

ESTUDOS DE SOBREVIVÊNCIA E INTEGRIDADE DA BACTÉRIA AG15 ENCAPSULADA EM ALGINATO

Arthur Camargos Severino¹

Fernanda Mendes Gomes²

Adrielle Aparecida Paulista Ribeiro³

Iara Rossi Gonçalves⁴

Tais Magalhães Abrantes Pinheiro⁵

Fabício Gomes Menezes Porto⁶

Miriam Maria de Resende⁷

Sistemas de produção sustentável

Resumo

O uso excessivo de fertilizantes químicos na agricultura tem causado impactos negativos no meio ambiente, de modo que os bioinoculantes surgiram como alternativas sustentáveis para promover o crescimento das plantas e reduzir os danos ao solo. Para prolongar a vida útil dos microrganismos, realiza-se a técnica de encapsulamento, uma vez que esse método as protege de fatores bióticos e abióticos que podem comprometer sua sobrevivência. Neste estudo, foi realizado o encapsulamento da bactéria AG15 em alginato. As soluções extrusadas foram preparadas em uma proporção de 2:1: solução de alginato de sódio (3% e 4%) com suspensão bacteriana. As taxas de sobrevivência foram determinadas em oito períodos de armazenamento (0, 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias), e os aspectos morfométricos foram medidos. Os resultados mostraram uma diminuição na quantidade de UFC·g de grânulo⁻¹ ao longo do tempo, contudo os valores encontrados após trinta dias de estocagem foram superiores aos encontrados em produtos comerciais, de 4×10^9 .

Palavras-chave: Promotor de crescimento vegetal; Imobilização de bactérias; Biofertilizantes; *Shelf-life*.

¹Aluno de Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química, arthur.seveviro@ufu.br

²Aluna de Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Biotecnologia, fernanda.merola@ufu.br

³Aluna de Doutorado em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química, adrielle.ribeiro@ufu.br

⁴Aluna de Pós-Doutorado em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química, iararossi@ufu.br

⁵Aluna de Pós-Doutorado em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química, taisabrant@ufu.br

⁶Aluno de Doutorado em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química, fabricio.porto@ufu.br

⁷Prof. Dr.^a. Universidade Federal de Uberlândia – Campus Santa Mônica, Faculdade de Engenharia Química, mresende@ufu.br

INTRODUÇÃO

A busca incessante por alternativas aos adubos químicos na agricultura é de extrema importância para garantir a produtividade agrícola e minimizar os impactos ambientais. Deste modo, os bioinoculantes surgem como uma solução promissora, oferecendo benefícios como: promoção do crescimento das plantas, nutrição aprimorada e melhoria da saúde do solo (Glick, 2020). Esses microrganismos estabelecem relações simbióticas com as plantas, fornecendo nutrientes essenciais e auxiliando na absorção de água e minerais (Florencio *et al.*, 2022).

Apesar do grande potencial dos bioinoculantes, sua aplicação eficaz é frequentemente limitada pela curta vida útil. Fatores como condições ambientais adversas, armazenamento inadequado e lixiviação rápida no solo podem comprometer a viabilidade e a atividade dos microrganismos. O encapsulamento surge, nesse contexto, como uma estratégia promissora para superar esses desafios, protegendo os bioinoculantes e prolongando sua viabilidade comercial (Saber-Riseh *et al.*, 2021).

O alginato de sódio, polímero biodegradável derivado de algas marinhas, destaca-se como um material de encapsulamento ideal para bioinoculantes devido às suas propriedades promissoras, como: biocompatibilidade, biodegradabilidade e capacidade de formar géis. Essas o tornam um material versátil para a proteção e liberação controlada de microrganismos (Zago *et al.*, 2019). A eficácia e a estabilidade dessa técnica ao longo do tempo de armazenamento variam de acordo com o microrganismo encapsulado, e avaliar viabilidade e estabilidade desses é crucial para o desenvolvimento de formulações eficazes e condições de armazenamento otimizadas, contribuindo no avanço da agricultura sustentável, promovendo a utilização de biofertilizantes mais eficientes e ambientalmente responsáveis. Portanto, esta pesquisa teve como objetivo avaliar o *shelf-life* dos bioinoculantes AG15 encapsulados em alginato com o intuito de se desenvolver um meio sólido com viabilidade comercial.

METODOLOGIA

Para o encapsulamento, foi utilizada uma cepa isolada de agave (AG) colhido em Sumé - Paraíba, armazenado no banco de culturas microbiológicas do Núcleo de Processos Biotecnológicos (NUCBIO) da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia. A cepa AG15, caracterizada como um bacilo Gram- negativo, foi escolhida por apresentar capacidade de

fixação de nitrogênio.

