

# CARACTERIZAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *BACILLUS SUBTILIS* EM PEQUENA E MÉDIA ESCALA LABORATORIAL

**Ana Clara Alves Souto**

Doutoranda em Agricultura Tropical, UFMT, Cuiabá, MT, Brasil.

E-mail: [anasouto2121@gmail.com](mailto:anasouto2121@gmail.com).

**Willian Mesquita Mendes**

Mestre, coordenador de pesquisa e desenvolvimento de bioprocessos,

Allbiom – Bioprocessos, Cajuru, SP, Brasil.

E-mail: [willianmendes.mesquita@gmail.com](mailto:willianmendes.mesquita@gmail.com).

**Ana Carla Stieven**

Professora doutora do Univag, Várzea Grande, MT, Brasil.

E-mail: [ana.stieven@univag.edu.br](mailto:ana.stieven@univag.edu.br).

**Daniela Tiago da Silva Campos**

Professora Doutora da UFMT, Cuiabá, MT, Brasil.

E-mail: [camposdts@yahoo.com.br](mailto:camposdts@yahoo.com.br).

**Resumo:** *Bacillus subtilis* são considerados promotores de crescimento de plantas, e o *Bacillus* caracteriza-se pela capacidade de formar endósporos, os quais são tolerantes ao calor e ao frio, bem como as condições extremas de pH, a pesticidas, fertilizantes e ao tempo de estocagem. Atualmente há um forte apelo para a utilização de produtos biológicos pelos agricultores e diversos produtos contendo como ingrediente ativo espécies do gênero *Bacillus* vêm sendo utilizados. Diante da demanda crescente pelo uso de produtos biológicos, neste estudo objetivou-se avaliar os parâmetros de crescimento de *B. subtilis* em diferentes meios de cultura com o intuito de adequar as condições de crescimento desse microrganismo em pequena e média escala, em laboratório. Para avaliação da produção de *B. subtilis*, utilizaram-se o meio de cultura caldo nutriente, dois meios comerciais, e um meio testado apenas em laboratório, com e sem agitação, em diferentes pH a temperatura de 28 °C. Nos três testes obtiveram-se resultados de crescimento, entretanto, concluiu-se que o *Bacillus subtilis* apresentou melhor crescimento no meio comercial 2, sob agitação de 120 rpm, a 28 °C, em pH 7,8.

**Palavras-chave:** Crescimento microbiano. Exigências nutricionais. Microrganismos.

**Abstract:** *Bacillus subtilis* are considered plant growth promoters, and *Bacillus* is characterized by the ability to form endospores, which are tolerant to heat and cold, as well as extreme pH conditions, pesticides, fertilizers and weather of storage. Currently there is a strong call for the use of organic products by farmers and several products containing species of the *Bacillus* genus as an active ingredient are being used. Given the growing demand for the use of biological products, this study aimed to evaluate the growth intervals of *B. subtilis* in different culture media with the aim of adapting the growth conditions of this microorganism on a small and medium scale, in the laboratory. To evaluate the production of *B. subtilis*, the nutrient broth culture medium, two commercial media, and a medium tested only in the laboratory, with and without improvement, at different pH at a temperature of 28°C were used. In the three tests we obtained growth results, however, we concluded that *Bacillus subtilis* showed better growth in commercial medium 2, under improvement of 120 rpm, at 28°C, at pH 7.8.

**Keywords:** Microbial growth. Nutritional requirements. Microorganisms.

## INTRODUÇÃO

A microbiota do solo tem um importante papel na qualidade do solo, na participação da ciclagem de nutrientes e na produção vegetal, seja de forma direta ou indireta, através do estabelecimento de associação com as plantas. Para conhecimento dos microrganismos presentes no solo são feitas análises, para as quais é necessário o uso de meios de culturas de crescimento específico para cada gênero de microorganismo.

