquefaciens* (BAA) e *B. licheniformis* (BLM) apresentaram maior produção em caldo E, quando comparado aos meios de melaço de soja, nos quais a produção de AIA, foi reduzida (Figura 7 c). Para o *B. subtilis* (BSA) a maior produção de AIA foi no meio melaço com 28 g L⁻¹ de ART, seguido pelo caldo E (Figura 7 c). As fontes de nutrientes no meio, o pH, a temperatura e até o fornecimento de oxigênio podem afetar a produção do AIA por microrganismos (SCARCELLA et al., 2017).

No intervalo de tempo avaliado, 8 dias, *B. subtilis* (BSA) nos meios de melaço 28 e 56 g L⁻¹ ART teve maior crescimento, produção γ -PGA (absorvância 400 nm) e de IAA avaliado por densidade óptica, quando comparados com o meio caldo E (Figuras 7 a, b e c).

Figura 7. Número de bactérias (UFC ml⁻¹) (a), ácido gama-poliglutâmico (γ -PGA, absorvância A400 nm) (b) e ácido indolacético (AIA $\mu\text{g ml}^{-1}$) (c) nos meios de melação de soja nas concentrações de 28 g L⁻¹ (M 28) e 56 g L⁻¹ (M 56) de açúcar redutor total (ART) em comparação cultivo.



5. 5 Produção de γ -PGA pelas linhagens de *Bacillus* nos meios de melaço de soja e caldo E.

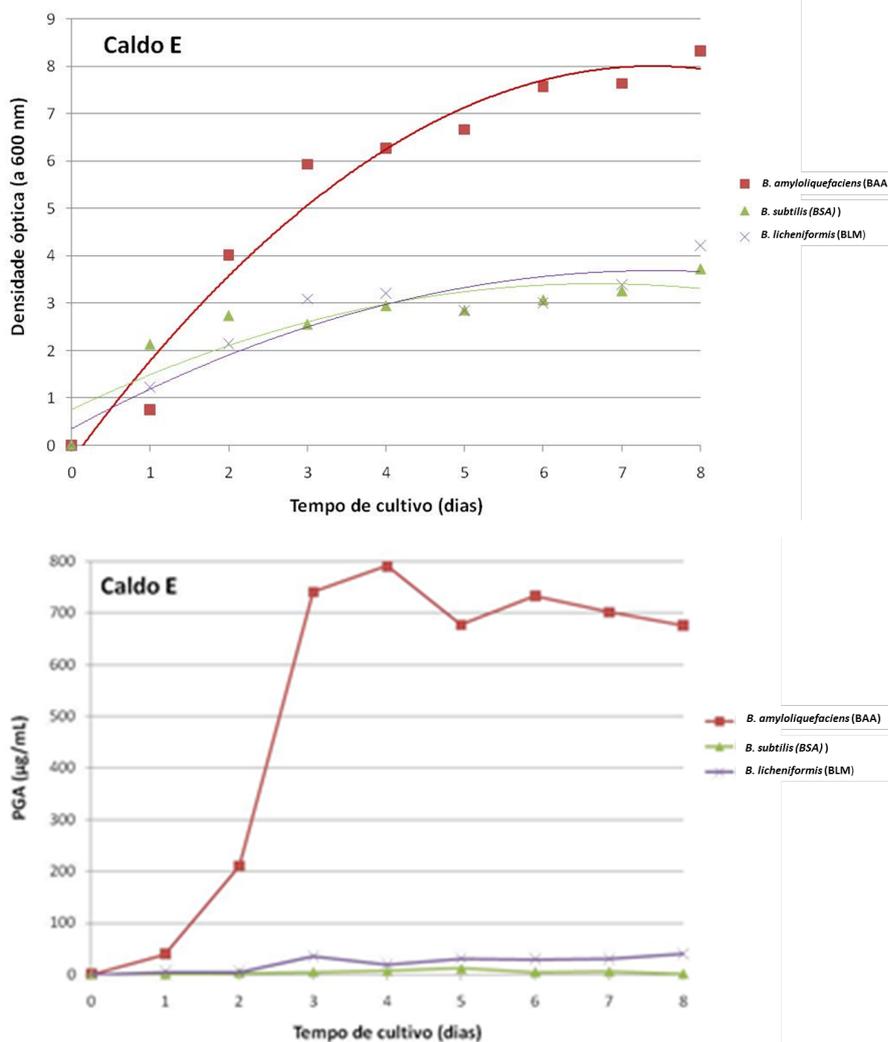
Durante a determinação da concentração de γ -PGA, após procedimento de extração com metanol, as amostras do meio de melaço no tempo zero de crescimento e do meio de melaço sem inoculação da bactéria apresentaram turvação o que resultou em absorvância superior ao branco (água no lugar do meio de cultura) no comprimento de onda de 400 nm, conforme protocolo proposto por Medeiros (2020) para a quantificação do γ -PGA. Isso não ocorreu com o caldo E, que é um meio semissintético. Mediante a esse fato, os valores de concentração do γ -PGA no tempo zero foram descontados dos valores calculados ao longo do crescimento.

Para analisar os resultados de crescimento bacteriano e produção de γ -PGA ao longo do tempo, devemos considerar que o caldo E tem em sua composição ácido cítrico (12 g L^{-1}) e glicerol (80 g L^{-1}) como fontes de carbono, além de 20 g L^{-1} de ácido glutâmico e sais. E no que diz respeito à biossíntese de γ -PGA, as fontes de carbono adequadas dependem das linhagens de bactérias utilizadas. Geralmente, glicose, glicerol, maltose, ácido cítrico, frutose e sacarose são as fontes de carbono comuns para a produção de γ -PGA como componentes simples ou combinados no meio de produção (MEDEIROS, 2020).

Aparentemente o *B. amyloliquefaciens* (BAA) assimila tanto glicerol quanto ácido cítrico para a produção de γ -PGA, que em termos quantitativos estão em maior concentração no meio caldo E do que a concentração de açúcares nos meios de melaço de soja. Isso resultou no crescimento mais expressivo dessa bactéria no meio caldo E em relação às outras duas linhagens avaliadas (Figura 8).

A produção de γ -PGA por *B. amyloliquefaciens* (BAA) atingiu cerca de 800 mg L^{-1} ao final de 4 dias de crescimento, sendo, em partes, concomitante ao crescimento da bactéria (Figura 8). O caldo E tem ácido glutâmico em sua composição, o que pode ter favorecido a maior produção de γ -PGA. (MEDEIROS, 2020) Porém, a produção de γ -PGA foi inferior aos valores da literatura.