Para a obtenção de células de AG15 (Figura 01), o pré-inóculo foi preparado com NaCl (0,9%) em uma concentração de 0,5 g de biomassa seca·L⁻¹. Após 12 horas de incubação (120 rpm, temperatura ambiente), 5 mL do pré-inóculo foi transferido para um erlenmeyer de 500 mL contendo 150 mL de meio de cultivo, e mantido por 24 horas a 120 rpm e 32 °C. O crescimento celular foi quantificado por turbidimetria a 600 nm usando espectrofotômetro UV-VIS. A cultura de células foi centrifugada por 10 minutos à 8.000 rpm. O *pellet* de células foi cuidadosamente lavado com solução de NaCl (0,9%) e ressuspensionado em solução de peptonada (1%) em uma concentração de 34 g de biomassa seca·L⁻¹.

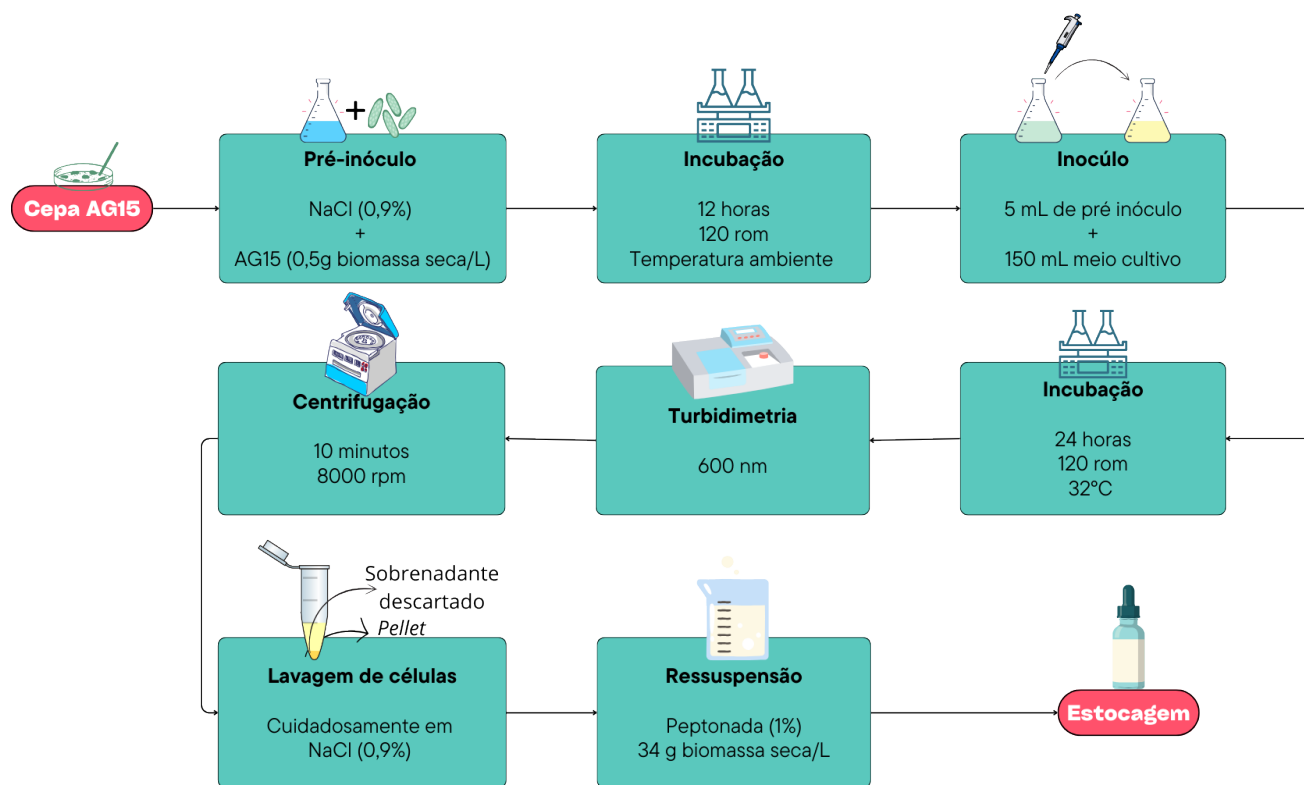


Figura 01: Esquema processo de obtenção de células AG15.

O encapsulamento das células do isolado AG15 foi realizado de acordo com Reetha *et al.* (2014) com modificações (Figura 02). Foram preparadas duas soluções variando a concentração de alginato de sódio (3% e 4%), ambas com a suspensão bacteriana com 34 g de biomassa seca·L⁻¹ na proporção de 2:1. As misturas foram homogeneizadas por 30 minutos e, em seguida, extrusadas por meio de uma bomba peristáltica em placas contendo solução de CaCl₂ (0,1 M). As esferas foram mantidas na solução por 2 horas e depois lavadas com água. As esferas foram incubadas em meio de cultivo por 24 horas a 120 rpm e 32 °C. Em seguida, elas foram lavadas, coletadas e deixadas sob fluxo de ar por 30 minutos.

Alíquotas de, aproximadamente, 5 g de esferas foram embaladas para cada tratamento. A solução de alginato foi extrusada e utilizada como controle. As embalagens contendo as diferentes formulações (controle 3%, alginato 3%; controle 4% e alginato 4%) foram armazenadas a 7 ± 2 °C.