A microbiota do solo refere-se ao conjunto diversificado de microrganismos que habitam o solo, incluindo bactérias, fungos, protozoários, vírus e outros organismos microscópicos. Essa comunidade microbiana desempenha um papel fundamental na qualidade e na saúde do solo, influenciando diversos processos e funções essenciais para os ecossistemas terrestres e para a agricultura sustentável.

## 1. PAPEL DA MICROBIOTA DO SOLO NA QUALIDADE DO SOLO

1. **Ciclagem de nutrientes:** Os microrganismos do solo são responsáveis pela decomposição da matéria orgânica, convertendo resíduos de plantas e animais em nutrientes minerais essenciais, como nitrogênio, fósforo e enxofre. Esses nutrientes são então disponibilizados para as plantas, contribuindo para a fertilidade do solo.
2. **Fixação de nitrogênio:** Algumas bactérias do solo são capazes de fixar o nitrogênio atmosférico, convertendo-o em formas que as plantas podem utilizar. Isso é crucial, pois o nitrogênio é um nutriente vital para o crescimento das plantas e muitas vezes limitado nos sistemas naturais.
3. **Controle de doenças:** Certos microrganismos do solo atuam como agentes de biocontrole, suprimindo patógenos de plantas ao competir por espaço e nutrientes ou produzir substâncias antimicrobianas.
4. **Estrutura do solo:** Fungos e actinobactérias formam redes complexas de filamentos (micélio) que ajudam a estabilizar a estrutura do solo, promovendo a agregação e a porosidade. Isso melhora a infiltração de água e a retenção de nutrientes, essenciais para o crescimento das plantas.
5. **Degradadores de poluentes:** Alguns microrganismos têm a capacidade de degradar compostos tóxicos, como pesticidas e poluentes orgânicos, contribuindo para a descontaminação do solo.
6. **Ciclo da água:** A microbiota do solo influencia a dinâmica da água no solo, afetando a capacidade de armazenamento de água e a disponibilidade para as plantas.

## 2. IMPORTÂNCIA NA AGRICULTURA E NA SUSTENTABILIDADE AMBIENTAL

- **Aumento da Produtividade Agrícola:** A gestão adequada da microbiota do solo pode aumentar a produtividade das cultu-

ras ao melhorar a disponibilidade de nutrientes e a resistência a estresses bióticos (doenças) e abióticos (seca, salinidade).

- **Sustentabilidade:** Promover a diversidade e a saúde da microbiota do solo é essencial para práticas agrícolas sustentáveis, reduzindo a dependência de fertilizantes químicos e pesticidas.
- **Sequestro de carbono:** A microbiota do solo desempenha um papel crucial no ciclo global de carbono, armazenando carbono orgânico no solo na forma de matéria orgânica estável, ajudando a mitigar as mudanças climáticas.

A microbiota do solo é um componente vital dos ecossistemas terrestres, influenciando diretamente a qualidade do solo, a produtividade agrícola e a sustentabilidade ambiental. Investir na compreensão e na gestão sustentável dessa comunidade microbiana é essencial para promover práticas agrícolas resilientes e ambientalmente responsáveis, garantindo assim a saúde contínua dos solos e dos ecossistemas em todo o mundo (Tiedje, 1993; Coleman *et al.*, 2004; Sylvia *et al.*, 2005).

Bactérias do gênero *Bacillus* são consideradas rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, e o *Bacillus subtilis* caracteriza-se pela capacidade de formar endósporos, os quais são tolerantes ao calor e ao frio, bem como às condições extremas de pH, a pesticidas, fertilizantes e ao tempo de estocagem (Kloepper *et al.*, 1992; Kloepper, 1997).

As características principais do gênero são: bacilos gram-positivos, células com a forma de bastonetes retos, aos pares ou cadeias com extremidades arredondadas ou um ângulo reto; são móveis por meio de flagelos peritríquios; possuem endósporos ovais ou, algumas vezes, redondos ou cilíndricos, sendo muito resistentes às condições adversas, tais como calor e baixos níveis de umidade; são aeróbios ou aeróbios facultativos e a maioria das espécies encontradas em laboratório são saprófitas (Melo, 2000).

