

Encapsulamento e perfil de liberação de *Bacillus* sp. visando o desenvolvimento de inoculantes microbianos de liberação controlada

Encapsulation and release profile of *Bacillus* sp. aiming at the development of controlled release microbial inoculants

Rafaely Dalgalo Zorek¹, Patricia Dayane Carvalho Schaker²

RESUMO

Sendo o Brasil um dos grandes produtores de alimentos do mundo, também é responsável por 7% do consumo global de fertilizantes. Uma alternativa viável para diminuição da demanda de fertilizantes químicos é a utilização de inoculantes, produtos contendo microrganismos que auxiliam no crescimento e desenvolvimento de plantas. Uma classe de microrganismos que vem sendo estudada para utilização em inoculantes são as bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP). O seu encapsulamento pode promover a proteção contra fatores externos, ação controlada, adaptação e maior taxa de sobrevivência dos microrganismos. O presente trabalho teve como objetivo a produção de biocápsulas da linhagem de *Bacillus* sp. LB30 e análise da sua taxa de liberação em meio aquoso e no solo, por meio da contagem de UFC/mL. Para produção das cápsulas utilizou-se a técnica de extrusão com solução de alginato de sódio 1% e cloreto de cálcio 0,1M. Obteve-se resultados satisfatórios e uma taxa de liberação das biocápsulas lenta e constante ao longo do período avaliado. Com a continuidade da pesquisa espera-se o aprimoramento da composição da cápsula, e a possível viabilização da técnica como uma estratégia de inovação para o setor de inoculantes.

PALAVRAS-CHAVE: Alginato; biocápsulas; bioinsumos; BPCPs; liberação lenta.

ABSTRACT

As Brazil is one of the largest food producers in the world, it is also responsible for 7% of global fertilizer consumption. A viable alternative to reducing the demand for chemical fertilizers is the use of inoculants, products containing microorganisms that help in the growth and development of plants. A class of microorganisms that has been studied for use in inoculants are plant growth promoting bacteria (PGPB). Its encapsulation can promote protection against external factors, controlled action, adaptation and a higher survival rate of microorganisms. The present work aimed to produce biocapsules from the *Bacillus* sp. LB30 strain and analyze their release rate in aqueous media and soil, by counting CFU/mL. To produce the capsules, the extrusion technique was used with a 1% sodium alginate solution and 0.1M calcium chloride. Satisfactory results and a slow and constant release rate of biocapsules were obtained throughout the evaluated period. With continued research, it is expected to improve the composition of the capsule, and the possible feasibility of the technique as an innovation strategy for the inoculants sector.

KEYWORDS: Alginate, Biocapsules, Bioinputs, PGPBs, Slow release

INTRODUÇÃO

Sabe-se que o Brasil é um dos grandes produtores de alimentos do mundo, e por consequência é responsável por 7% do consumo global de fertilizantes. Os mesmos podem ser minerais ou orgânicos e fornecem nutrientes essenciais para o crescimento de

¹ Voluntária do CNPq. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil. E-mail: rafaelydalgalo@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 1704619787035721

² Docente no Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil. E-mail: patriciaschaker@utfpr.edu.br. ID Lattes: 9674682418436293.

plantas, suprimindo a carência que possa existir no solo e aumentando a disponibilidade de elementos necessários para seu desenvolvimento (MACIEL; TUNES, 2021).

No entanto, a alta demanda de fertilizantes faz com que o Brasil seja um grande dependente da produção externa. As indústrias brasileiras não têm capacidade de produzir o montante necessário, devido a falta de disponibilidade e alto custo da matéria-prima utilizada nos fertilizantes minerais (ALMEIDA, 2022). Uma alternativa viável para diminuição da demanda de fertilizantes é a utilização de inoculantes. Define-se inoculante como um produto que contém microrganismos que auxiliam no crescimento e desenvolvimento de plantas (SANTOS, HANNA, 2017).