Figura 8. Crescimento de *B. amyloliquefaciens* (BAA), *B. subtilis* (BSA) e *B. licheniformis* (BLM) e produção de γ -PGA em meio caldo E. Os valores se referem à média das triplicatas.



Não houve diferença no crescimento de *B. licheniformis* (BLM) e *B. subtilis* (BSA) no caldo E e esses foram inferiores ao apresentado por *B. amyloliquefaciens* (BAM). A produção de γ -PGA também foi semelhante para *B. licheniformis* (BLM) e *B. subtilis* (BSA) no caldo E., não ultrapassando 50 mg L⁻¹ para *B. licheniformis* (Figura 8).

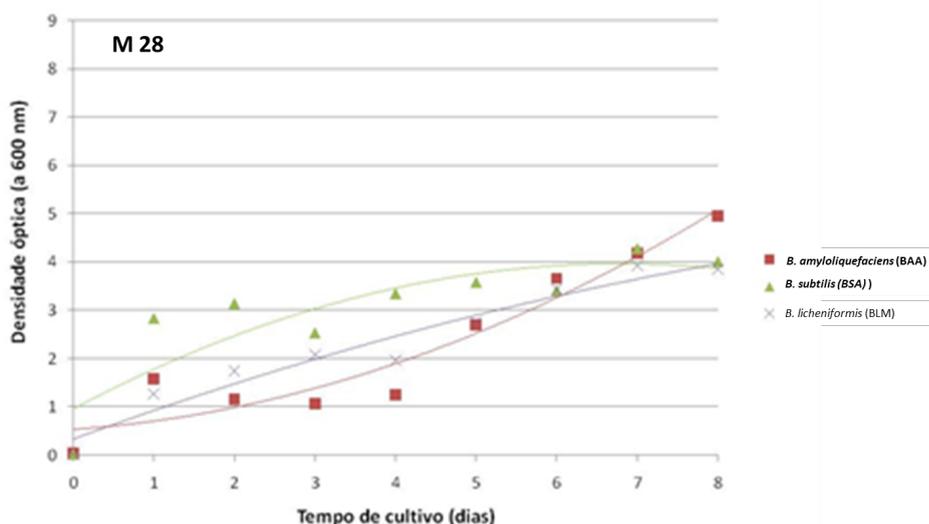
Ko e Gross (1998) avaliaram que a glicose foi uma fonte de carbono melhor que glicerol para o crescimento de *B. licheniformis*. Já para a produção de γ -PGA, os mesmos autores verificaram que a mistura de glicose e glicerol, proporcionou aumento na produção do biopolímero.

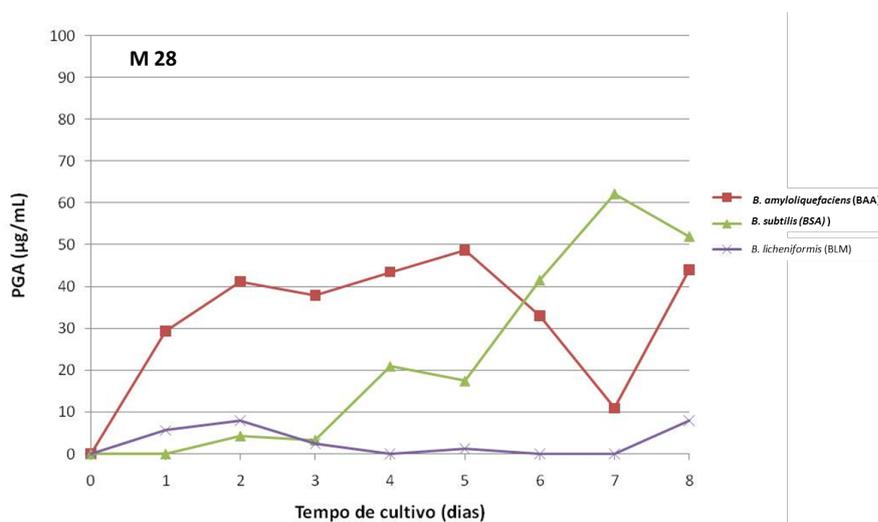
No caldo E, devido as diferentes fontes de carbono disponíveis, houve favorecimento para o crescimento e produção de γ -PGA para *B. amyloliquefaciens*, mas, não para *B. subtilis* e *B. licheniformis*. Corroborando com os resultados de crescimento nos meios de melaço de soja 28 e 56 g L⁻¹ ART, onde os *B. subtilis* e *B. licheniformis* cresceram mais do que *B. amyloliquefaciens* (Figura 8).

O meio melaço de soja 28 g L⁻¹ de ART incrementou o crescimento de *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens*, mas não o de *B. licheniformis* (Figura 9).

Quanto à produção de γ -PGA, apesar do crescimento lento de *B. amyloliquefaciens* em melaço de soja 28 g L⁻¹ de ART, houve produção de γ -PGA a partir de 24 h de cultivo, mantendo-se até 5 dias (~50 μ g mL⁻¹) quando houve redução na concentração de γ -PGA. Essa redução coincidiu com o aumento no crescimento do microrganismo, o que permitiu inferir que o açúcar foi empregado para produção do biopolímero γ -PGA em detrimento do crescimento e que a seguir houve consumo do biopolímero, talvez pelo esgotamento do açúcar, resultando em aumento no crescimento após 5 dias. Nas condições supracitadas, meio e microrganismo, a produção de γ -PGA não excedeu 50 μ g L⁻¹ (Figura 9).

Figura 9. Crescimento de *B. amyloliquefaciens* (BAA), *B. subtilis* (BSA) e *B. licheniformis* (BLM) e produção de γ -PGA (densidade óptica) em meio de melaço de soja com 28 g L⁻¹ (M28) de açúcar redutor total (ART). Os valores se referem à média das triplicatas.