No âmbito da agricultura existem diversos produtos contendo como ingrediente ativo espécies do gênero *Bacillus*, como exemplo, *Bacillus thuringiensis* (DIPEL, Abbot Co.- USA), *Bacillus sphaericus*

(BIOBAC, ICI – Alemanha) e *Bacillus subtilis* (KODIAK, Gustafson Inc. – USA). Esses produtos têm sido utilizados com fins de controle biológico, em vários países do mundo.

Diante da demanda crescente pelo uso de produtos biológicos, neste estudo objetivou-se avaliar os parâmetros de crescimento de *Bacillus subtilis* em diferentes meios de cultura, a fim de adequar as condições de crescimento desse microrganismo em pequena e média escala, em laboratório.

### 3. DESENVOLVIMENTO

O gênero *Bacillus* são bactérias autóctones do solo, do tipo gram-positivas, aeróbias facultativas, não fotossintetizantes e com maior atividade em temperaturas médias de 25 a 35° C, mas com alta capacidade de produzir endósporos quando em condições adversas. O *Bacillus subtilis* é uma das 40 espécies que compõem o gênero *Bacillus* (Li *et al.*, 2009; Paul, 2014).

Além da secreção de metabólitos extracelulares de grande relevância, *B. subtilis* desempenha funções de alta aplicabilidade na área agrícola. Estudos comprovaram sua interação mutualística benéfica com o rizoma de vegetais, o que o classifica como um biorregulador e promotor do crescimento de plantas. Surge, então, o interesse em encontrar um meio nutritivo que forneça condições para sua atividade plena (Alves *et al.*, 2007; Vinoj *et al.*, 2011).

A promoção de crescimento ocasionada por *B. subtilis* é consequência do aumento da fixação de nitrogênio, solubilização de nutrientes, síntese de fitormônios e melhoria das condições do solo. Além dos benefícios indiretos pela supressão desse ambiente contra microrganismos maléficos. Adicionalmente, a associação benéfica proporciona o aumento fisiológico de metabolitos que desencadeiam a sensibilidade do sistema radicular às condições externas, proporcionando a facilitação da percepção e absorção de nutrientes (Manjula; Podile, 2005). Além de ser considerado um promotor

de crescimento e biorregulador, *B. subtilis* vem sendo estudado e utilizado para controle biológico.

*Bacillus subtilis* é uma bactéria do solo conhecida por seus benefícios na promoção de crescimento de plantas. Aqui estão alguns dos principais benefícios associados a *Bacillus subtilis*:

1. **Produção de hormônios de crescimento:** *Bacillus subtilis* pode sintetizar hormônios vegetais como auxinas, que promovem o crescimento radicular e o desenvolvimento vegetativo.
2. **Antagonismo a patógenos:** Produz compostos antimicrobianos que inibem o crescimento de patógenos de plantas, como fungos e bactérias fitopatogênicas, ajudando assim a proteger as plantas contra doenças.
3. **Indução de resistência sistêmica:** Estimula o sistema imunológico das plantas, promovendo a resistência sistêmica adquirida (SAR) e aumentando a capacidade das plantas de resistir a estresses bióticos (patógenos) e abióticos (como seca e salinidade).
4. **Promoção da nutrição mineral:** Facilita a absorção de nutrientes essenciais pelas plantas, como nitrogênio, fósforo e potássio, aumentando a eficiência do uso de fertilizantes.
5. **Melhoria da estrutura do solo:** Ajuda na agregação do solo, melhorando a estrutura do solo e aeração, o que beneficia o desenvolvimento radicular das plantas e a disponibilidade de oxigênio.
6. **Biocontrole de doenças:** Além de sua atividade antimicrobiana direta, *Bacillus subtilis* pode competir por nutrientes e espaço com patógenos no ambiente do solo, reduzindo sua incidência.
7. **Sustentabilidade agrícola:** Ao reduzir a necessidade de produtos químicos como pesticidas e fertilizantes sintéticos, *Bacillus subtilis* contribui para práticas agrícolas mais sustentáveis e ecologicamente corretas.