Uma classe de microrganismos que vem sendo estudada para utilização em inoculantes e outros produtos com interesse agrícola são as bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP). As BPCPs habitam a rizosfera e podem atuar de modo direto ou indireto no auxílio no crescimento saudável, controle de microrganismos patogênicos e aumentando a disponibilidade e absorção de nutrientes. Dentro dos mecanismos diretos estão a produção de auxina, ACC desaminase, citocinina, giberelina, fixação de nitrogênio, solubilização de fósforo e sequestro de ferro por sideróforos bacterianos. Os mecanismos indiretos referem-se a características bacterianas que inibem o funcionamento de um ou mais organismos fitopatogênicos (OLANREWAJU, 2017).

Normalmente as BPCPs são encontradas em inoculantes líquidos ou sólidos, nestes os microrganismos estão presentes na turfa, a qual mantém a umidade e não é tóxica. Porém através desse método encontra-se certa dificuldade para manter a eficácia das bactérias, já que as mesmas não se estabelecem na rizosfera em quantidade adequada para proporcionar os resultados encontrados em condições laboratoriais (NASCIMENTO, 2016).

Sendo assim, uma alternativa viável para utilização da BPCPs é o encapsulamento. O processo consiste no aprisionamento de microrganismos vivos numa matriz polimérica mantendo a sua viabilidade (BASHAN *et al.*, 2014). A técnica se mostra vantajosa devido a otimização da eficácia dos microrganismos no solo advinda da sua proteção de estresses sofridos pelo ambiente externo. Além disso, a liberação lenta e gradual do conteúdo da cápsula possibilita ação controlada, adaptação e maior taxa de sobrevivência das bactérias (NASCIMENTO, 2016).

O presente trabalho teve como objetivo principal realizar o encapsulamento de *Bacillus sp.* em uma matriz de alginato de sódio e avaliar o perfil de liberação das células em meio aquoso e no solo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Inicialmente realizou-se o esgotamento da linhagem de BPCP *Bacillus sp.* LB30, previamente isolada da rizosfera de *Bixa orellana*, e caracterizada quanto ao seu potencial de promoção do crescimento vegetal. A partir de uma colônia única obteve-se o pré-inóculo em 10 mL de caldo Luria Bertani (LB), mantendo sob agitação de 150 rpm, a 35°C por 16 horas. Em seguida foi preparado o inóculo com a adição de mais 100 mL de caldo LB no pré-inóculo preparado, e incubação de mais 24 horas nas mesmas condições.

Para produção das cápsulas se utilizou a metodologia adaptada de Nascimento (2016). Inicialmente, 25 mL de inóculo foi centrifugado por 10 minutos a 1800 rpm e o

sobrenadante foi descartado. O pellet de células foi ressuspensionado em 25 mL de solução de alginato de sódio 1%, previamente esterilizada. Com auxílio de uma seringa realizou-se a técnica de extrusão com o volume de 2,5 mL sobre solução de cloreto de cálcio 0,1M, previamente esterilizado, sob agitação constante.

Após a formação das cápsulas, as mesmas foram mantidas na solução de cloreto de cálcio por 5 minutos ainda com agitação constante. Em seguida, o cloreto de sódio foi removido e as cápsulas acondicionadas em uma placa contendo papel filtro, previamente autoclavados, para retirar o excesso da solução de complexação. As cápsulas foram contadas e tiveram seu diâmetro medido com ajuda de um paquímetro.

Para avaliar o perfil de liberação de células foram utilizadas duas condições: solução salina 0,9% ou solo. Na primeira condição, as cápsulas foram transferidas para um tubo contendo 25 mL de solução salina 0,9%. A cada 24 horas, por 10 dias, foi realizada a técnica de diluição seriada, retirando-se 100 µL de solução salina na qual as cápsulas estavam presentes e diluindo-a em 900µL de solução salina estéril, o processo foi realizado até a diluição de 10^{-4} . Então 10µL de cada diluição foram plaqueados no formato de duas gotas em placas de Petri contendo meio LB. As placas foram mantidas em estufa incubadora a 35°C por 14 horas para posterior contagem de UFC/mL.

Para avaliar o perfil de liberação de células das cápsulas no solo, inicialmente foi pesado 5 g de solo em 20 tubos falcon, que foram levados a esterilização. Em 10 tubos contendo solo estéril foi adicionado 0,5 mL do inóculo de *Bacillus* sp. LB30 não encapsulado.