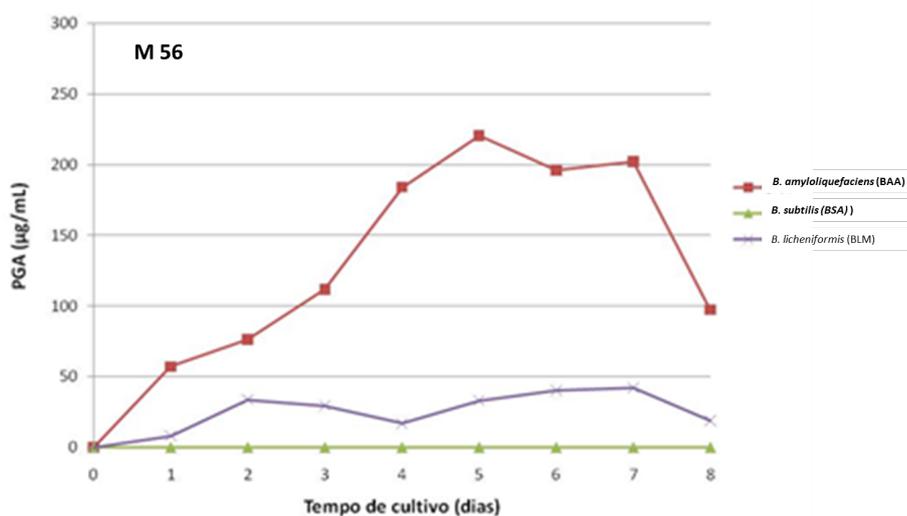
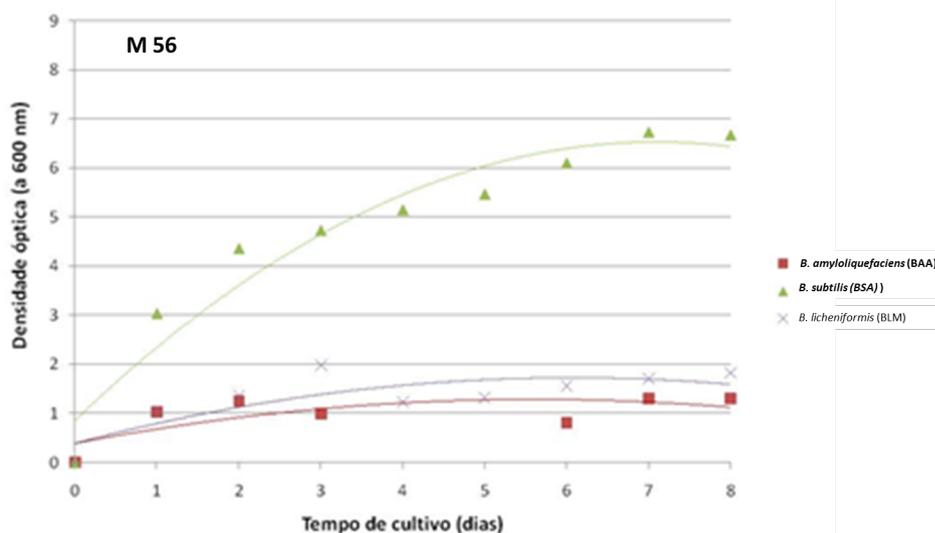


Já com *B. subtilis* observou-se situação inversa, a bactéria estabilizou o crescimento por volta de 5 dias e a produção de γ -PGA aumentou gradativamente até atingir o pico em 7 dias ($60 \mu\text{g g L}^{-1}$). Embora o crescimento do *B. subtilis* em melão 28 g L^{-1} ART tenha sido semelhante ao do caldo E, a produção de γ -PGA foi superior no meio de melão de soja 28 g L^{-1} ART (Figura 9).

Para *B. licheniformis*, o crescimento e a produção de γ -PGA foram menores no meio melão de soja 28 g L^{-1} ART. A produção de γ -PGA atingiu o máximo de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ em 2 h no meio melão de soja 28 g L^{-1} ART e de 35 a $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ após 3 h em caldo E (Figuras 8 e 9)

No meio melão de soja com 56 g L^{-1} ART, apesar do reduzido crescimento de *B. amyloliquefaciens*, a produção de γ -PGA alcançou $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ após 5 dias. Para o *B. subtilis*, o meio de melão com maior concentração de açúcar resultou em maior crescimento da bactéria, porém sem produção de γ -PGA. Com *B. licheniformis*, o crescimento foi semelhante ao de *B. amyloliquefaciens*, porém com produção de γ -PGA na faixa de 20 a $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 10)

Figura 10. Crescimento de *B. amyloliquefaciens* (BAA), *B. subtilis* (BSA) e *B. licheniformis* (BLM) e produção de γ -PGA (densidade óptica) em meio de meloço de soja com 56 g L⁻¹ (M56) de açúcar redutor total (ART). Os valores se referem à média das triplicatas.

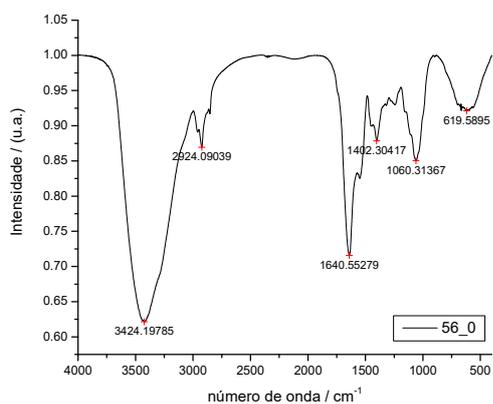
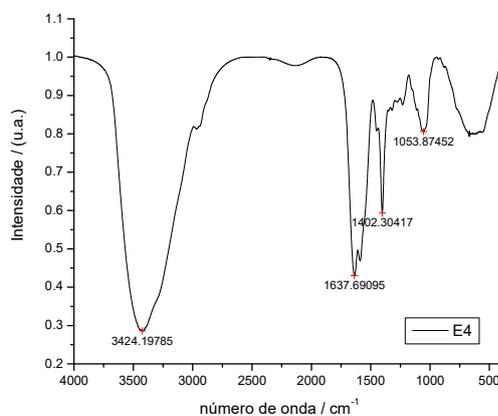
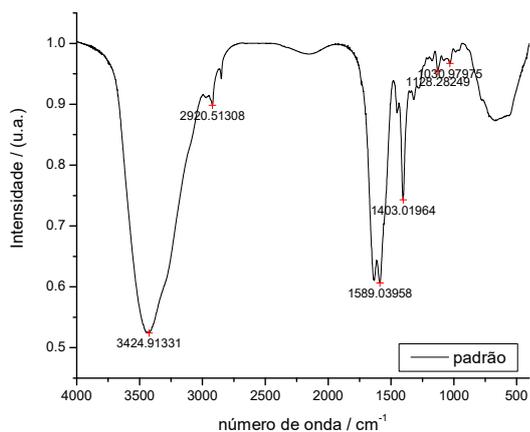


5.3 Identificação do γ -PGA pelo método de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier - FTIR

Considerando as interferências relatadas na identificação do γ -PGA por meio da espectrofotometria, buscou-se identificar o biopolímero por meio dos espectros de FTIR. A avaliação da presença do γ -PGA nas amostras do meio de melação não inoculado e inoculado com a bactéria *B. amyloliquefaciens* no tempo zero (inicial) e após 5 dias de crescimento, em comparação com a amostra do meio caldo E cultivado com a mesma bactéria por 4 dias, foram comparados com o padrão (γ -PGA Sigma®) e com o meio de melação sem inoculação da bactéria.