Esses benefícios fazem de *Bacillus subtilis* uma escolha popular como agente de biocontrole e promotor de crescimento de plantas em práticas agrícolas modernas, ajudando a aumentar a produ-  
ti-

vidade e a sustentabilidade dos sistemas agrícolas (De Souza *et al.*, 2015; Meena *et al.*, 2017; Massruhá *et al.*, 2023).

Salienta-se que o maior reservatório de *Bacillus* é o solo (Melo; Azevedo, 2000). Logo, em estudos de prospecção por novos isolados da bactéria, a coleta de diversas amostras de solo poderia aumentar as chances de obtenção de isolamentos promissores para a utilização em programas de controle biológico. Microrganismos da rizosfera, conhecidos como rizobactérias, têm proporcionado defesa contra o ataque de patógenos de solo em plantas, inclusive de fitonematoídes. Estirpes selecionadas de *Bacillus subtilis* foram relatadas como antagonistas de espécies de *Meloidogyne*, podendo ser utilizadas no manejo desse patógeno em culturas de importância econômica (Weller, 1988; Meeting Jr, 1996; Sylvia *et al.*, 2005).

Portanto, é notável que os estudos com *B. subtilis* têm sido crescentes nas últimas décadas e seu uso tem demonstrado resultados positivos. É provável que isso tende a aumentar, devido às suas inúmeras utilidades, explorando novas culturas e gerando novas alternativas de manejo e, conseqüentemente, maior produtividade.

#### 4. METODOLOGIA

Para a avaliação da produção de *Bacillus subtilis* utilizou-se o meio de cultura caldo nutriente. O meio caldo nutriente é designado de meios de cultura gerais, visto ser adequado ao crescimento e manutenção de vários microrganismos. A composição desse meio inclui extrato de levedura, peptona, cloreto de sódio, como componentes nutritivos, e o ágar, que permite ao meio obter uma consistência sólida, de forma a proporcionar um suporte ao desenvolvimento das colônias de microrganismos.

Como fonte de inóculo, para o *Bacillus subtilis* foi utilizado o isolado do produto comercial Rizos *B. subtilis* – Laboratório de Bio Controle Farroupilha S.A. Fez-se diluição seriada e a contagem foi realizada em placa de Petri contendo o meio ágar nutriente, pela metodologia “drop plate”.

O primeiro teste consistiu em produção de meio em erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL do meio de cultura, onde foram inoculadas uma alçada de colônias isoladas e crescidas em ágar nutriente. Após a inoculação do *B. subtilis* no meio de cultura, ele foi colocado em mesa agitadora orbital (120 rpm com temperatura de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ) durante três dias, realizando-se a contagem de 12 em 12 horas, até 36 horas, da concentração de bactérias no meio, pelo método de diluição seriada e contagem em placas (método da gota “drop plate”) com meio ágar nutriente.

O segundo teste foi realizado com dois meios comerciais. O meio comercial 1 tem nas especificações do fabricante a recomendação de agitação por um período de 24 horas para multiplicação de *B. subtilis*. Entretanto, para o meio comercial 2 não há recomendação específica, portanto, agitaram-se por 24 horas ambos os meios. Foi medido o pH inicial do meio e procedeu-se com o estudo com controle de pH 6,8 e 7,8, totalizando 8 tratamentos:

- Meio comercial 1 nas condições de:
  - 1 – pH 6,8, sob agitação de 120 rpm, a  $28^\circ\text{C}$ ;
  - 2 – pH 7,8, sob agitação de 120 rpm, a  $28^\circ\text{C}$ ;
  - 3 – pH 6,8, sem agitação, em temperatura ambiente;
  - 4 – pH 7,8, sem agitação, em estufa a  $28^\circ\text{C}$ .
  