A partir do método de extrusão com alginato de sódio 1% e cloreto de cálcio 0,1M já citado as cápsulas foram produzidas utilizando 0,5 mL de inóculo, e essas foram depositadas em um dos tubos falcon contendo 5 g de solo estéril. O processo se repetiu 10 vezes a fim de preencher os tubos já preparados.

Após 48h da acomodação das cápsulas ou do inóculo nos tubos com solo, foi adicionado 50 mL de solução salina estéril em um dos tubos contendo as cápsulas e outro contendo inóculo. Realizou-se a diluição seriada para contagem de UFC/mL, utilizando a metodologia descrita acima. O processo foi repetido a cada 48h até o 5° tubo de solo, e posteriormente a cada 96 horas.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A obtenção das biocápsulas ocorreu de maneira satisfatória sendo as mesmas demonstradas na Figura 1, seu diâmetro foi em média 3,9 mm.

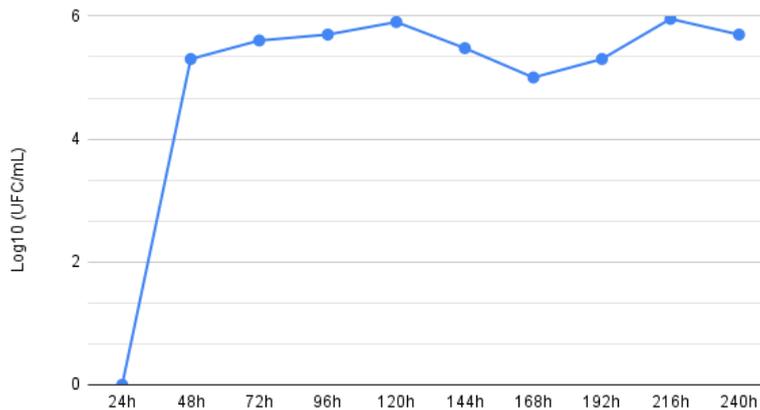
Figura 1- Biocápsulas produzidas em matriz de alginato contendo células viáveis da bactéria promotora de crescimento *Bacillus* sp. LB30



Fonte: Elaborado pelas autoras (2023).

Em relação a liberação de células das biocápsulas em solução salina, a partir de 48h obteve-se 2×10^5 UFC/mL. O valor de liberação se mostrou constante e ao longo do tempo de análise (Gráfico 1).

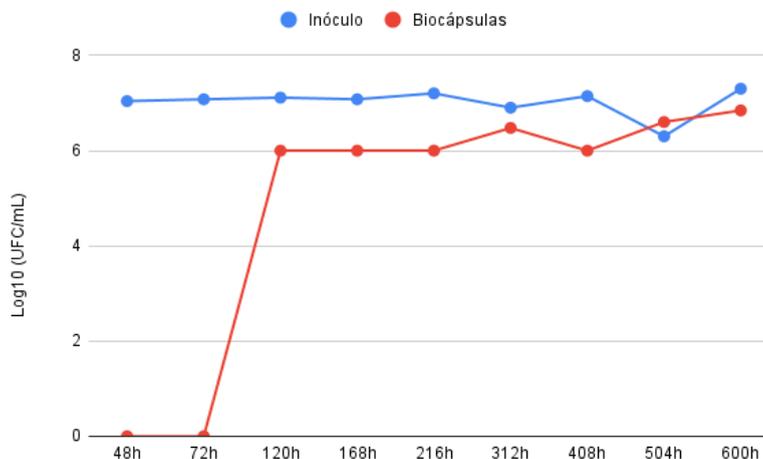
Gráfico 1-Perfil de liberação das células de *Bacillus sp.* LB30 encapsuladas em matriz de alginato em solução salina



Fonte: Elaborado pelas autoras (2023).