O espectro da amostra padrão do γ -PGA (Sigma®) apresenta as seguintes bandas: 3424 cm^{-1} relativa aos grupos O-H, uma banda fraca em 2924 cm^{-1} relativas aos grupos C-H, banda da amida I N-H em 1632 (1589) cm^{-1} , banda em 1403 cm^{-1} relativa aos grupos C=O. Apresenta ainda uma banda fraca em 1128 cm^{-1} devido ao estiramento C-N e C-O e uma banda em 680 cm^{-1} devido aos grupos N-H do polímero (Figura 11).

Figura 11. Espectro de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da amostra de γ -PGA Sigma® (padrão). Espectro de FTIR para a amostra obtida após extração do γ -PGA do caldo E cultivado com *B. amyloliquefaciens* por 4 dias (E4). Espectro de FTIR para a amostra obtida após extração do γ -PGA do meio de melação de soja 56 g L⁻¹ de açúcar redutor inoculado com *B. amyloliquefaciens* no tempo zero (56-0).



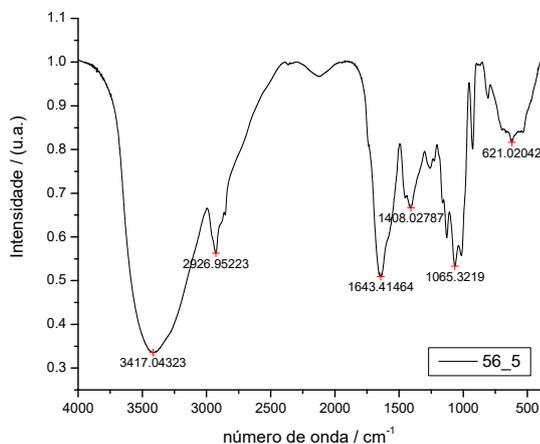
O espectro da amostra obtida após extração do γ -PGA do cultivo de *B. amyloliquefaciens* em caldo E por 4 dias apresenta as mesmas bandas características observadas para a amostra padrão: bandas em 3424, 2950, 1637, 1402, 1053 e 635 cm^{-1} relativas aos estiramentos dos grupos O-H, C-H, amida I N-H, C=O, C-N e/ou C-O, e N-H, respectivamente (Figura 11).

Observa-se que a banda afiada de intensidade média a forte em 1402 cm^{-1} é bem característica do polímero obtido.

No espectro para a amostra obtida após extração do γ -PGA no meio de melaço com 56 g L^{-1} ART no tempo zero de crescimento com *B. amyloliquefaciens*, as bandas obtidas foram: 3424 cm^{-1} devido aos grupos O-H, 2924 cm^{-1} de média intensidade relativa aos grupos C-H, 1640 cm^{-1} relativa a amida I devido aos estiramentos N-H, 1402 cm^{-1} relativa aos grupos C=O e menos intensa que as amostras padrão e E4 (Figura 11). Apresenta banda de intensidade média em 1060 cm^{-1} devido ao estiramento C-N e C-O e uma banda em 619 cm^{-1} devido aos grupos N-H do polímero. A amostra apresenta, portanto o polímero γ -PGA.

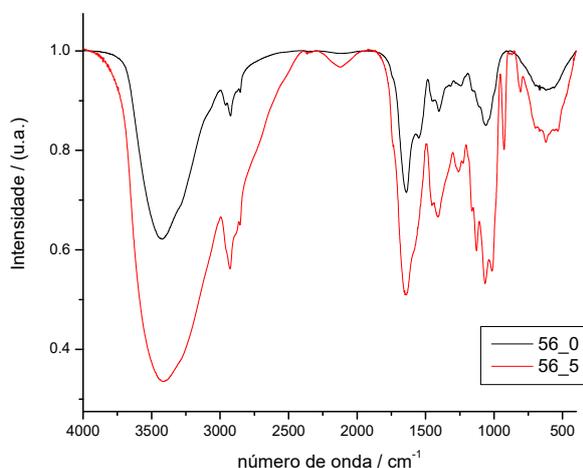
Com relação às bandas observadas para a amostra obtida após extração do γ -PGA no meio de melaço com 56 g L^{-1} ART após 5 dias de crescimento com *B. amyloliquefaciens*, verifica-se: banda 3417 cm^{-1} devido aos grupos O-H, 2926 cm^{-1} de média intensidade relativa aos grupos C-H, 1643 cm^{-1} relativa a amida I devido aos estiramentos N-H, 1408 cm^{-1} relativa aos grupos C=O, menos intensa que as amostras padrão e em caldo E, mas mais intensa que a amostra em meio de melaço no tempo zero de crescimento da bactéria (Figura 12). Apresenta também banda intensa em 1065 cm^{-1} devido ao estiramento C-N e C-O e uma banda em 621 cm^{-1} devido aos grupos N-H do polímero (Figura 12). Este resultado indica que foi possível produzir o polímero γ -PGA a partir do melaço de soja com 56 g L^{-1} de ART por *B. amyloliquefaciens* após cinco dias de fermentação.

Figura 12. Espectro de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para a amostra obtida após extração do γ -PGA do meio de meloço de soja com 56 g L⁻¹ de açúcar redutor cultivado com *B. amyloliquefaciens* por cinco dias (56-5).



Os espectros das amostras em meio de meloço de soja com 56 g L⁻¹ de ART nos tempos zero e após cinco dias de crescimento com *B. amyloliquefaciens* ao serem comparados, indicam que a banda na região de 1400 cm⁻¹ é mais intensa para a amostra retirada aos cinco dias (Figura 12), sugerindo que o γ -PGA está mais puro nesse tempo de cultivo do que na amostra no tempo zero.