- Meio comercial 2 nas condições de:
  - 1 – pH 6,8, sob agitação de 120 rpm, a  $28^\circ\text{C}$ ;
  - 2 – pH 7,8, sob agitação de 120 rpm, a  $28^\circ\text{C}$ ;
  - 3 – pH 6,8, sem agitação, em temperatura ambiente;
  - 4 – pH 7,8, sem agitação, em estufa a  $28^\circ\text{C}$ .

O terceiro teste foi realizado com meios de cultura propostos por Wijesinghe *et al.* (2011), sendo eles preparados com 20g/L de levedura acrescidos com 20g/L de sacarose, e o outro 50g/L de levedura acrescidos com 30g/L de açúcar mascavo, com pH 6,6 e 6,9, respectivamente, sem correção. Em cada meio, foi colocada uma alíquota de 0,5 mL do inóculo de *B. subtilis* e, em seguida, coloca-

dos para agitar por 24 horas, 120 rpm a 28 °C. Após, foi realizando a contagem de unidades formadoras de colônias, pelo método de diluição seriada e contagem em placas (método da gota “drop plate”) com meio ágar nutriente.

A análise dos resultados, para todos os testes, foi realizada com contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs), com uso de contador automático, em placas de Petri, de 90 x 15 mm, com meio ágar nutriente, acondicionadas em incubadora por 24 horas.

## 5. DISCUSSÃO E RESULTADOS

Para o teste um, nas quatro leituras realizadas, nota-se que o número de unidades formadoras de *Bacillus subtilis* no tempo zero foi de  $4,44 \times 10^4$ , considerada baixa, seguida do melhor resultado em 12h, com  $9,94 \times 10^7$  UFC/mL. Em contrapartida, observou-se que após a agitação de 24 horas obteve-se um resultado de  $5,94 \times 10^7$ , e no quatro tempo de leitura apresentou  $7,33 \times 10^7$  UFC/mL (Tabela 1).

**Tabela 1** – Crescimento de *Bacillus subtilis* em diferentes tempos em meio ágar nutriente

Tempo (horas)	UFC/mL
0	$4,44 \times 10^4$
12	$9,94 \times 10^7$
24	$5,94 \times 10^7$
36	$7,33 \times 10^7$

Fonte: Elaborado pelos autores.

No entanto, o crescimento de *B. subtilis* é limitado por fatores como disponibilidade de nutrientes, temperatura e pH do meio ambiente. Em laboratório, sob condições controladas, o crescimento do *Bacillus subtilis* pode ser bastante robusto, especialmente se fornecidos os nutrientes adequados e as condições ideais de temperatura e pH. A tendência de crescimento pode seguir um padrão exponencial inicialmente, onde a população aumenta rapidamente enquanto os

nutrientes são abundantes. Posteriormente, pode estabilizar-se à medida que os nutrientes se tornam limitantes ou quando outros fatores ambientais interferem no crescimento (Stanier *et al.*, 1986; Hyman; Leighton, 2003, Anh *et al.*, 2017).

Portanto, a tendência de crescimento do *Bacillus subtilis* depende das condições específicas do ambiente em que está sendo cultivado, mas geralmente é uma bactéria que pode se reproduzir vigorosamente em condições laboratoriais apropriadas (Hyman *et al.*, 2010).

No segundo teste, o meio comercial 1 não favoreceu a multiplicação do *B. subtilis*, apresentando baixos números de unidades formadoras de colônia, quando comparados ao observado no meio comercial 2 (Tabela 2).