Na análise da liberação de células no solo (Gráfico 2), observou-se que a amostra contendo células livres apresentou uma contagem expressiva desde a primeira análise, que se manteve constante ao longo dos dias. A amostra de solo contendo células encapsuladas deu início à liberação somente após 120 horas, permanecendo constante ao longo do tempo. O número de células liberadas no solo foi superior à contagem em solução salina, indicando um ambiente mais propício para o desenvolvimento microbiano. A contagem de células encapsuladas ou livres foi similar no final do período de análise, portanto, espera-se que em períodos maiores de tempo a contagem de células viáveis seja maior na amostra encapsulada devido à lenta liberação dos microrganismos.

Gráfico 2- Perfil de liberação de células no solo de *Bacillus sp.* LB30 encapsulados em comparação com células não encapsuladas em matriz de alginato



Fonte: Elaborado pelas autoras (2023).

De acordo com Qiu *et al.*, (2019), a aplicação de inoculantes microbianos no contexto agrícola tem gerado resultados inconsistentes ou moderados, com queda na população e atividade de inoculantes após a introdução no solo. O êxito na aplicação desses microrganismos está intrinsecamente ligado ao potencial dos mesmos para lidar com condições de solo desfavoráveis ou instáveis, competir com sucesso com os microrganismos já presentes no solo, superar as preferências de seleção de plantas, e ser capaz de se estabelecer, proliferar e permanecer ativo.

Diante disso, destaca-se a relevância de uma liberação lenta e controlada de microrganismos no solo e conseqüentemente do encapsulamento. Resultando em uma possível adaptação dos mesmos, proteção, e aumento de sua vida útil (VEJAN *et al.*, 2016).

Para perspectivas futuras em relação a pesquisa, pretende-se avaliar a liberação das biocápsulas na presença de plantas, analisando o comportamento das bactérias liberadas em relação a sua adaptabilidade e sobrevivência. Aumentar o tempo de análise e a concentração de células nas cápsulas se torna essencial para observar a viabilidade das cápsulas, e com isso, testes para aumento da sua validade e aplicabilidade no setor agrícola, como utilização da liofilização, são uma alternativa. Por fim, também é de interesse testar novas composições das cápsulas a fim de favorecer o crescimento e desenvolvimento bacteriano.

CONCLUSÃO

Os resultados da pesquisa e dos testes foram favoráveis, observa-se com os dados obtidos que o perfil de liberação das biocápsulas produzidas é contínuo e gradual, como esperado. Além disso, destaca-se a importância do encapsulamento quando se refere a adaptabilidade e proteção das bactérias em comparação aos inoculantes. Por fim, com a continuidade da pesquisa espera-se o aprimoramento da técnica e dos testes realizados e a possível viabilização da produção como uma estratégia de inovação para o setor de inoculantes.

Agradecimentos

Agradeço a UTFPR pelo apoio financeiro e estrutura física para execução dos experimentos.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, Pauline. **Brasil Tem Apenas 22 Plantas Industriais de Fertilizantes, aponta Sinprifert**. CNN BRASIL. Rio de Janeiro. 11 mar. 2022. Disponível em: <https://www.cnnbrasil.com.br/business/brasil-possui-apenas-22-plantas-industriais-de-fertilizantes-aponta-sinprifert/> . Acesso em: 17 mai. 2022.



BASHAN, Yoav. *et al.* Avanços na tecnologia de inoculantes bacterianos promotores do crescimento de plantas: formulações e perspectivas práticas (1998–2013). **Solo vegetal** 378 , 1–33. 2014.

MACIEL, Leandro Moreira; DE TUNES, Lilian Vanussa Madruga. The importance of fertilizers for agriculture. **Brazilian Journal of Development**, v.7, n.6, p.58647-58658, 2021.

NASCIMENTO, Fernanda Cristina do. **Micro-organismos encapsulados na promoção do crescimento inicial de frutíferas**. (Dissertação de mestrado). Universidade estadual paulista. 2016.

OLANREWAJU, Oluwaseyi Samuel et al. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. **World journal of microbiology & biotechnology** vol. 33,11 197. 6.2017.

SANTOS, Adailson Feitoza; HANNA, Samira Abdallah. Prospecção tecnológica de patentes na produção de bioinoculantes e biofertilizantes. **Cadernos De Prospecção**, 10(2), 300. 2017.

VEJAN, Pravin. *et al.* Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability: A Review. **Molecules** 21, 573. 2016.