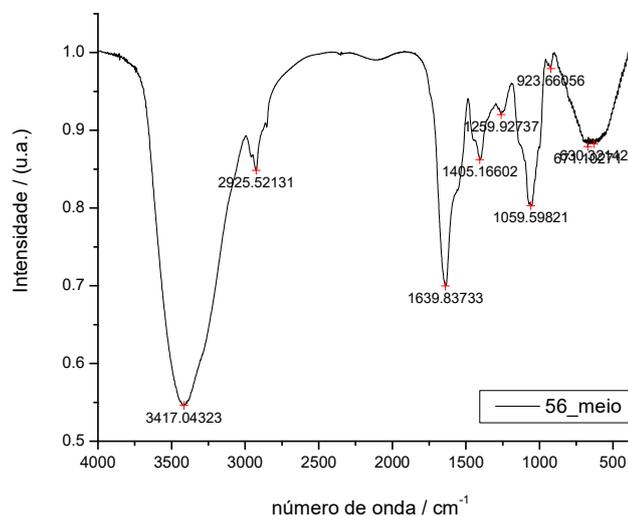
Figura 13. Espectros de FTIR para as amostras obtidas após extração do γ -PGA do meio de meloço de soja com 56 g/L de açúcar redutor inoculado com *B. amyloliquefaciens* no tempo zero (linha preta) em comparação com a amostra após 5 dias de crescimento da bactéria (linha vermelha).



A relação entre as intensidades das bandas na região de 1630 e 1400 cm^{-1} sugere maior grau de pureza para o polímero obtido. O valor da razão entre as bandas 1630/1400 para a amostra padrão é 1,49. Essa relação para as amostras em caldo E por 4 dias, em meio de melaço no tempo zero e em meio de melaço após 5 dias de cultivo com *B. amyloliquefaciens* é 1,43, 2,35 e 1,47, respectivamente. Ou seja, valores mais próximos de 1,49 indicam que o polímero obtido tem maior pureza. De fato, a amostra do meio de melaço no tempo zero apresenta o valor mais alto para a razão 1630/1400, ou seja, a banda característica na região de 1400 cm^{-1} é menos pronunciada nessa amostra, indicando maior impureza em comparação com as outras amostras.

O espectro da amostra do meio de melaço de soja com 56 g L^{-1} de açúcar redutor sem inoculação da bactéria (Figura 14) é semelhante ao espectro obtido para a amostra do meio de melaço no tempo zero de crescimento da bactéria (Figura 11). As bandas obtidas foram: 3417 cm^{-1} devido aos grupos O-H, 2925 cm^{-1} relativa aos grupos C-H, 1640 cm^{-1} referente a amida I devido aos estiramentos N-H, 1405 cm^{-1} relativa aos grupos C=O, banda em 1060 cm^{-1} devido ao estiramento C-N e C-O e uma banda em 630 cm^{-1} referente aos grupos N-H do polímero. A relação 1630/1400 para essa amostra é aproximadamente 2,22, valor próximo ao obtido para a amostra do meio de melaço no tempo zero. Ou seja, a banda característica na região de 1400 cm^{-1} é menos pronunciada nessa amostra também.

Figura 14. Espectro de FTIR para a amostra obtida após extração do γ -PGA do meio de melaço de soja com 56 g/L de açúcar redutor sem inoculação da bactéria *B. amyloliquefaciens*.

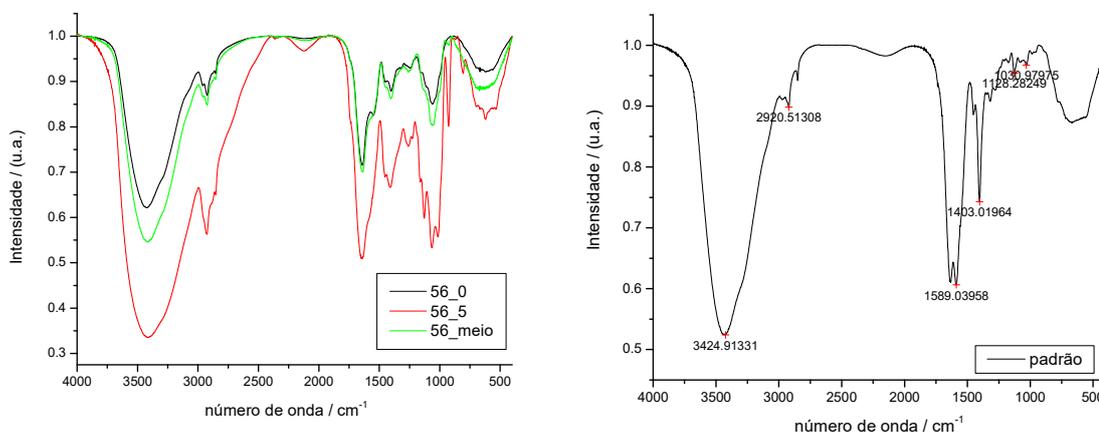


A intensidade das bandas para as amostras do meio de melaço sem inoculação e com inoculação da bactéria no tempo zero é semelhante (Figura 11), indicando que as duas amostras apresentam composição química semelhante, ou seja, o polímero ácido gama-poliglutâmico (γ -PGA) pode estar presente na amostra misturado com outras impurezas. Entretanto, as bandas para a amostra do meio após 5 dias de crescimento da bactéria apresentam-se em maior intensidade, sugerindo a formação de quantidades expressivas do ácido gama-poliglutâmico nesse meio com essa bactéria (Figura 15).

Em resumo, a turvação da amostra após extração do γ -PGA do meio de melaço sem inoculação da bactéria indica que há alguma substância presente no melaço de soja que é extraída com metanol e apresenta absorvância na faixa do comprimento de onda de 400 nm, corroborado também pelo espectro de infravermelho, que apresentou banda característica do polímero γ -PGA no melaço de soja. No entanto, ressalta-se que a bactéria *B. amyloliquefaciens* produziu γ -PGA no meio de melaço de soja com 56 g L⁻¹ de açúcar redutor após 5 dias de crescimento, pois as bandas características do polímero são mais intensas na amostra do meio cultivado com a bactéria, concordando com os resultados da espectrofotometria. O crescimento da bactéria no meio de

melaço de soja pode ter levado ao consumo de substâncias que apresentavam bandas nos espectros de FTIR próximos às bandas do γ -PGA. Desta forma, as bandas características do γ -PGA na amostra do cultivo da bactéria após 5 dias estão mais puras e mais intensas.

Figura 15. Espectros de FTIR para as amostras obtidas após extração do γ -PGA do meio de melaço de soja com 56 g/L de açúcar redutor não inoculado (linha verde), inoculado com *B. amyloliquefaciens* no tempo zero (linha preta) em comparação com a amostra após 5 dias de crescimento da bactéria (linha vermelha) em comparação ao Espectro de FTIR da amostra de γ -PGA Sigma® (amostra padrão).