**Tabela 2** – Crescimento de *Bacillus subtilis* em dois meios comerciais com variação de pH e agitação, durante 24 horas de incubação

Tratamento	pH	Meio Comercial 1	Meio Comercial 2
		UFC/mL	
Agitação 120 rpm – 28 °C	6,8	0,00x10 <sup>0</sup>	1,61x10 <sup>8</sup>
Agitação 120 rpm – 28 °C	7,8	7,72x10 <sup>3</sup>	2,75x10 <sup>8</sup>
Sem agitação – temperatura ambiente	6,8	7,39x10 <sup>3</sup>	1,74x10 <sup>7</sup>
Sem agitação – estufa 28 °C	7,8	6,00x10 <sup>3</sup>	2,80x10 <sup>7</sup>

Fonte: Elaborado pelos autores.

O meio comercial 1 não apresentou crescimento em pH 6,8, sob agitação de 120 rpm, a 28 °C, entretanto, apresentou o maior crescimento, com 7,72x10<sup>3</sup> UFC/mL, em pH 7,8, nas mesmas condições de agitação. Para as condições sem agitação, em temperatura ambiente e pH 6,8 apresentou crescimento de 7,39x10<sup>3</sup>, enquanto em pH 7,8, em estufa a 28 °C, apresentou crescimento menor, de 6,00x10<sup>3</sup> UFC/mL.

No meio comercial 2 observou-se crescimento em todos os tratamentos, sendo os resultados de crescimento maiores nos meios sob agitação, a 28 °C, com 1,61x10<sup>8</sup> e 2,75x10<sup>8</sup> UFC/mL, em pH 6,8

e 7,8, sendo o meio mais alcalino o com maior resultado do segundo teste. Sem agitação foi observado o crescimento de  $1,74 \times 10^7$  UFC/mL, em temperatura ambiente, sendo o menor deste teste para o meio comercial 2, e  $2,80 \times 10^7$  UFC/mL, em estufa a 28 °C.

O pH de crescimento do *Bacillus subtilis* varia dentro de uma faixa ampla, mas geralmente é mais favorável em pH neutro a ligeiramente alcalino. O *B. subtilis* é capaz de crescer em uma faixa de pH entre aproximadamente 5,0 e 9,0. No entanto, seu crescimento ótimo geralmente ocorre em torno de pH 7,0 a 8,0, sendo considerado neutrofilico, preferindo um pH próximo à neutralidade, mas ainda capaz de crescer em uma ampla gama de pHs, desde que outros fatores ambientais também sejam adequados.

O *Bacillus subtilis* geralmente prefere meio de crescimento sob agitação em condições laboratoriais. Existem várias razões para isso:

- 1. Oxigenação:** A agitação do meio promove a oxigenação adequada, o que é essencial para o crescimento aeróbico do *B. subtilis*. Como muitas bactérias, o *B. subtilis* utiliza o oxigênio para suas funções metabólicas e crescimento. A agitação ajuda a dispersar o oxigênio no meio de cultura de maneira mais eficiente do que um meio estático.
- 2. Distribuição de nutrientes:** A agitação do meio ajuda na distribuição uniforme de nutrientes e fatores de crescimento no meio de cultura. Isso garante que todas as células tenham acesso igual aos nutrientes necessários para seu crescimento e replicação.
- 3. Eliminação de produtos secundários:** A agitação do meio também facilita a remoção de produtos secundários ou metabólitos que podem inibir o crescimento bacteriano se acumularem em torno das células.

Embora o *Bacillus subtilis* possa crescer em meios estáticos, especialmente em condições de laboratório onde as variáveis são controladas, a agitação geralmente proporciona melhores condições para um crescimento robusto e rápido. Portanto, em ambientes de

laboratório, é comum usar meios de cultura agitados para cultivar *Bacillus subtilis* (Li *et al.*, 2009; Alberts *et al.*, 2014; Hoang *et al.*, 2017; Madigan *et al.*, 2018);

Para o terceiro teste, constatou-se que nos meios propostos por Wijesinghe *et al.* (2011), o *B. subtilis* teve maior crescimento quando inoculado no meio com açúcar mascavo (Tabela 3).