5. 4 Efeitos bioestimulantes do melaço de soja fermentado no tratamento de sementes de milho

O bioestimulante a base de melaço de soja 56 g L⁻¹ de ART fermentado por *Bacillus amyloliquefaciens* durante cinco dias não filtrado, inicialmente, retardou a germinação das sementes de milho, quando comparado com a água, dados referentes a primeira contagem de germinação (Tabela 3). Porém, o efeito não persistiu na avaliação final da germinação das sementes de milho. Para esta variável não houve diferença entre os bioestimulantes filtrado e não filtrado, o melaço de soja e a água.

Tabela 3. Primeira contagem de germinação, segunda contagem germinação de sementes, comprimento de raiz e parte aérea, massa seca de raiz e parte aérea de plântulas de milho em função de bioestimulantes a base de melão de soja fermentado.

Tratamentos	Germinação		Comprimento		Massa seca	
	1ªContagem	2ªContagem	Raiz	P. aérea	Raiz	P.aérea
	%		cm ⁻¹ plântula	cm ⁻¹ plântula	mg ⁻¹ plântula	mg ⁻¹ plântula
Filtrado	66,6 ab ¹	71,4 ^{ns}	11,55 a	5,25 b	27,9 ^{ns}	30,0 ^{ns}
Não Filtrado	63,2 b	71,6	11,25 a	4,67 b	32,1	28,2
Melaço de soja	64,2 ab	70,0	7,10 b	7,19 a	32,0	29,6
Água	68,6 a	78,2	9,86 a	5,16 b	31,7	32,6
CV %	2,27	7,47	13,57	17,48	16,02	13,35

^{ns} Não significativo de acordo com o teste F em nível de 5% de probabilidade. ¹Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna, não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey em nível de 5% de significância.

O efeito bioestimulante depende dos componentes produzidos durante o processo de fermentação, da presença e ou ausência de células das bactérias promotoras de crescimento. A maioria dos bioestimulantes comerciais são biorreguladores com efeito nas auxinas, nas citocininas e no ácido giberélico (FERREIRA et al., 2016). As auxinas, promovem formação de raízes, alteram a permeabilidade das membranas e proporcionam alongamento celular (TAIZ e ZEIGER, 2012). Verificou-se produção de ácido indolacético, hormônio da classe das auxinas, no meio melaço de soja com 56 g L⁻¹ de ART inoculado com *Bacillus amyloliquefaciens*, porém em concentração inferior a 5 ug mL⁻¹ (Figura 7).

A concentração do AIA no bioestimulante pode não ter sido suficiente para estimular o processo de germinação das sementes e o desenvolvimento das raízes nas plântulas de milho. Buchelt et al. (2019) não encontraram efeitos de bioestimulantes comerciais, com diferentes concentrações de giberelina, cinetina, auxina e ácido giberélico, na germinação de sementes de milho. Para os autores os bioestimulantes podem ter efeito mais pronunciado em situações de estresse.

Já o γ -PGA atua no metabolismo celular, o ácido L-glutâmico (componente do γ -PGA), apresenta diversas funções biológicas, como precursor da síntese de clorofila (YARONSKAYA et al., 2006), regulador do

carbono e do metabolismo do nitrogênio (ROBINSON et al., 1991). Neste sentido, a ação na germinação e desenvolvimento inicial das plântulas de milho pode ser menos pronunciada. Pois, nos estádios iniciais de desenvolvimento, a plântula de milho não realiza fotossíntese e os nutrientes advém da reserva da semente (MAGALHÃES et al., 2002).

Carvalho et al. (2013) estudando a aplicação do aminoácido ácido L-glutâmico, via tratamento de sementes nas concentrações de 75, 150 e 300 mg L⁻¹, verificou que o mesmo não favoreceu o desenvolvimento de plântulas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), interferindo negativamente na germinação, quando o potencial osmótico foi igual ou inferior a -0,2 MPa.

Alguns trabalhos já avaliaram os efeitos da inoculação de sementes de milho com cepas de *Bacillus amyloliquefaciens*. Silva et al. (2023) testou seis nº de UFC de *B. amyloliquefaciens* subsp. plantarum FZB42 (0,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 e 12,5 ml kg⁻¹sementes) semeadas em campo, sem verificar efeitos nas características agronômicas e na qualidade nutricional da silagem de milho. Milléo et al. (2023) estudou a eficiência agronômica do produto Phosbac-45 a base de *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 (2.5×10^{10} UFC ml⁻¹) na promoção do crescimento e rendimento das culturas de milho e soja em campo e verificou aumento da massa seca de parte aérea, massa seca de raízes e rendimento de grãos, correlacionados com a absorção de P pelas culturas milho e soja. Nesse sentido, aparentemente o efeito de *B. amyloliquefaciens* é mais pronunciado em estádios mais avançados de desenvolvimento do milho, ligado a maior solubilização de fósforo.

Desta forma, recomendamos avaliar a ação dos bioestimulantes filtrados e não filtrados em condições de campo, e durante maior tempo de desenvolvimento da cultura e utilizando maior número de materiais genéticos de milho.

6 CONCLUSÕES

As linhagens de *Bacillus* apresentaram maior crescimento em melaço de soja nas concentrações 28 e 56 g L⁻¹ de açúcar redutor total (ART) e a concentração 224 g L⁻¹ ART não foi favorável para o crescimento de todas as linhagens.

O *B. subtilis* apresentou crescimento mais expressivo em relação à *B. amyloliquefaciens* e *B. licheniformis*, com maior crescimento no meio melaço de soja 56 g L⁻¹ ART.

O *B. amyloliquefaciens* apresentou a maior produção do biopolímero ácido gama- poliglutâmico (γ -PGA) no meio melaço de soja 56 g L⁻¹ ART.

O γ -PGA oriundo da fermentação no meio melaço de soja 56 g L⁻¹ ART por *B. amyloliquefaciens* apresentou pureza semelhante ao γ -PGA sintético (padrão).

Os bioestimulantes produzidos por *B. amyloliquefaciens* em melaço de soja 56 g L⁻¹ ART filtrado e não filtrado não influenciaram a germinação e desenvolvimento inicial das plântulas de milho.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, F.F., HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum*/*Bradyrhizobium elkanii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.9, p.1633-1643,1999. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X1999000900014>.

BARBOSA, I. M. V., et al. **Otimização do tempo na produção de lipase por *Candida rugosa* em melaço de soja**, p. 645-650. In: São Paulo: Blucher, 2014. ISSN 2359-175. <https://doi.org/10.5151/chemeng-cobec-ic-07-eb-144>.

BATISTA, V. S. F. et al. Addition of microencapsulated soybean molasses to pasta formulations. **Ciência Rural** [online], v. 51, n. 9, e20200722, 2021. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200722>.

BHATTACHARYYA, D.; GARLADINNE, M.; LEE, Y. H. Volatile indole produced by *Rhizobacterium proteus vulgaris* JBL5202 stimulates growth of *Arabidopsis thaliana* through auxin, cytokinin, and brassinosteroid pathways. **Journal of Plant Growth Regulation**. v. 34, n.1, p. 158-168, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00344-014-9453-x>

BISPO, R. L. B. **Isolamento e seleção de leveduras promotoras de crescimento vegetal de solo sob cultivo de milho orgânico**. 2022, 88f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados). Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2022. Disponível em: <<https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/17043>>. Acesso em: dez. 2022.

BRAGA JUNIOR, G. M. et al. Efficiency of inoculation by *Bacillus subtilis* on soybean biomass and productivity. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. v.13, n.4, art. e5571, 2018. <http://dx.doi.org/10.5039/agraria.v13i4a5571>

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, 2009. **Regras para análise de sementes**. Brasília, SNDA/DND/CLAV, 308 p.

BRASIL. CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos, Brasília, DF, v. 10, safra 2022/23, n. 11 décimo primeiro levantamento, agosto 2023. Disponível em <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/graos/boletim-da-safra-de-graos>>. Acesso em: 15 ago. 2023.

BUHELDT, A. C., et al. Aplicação de bioestimulantes e *Bacillus subtilis* na germinação e desenvolvimento inicial da cultura do milho. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia-MS, v. 6, n. 4, p.69-74, out./dez. 2019. <https://doi.org/10.32404/rean.v6i4.2762>.

CALDEIRÃO, L., et al. Utilização de Melão de Soja para Obtenção de Bioetanol em Fermentação Estática. In: **Anais** do V Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia, São Paulo: Blucher, p. 374, 2015. <https://doi.org/10.5151/biochem-vsymbbtec-22171>.

CANDELA, T.; FOUET, A. Poly-gamma-glutamate in bacteria. **Molecular Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 1091–1098, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05179.x>

CARVALHO, T. C., et al. Influência de bioestimulantes na germinação e desenvolvimento de plântulas de *Phaseolus vulgaris* sob restrição hídrica. **Revista de Ciências Agrárias**. v.36, p. 199-205, 2013. <https://doi.org/10.19084/rca.16298>.

COSTA, E. M. da. **Produção de ácido láctico a partir de melão de soja: prospecção tecnológica, seleção de microrganismos, fermentação e modelagem matemática**. 2023. 98f. Dissertação (Mestrado profissional em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlia de Mesquita Filho”, Araraquara, 2023. Disponível em: <<http://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/56450b89-f8f5-4e9b-ab8f-cd4e56130005/content>>. Acesso em ago. 2023.

DU JARDIN, P. Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. **Sci Hortic (Amsterdam)**. v.196, p.3–7, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>.

EUROPEAN BIOSTIMULANTS INDUSTRY COUNCIL. Plant biostimulants contribute to climate-smart agriculture. Disponível em: <<https://biostimulants.eu/issue/plant-biostimulants-contribute-to-climate-smart-agriculture/>>. Acesso em: dez. 2023.

FABRINI, F. F., et al. Produção de lacase de *Pycnoporus sanguineus* em meio de cultivo a base de melão soja. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v. 19, n. 3, p. 159-164, jul./set. 2016. <https://doi.org/10.25110/arqvet.v19i3.6089>.

FERREIRA, B. A., et al. Influência de bioestimulantes e nutrientes na emergência e no crescimento inicial de feijão, soja e milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.15, n. 1, p. 86-93, 2016. <https://doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v15n1p86-93>.

GLIESSMAN, S. R. The Framework for Conversion. In: GLIESSMAN, S. R.; ROSEMEYER, M. **The Conversion to Sustainable Agriculture: Principles, Processes and Practices**. Boca Raton, 2010. p. 3-14.

GÓMEZ-MERINO, F. C; TREJO-TÉLLEZ, L. I. Biostimulant activity of phosphite in horticulture. **Scientia Horticulturae**. v. 196, p. 82-90, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.035>.

GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**. v. 26, p. 192-195, 1951. <https://doi.org/10.1104/pp.26.1.192>.

GUEDES, A. R. Determinação e análise de propriedades termofísicas do melão de soja. 2015. 90 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015. Disponível em: < <https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/37908>>. Acesso em: out. 2022.

KASPARY, R. M. **Produção de ácido gama-poliglutâmico em cultivo submerso em biorreator airlift a partir de bactérias do gênero *Bacillus***. 2022. 112 f. Tese (Doutorado em Ciências Ambientais). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Sorocaba, 2022. Disponível em: < <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/3b3b6611-2f4b-4f44-891b-e52d9aaadec6/content>>. Acesso em: jun. 2023.

KLAHOLD, C. A., et al. Resposta da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) à ação de bioestimulante. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 28, n. 2, p. 179-185, 2006. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/45088189_Resposta_da_soja_Glycine_max_L_Merrill_a_acao_de_bioestimulante_Soybean_Glycine_max_L_Merrill_response_to_biostimulant_action>. Acesso: ago. 2023.

KO, Y. H., GROSS, R. A. Effects of glucose and glycerol on γ -poly (glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a. **Biotechnology and bioengineering**, v. 57, n. 4, p. 430-437, 1998. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0290\(19980220\)57:4<430:aid-bit6>3.0.co;2-n](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0290(19980220)57:4<430:aid-bit6>3.0.co;2-n).

KUNDAN, R. et al. Plant growth promoting rhizobacteria: mechanism and current prospective. **Journal of Fertilizers and Pesticides**, v.6, n.2, p. 1-9, 2015. <https://doi.org/10.4172/jbfbp.1000155>.

LEHNINGER, A. L. (cord.) Princípios de bioquímica. 4ª ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

LUO, Z., et al. Microbial synthesis of poly- γ -glutamic acid: current progress, challenges, and future perspectives. **Biotechnol Biofuels**. v. 29, n.9,134, 2016. Doi: 10.1186/s13068-016-0537-7.

MAGALHÃES, P. C., et al. **Fisiologia do Milho**. Sete Lagoas, Embrapa Milho e Sorgo, 2002. 23p. (Circular Técnica n. 22). Disponível em: < https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPMS/15589/1/Circ_22.pdf>. Acesso em: jun. 2023.

MANDARINO, J. M. G., ROESSING, A. C. **Tecnologia para produção do óleo de soja: descrição, das etapas, equipamentos, produtos e subprodutos.** Londrina: Embrapa Soja, 2001. 40p. (Documentos / Embrapa Soja, n. 171). Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPSO/18455/1/doc171.pdf>>. Acesso em: dez. 2022.