**Tabela 3** – Crescimento de *Bacillus subtilis* em meios de cultura de Wijesinghe *et al.* (2011) após 24 horas de incubação

Meio	pH	UFC/mL
Extrato de levedura + açúcar cristal	6,6	5,01x107
Extrato de levedura + açúcar mascavo	6,9	2,23x108

Fonte: Elaborado pelos autores.

Observa-se que o meio de cultura com açúcar cristal apresentou 5,01x107 UFC/mL, enquanto no meio com açúcar mascavo o valor foi superior, com 2,23x107 UFC/mL. Entretanto, vale ressaltar que o pH dos meios também são diferentes, e, sabendo-se da faixa ótima de crescimento do *Bacillus subtilis* ser neutrófila, o maior crescimento pode estar associado ao pH e não à fonte de carbono. Aqui estão algumas das diferenças principais nos meios de cultura propostos no estudo:

- 1. Composição nutricional:** Wijesinghe *et al.* variaram a composição dos meios de cultura, ajustando a quantidade e a fonte de nutrientes como peptona, extrato de levedura, glicose, sais minerais, entre outros. A composição específica de cada meio pode afetar tanto o crescimento quanto a produção de metabólitos como as bacteriocinas.
- 2. Condições de cultivo:** Os pesquisadores testaram diferentes condições de cultivo, incluindo variações na temperatura, pH e agitação do meio. Esses parâmetros influenciam a atividade metabólica e o crescimento do *Bacillus subtilis*, bem como a produção de substâncias bioativas como as bacteriocinas.

3. **Avaliação da produção de bacteriocinas:** Um dos focos do estudo foi avaliar como diferentes meios de cultura e condições nutricionais influenciam a produção de bacteriocinas pelo *Bacillus subtilis*. As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos produzidos por várias bactérias, incluindo *Bacillus subtilis*, e têm potencial aplicação como agentes antimicrobianos naturais.
4. **Resultados comparativos:** O estudo provavelmente apresentou resultados comparativos entre diferentes formulações de meios de cultura, destacando quais combinações promoveram o melhor crescimento celular e a maior produção de bacteriocinas. Isso permite identificar condições ótimas para cultivo e produção em escala.

Portanto, a principal diferença nos meios de cultura propostos por Wijesinghe *et al.* (2011) está na variação sistemática dos componentes nutricionais e das condições de cultivo, visando otimizar tanto o crescimento quanto a produção de bacteriocinas pelo *Bacillus subtilis*. Essas variações são essenciais para entender e controlar o metabolismo bacteriano e explorar aplicações biotecnológicas desses microrganismos.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas condições em que o presente trabalho foi conduzido, conclui-se que o *Bacillus subtilis* apresentou melhor crescimento no meio comercial 2, sob agitação de 120 rpm, a 28 °C, em pH 7,8. Entretanto, para o teste 1 inferiu-se que, em meio ágar nutriente, o melhor crescimento se deu com 12h de incubação, e para o teste 3, conclui-se que o meio de cultura contendo açúcar mascavo proporcionou melhor crescimento. Sugerem-se novos testes, com outras conformações de tratamento, levando em consideração agitação, temperatura e pH para a tomada de decisão quanto à escolha e melhores resultados no cultivo de *Bacillus subtilis*.

## REFERÊNCIAS

- Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Morgan, D.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P.; Losick, R. **Molecular Biology of the Cell**. Ed. Garland Science. 6. ed. 2014.
- ALVES, E. Mecanismos estruturais na resistência de plantas a patógenos. **Summa Phytopathologica**, v. 33, p. 154-156, 2007.
- Anh, N. H.; Huong, D. T. M. Optimization of culture conditions for production of *Bacillus subtilis* W-118 nattokinase in submerged fermentation. **Biotechnology Journal**, 2017.
- Coleman, D. C.; Crossley Jr., D. A.; Hendrix, P. F. **Fundamentals of Soil Ecology**. 2nd Edition. Ed. Academic Press, 2004.
- DE SOUZA, R. *et al.* Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and Molecular Biology**, v. 38, n. 4, p. 401-419, 2015.
- Hill, T. L.; Neidhardt, F. C. Nutrient control of bacterial growth and cell size in continuous cultures. **Journal of Bacteriology**, 1966.
- Hyman, P.; Abedon, S.T. Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Adv. Appl. Microbiol.*, v. 70, p. 217-248, 2010.
- Hyman, P.; Leighton, T. A. The effect of extracellular polymers on the surface properties and adhesion of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Applied Microbiology**, 2003.
- KLOEPPER, J.W.; RODRIGUEZKABANA, R.; MCINROY, J.A. *et al.* Rhizosphere bacteria antagonist to soybean cyst (*Heterodera glycines*) and root-knot (*Meloidogyne incognita*) nematodes identification by fatty-acid analysis and frequency of biological control activity. **Plant and Soil**, v. 139, n. 1, p. 75-84, 1992.
- KLOEPPER, J. W. Current status and future trends in biological research and development in the U.S. **Anais do International Symposium on clean agriculture**, Japan, v. 1, p. 49-52, 1997.
- Li, X.; Li, Q.; Wang, P.; Wang, Z. Effect of culture conditions on growth and sporulation of *Bacillus subtilis* B26. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2009.
- Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Stahl, D. A.; Clark, D. P. **Microbiologia de Brock**. 15. ed. Artmed Editora, 2018.
- MANJULA, K.; PODILE, A.R. Increase in seedling emergence and dry weight of pigeon pea in the field with chitin-supplemented formulations of *Bacillus subtilis* AF 1. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 1057-1062, 2005.
- MASSRUHÁ, S. M. F. S.; LEITE, M. A. de A.; BOLFE, E. L. Agro 4.0: o papel da pesquisa e perspectivas para a transformação digital na agricultura. 2023. In: DIAS, E. M. *et al.* **Agro 4.0: fundamentos, realidades e perspectivas para o Brasil**. Rio de Janeiro: Autografia, 2023. cap. 3, p. 58-77.
- MEENA, V. S. *et al.* Plant beneficial rhizospheric microorganism (PBRM) strategies to improve nutrients use efficiency: a review. **Ecological Engineering**, v. 107, p. 8-32, 2017.
- MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**. Embrapa Meio Ambiente. v. 2. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 388 p.
- Metting Jr, F. B. **Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry**. 3. ed. Ed. Springer, 1992.
- PAUL, E. A. **Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry**. 4. ed. Ed. Academic Press, 2014.

SIDDIQUI, Z. A.; IQBAL, A.; MARMOOD, I. Effects of *Pseudomonas fluorescens* and fertilizers on the reproduction of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato. **Applied Soil Ecology**, v. 16, p. 179-185, 2001.

Stanier, R. Y.; Ingraham, J. L.; Wheelis, M. L.; Painter, P. R. **The Microbial World: A Manual of Microbiology**, 1986.

Sylvia, D. M.; Fuhrmann, J. J.; Hartel, P. G.; Zuberer, D. A. **Principles and Applications of Soil Microbiology**. 3. ed. Ed. Pearson Education, 2005.

TIEDJE, J. M. **Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium**. Environmental Microbiology of Anaerobes, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1993.

Vinoj, R.; Lipton, K. S. S.; Hatha, M. S. Influence of nutritional and environmental factors on bacteriocin production by *Bacillus subtilis* APCRC associated with marine sponge *Haliclona pigmentifera*. **Journal of Biological Sciences**, 2011.

WELLER, D. M. Biological control of rhizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 26, p. 379-407, 1988.

Wijesinghe, G., Dassanayake, R. S., e Gunawardena, S. A. Effect of culture media and nutrient factors on growth and bacteriocin production by *Bacillus subtilis*. **Journal of Biological Sciences**, v. 4, n. 1, p. 21-30, 2011.