MEDEIROS, T. A. M. **Análise da capacidade de *Bacillus* spp. na produção de ácido gama-poliglutâmico em diferentes condições de cultivo utilizando grãos de soja como substrato.** 2020, 98 f. Tese (Doutorado em Ciências Ambientais), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Sorocaba, 2020. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/a4cb9238-ee6a-46d5-8c1b-8ccc4ddd47b8/content>>. Acesso em: jun. 2021.

MILLÉO, M. V. R., et al. Eficiência agronômica de inoculante a base de *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 para as culturas de milho e soja. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.18, n.1, e2844. <https://doi.org/10.5039/agraria.v18i1a2844>.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n.3, p. 426–428, 1959. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>.

NARDI, S. et al. Plant biostimulants: physiological responses induced by protein hydrolyzed-based products and humic substances in plant metabolism. **Scientia Agricola [online]**, v. 73, n.1, p. 18-23, 2016. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0006>.

OGUNLEYE, A., et al. Poly- γ -glutamic acid: production, properties and applications. **Microbiology**, v. 161, n.1, p.1-17, 2015. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.081448-0>.

OLIVEIRA, M. P.; MALAGOLLI, G. A.; CELLA, D. Mercado de fertilizantes: dependência de importações do Brasil. **Revista Interface Tecnológica**, Taquaritinga, v. 16, n. 1, p. 489-498, 2019. Disponível em: <<https://revista.fatectq.edu.br/index.php/interfacetecnologica/article/view/606>>. Acesso em: out. 2021.

PECIN, S. B. **Melaço de soja como substrato para a produção microbiana de (1 \rightarrow 6)- β -D-glucana: avaliação do melaço bruto e do hidrolisado químico.** 2018. 65 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2018. Disponível em: <<http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/3986>>. Acesso em: dez. 2022.

QURESHI, N., LOLAS, A., BLASCHEK, H.P. Soy molasses as fermentation substrate for production of butanol using *Clostridium beijerinckii* BA101. **J. Ind.**

Microbiol. Biotechnol. v. 26, p.290-295, mai. 2001. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000131>.

RAJÃO, R. et al. Crise dos fertilizantes no Brasil: breve histórico e desafios para a próxima década. **Informe Agropecuário**. Remineralizadores e a fertilidade do solo, Belo Horizonte, v.44, n.321, p. 7-14, 2023.

ROBINSON, S. A., et al. The role of glutamate dehydrogenase in plant nitrogen metabolism. **Plant Cell Physiology**. v. 95, p. 509-516, 1991. <https://doi.org/10.1104/pp.95.2.509>.

RÖDER, C et al. Uso de biofertilizante na produção de mudas de repolho. **Revista Ceres** [online]. 2015, v. 62, n. 5, p. 502-505. <https://doi.org/10.1590/0034-737X201562050012>.

SANTOS, V. M. D., et al. Uso de bioestimulantes no crescimento de plantas de *Zea mays* L. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**. v. 12, n.3, p. 307–318, 2014. <https://doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v12n3p307-318>.

SATISH, C., et al. Bioquímicos puros e nanomateriais como bioestimulantes de próxima geração para a agricultura sustentável sob estresse abiótico – avanços recentes e escopo futuro. **Plant Signaling & Behavior**, v.18, n.1, 2023. <https://doi.org/10.1080/15592324.2023.2290336>.

SCARCELLA, A. S., et al. Temperature, pH and carbono source affect drastically indole acetic acid production of plant growth promoting yeasts. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 34, n. 2, p. 429-438, 2017. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20170342s20150541>.

SCHALLMEY, M., et al. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.50, n.1, p.1-17, 2004. <https://doi.org/10.1139/w03-076>.

SCHNEIDER, K. L. **Otimização das condições ambientais para produção de etanol a partir do melão de soja**. 2016. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2016. Disponível em: <<https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/45706>>. Acesso em: dez. 2022.

SILVA, A. V., et al. Agronomic characteristics, and yield of corn after inoculation with *Bacillus amyloliquefaciens*. **Revista Agrogeoambiental**, v.15, e20231730, 2023. <https://doi.org/10.18406/2316-1817v15nunico20231730>

SIQUEIRA, P. F. **Production of bio-ethanol from soybean molasse by *Saccharomyces cerevisiae***. 2025. 74f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007. Disponível em: <<https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/80919?show=full>>. Acesso em: dez. 2022.

SIQUEIRA, P., et al. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource Technology**, v.99, p.8156–8163, 2008. DOI: <<http://10.1016/j.biortech.2008.03.037>>.

SOUSA, S. M., et al. **Cepas de *Bacillus* e *Azospirillum* aumentam o crescimento e a absorção de nutrientes em milho em condições hidropônicas**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2018. 31 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 184). Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/192818/1/bol-184.pdf>>. Acesso em: ago. 2023.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 820 p.

XU, Z., et al. Calcium involved in the poly (γ -glutamic acid)-mediated promotion of Chinese cabbage nitrogen metabolism. **Plant Physiol Biochem**. v.80, p.144-52, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.03.036>.

XU, Z., et al. Effect of poly (γ -glutamic acid) on wheat productivity, nitrogen use efficiency and soil microbes. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v.13, p.744–755, 2013. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162013005000059>.

XU, Z., et al. Microbial production of poly- γ -glutamic acid. In: YANG, S. T.; EL-ENSHASY, H. A.; THONGCHUL, N. (Ed.). **Bioprocessing technologies in biorefinery for sustainable production of fuels, chemicals, and polymers**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2013, p. 427-439.

YARONSKAYA, E., et al. Cytokinin effects on tetrapyrrole biosynthesis and photosynthetic activity in barley seedlings. **Planta**. v. 224, p. 700–709, 2006. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0249-5>.

ZANDONADI, D. B. Bioestimulantes e produção de hortaliças. 01jan. 2016. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/14218786/bioestimulantes-e-producao-de-hortalicas>>. Acesso em: 13 dez. 2023.

ZHANG, D., et al. Economical production of poly(γ -glutamic acid) using untreated cane molasses and monosodium glutamate waste liquor by *Bacillus subtilis* NX-2. **Bioresour Technol**. Jun,114:583-8, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.114>.

ZHANG, L., et al. Effects of poly- γ -glutamic acid (γ -PGA) on plant growth and its distribution in a controlled plant-soil system. **Scientific Reports**, v.7, 6090, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06248-2>