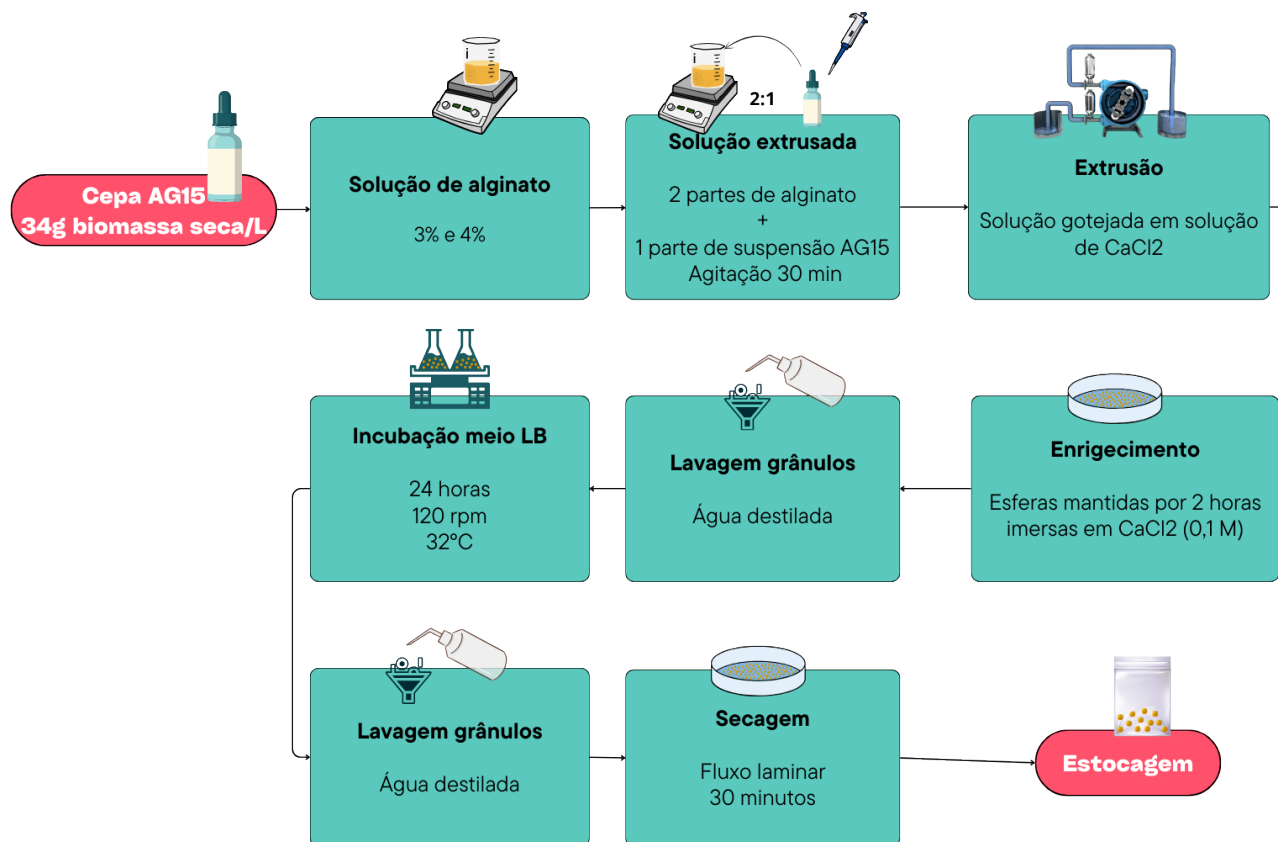


Figura 02: Equema de produção de grânulos de alginato de sódio, contendo de células AG15.

Para cada tratamento, a sobrevivência ($\text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$) das células da cepa AG15 foi avaliada em oito períodos diferentes de armazenamento (0, 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias), conforme indicado por Cappucino e Sherman (2019). As contagens de colônias bacterianas visíveis em placas com ágar nutriente foram realizadas após 12 horas. Os diâmetros foram medidos com um micrômetro eletrônico e pesados em balança analítica em triplicata. As superfícies externas e internas das esferas foram escaneadas usando microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras em forma de esfera foram fixadas com tampão de fosfato de sódio 0,1 M ($\text{pH} = 7,2$), seguido de desidratação em forno a 36 °C por três horas. As amostras foram colocadas no suporte de amostras, que continha fita adesiva de carbono dupla face, e posteriormente secas e metalizadas com fina camada de ouro na superfície para permitir a captura da fotografia. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas com o teste de Tukey ($P < 0,05$) usando o software Statistic 7. Os dados

foram expressos como média \pm SD (n=3). Utilizou-se o software Origin 2018 para a construção do gráfico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, verificou-se a estabilidade dos grânulos nos primeiros dias de estocagem para ambos os tratamentos. A Figura 03 mostra a variação de células de AG15 dentro do grânulo no decorrer de 30 dias. A quantidade de microrganismo na cápsula atingiu $2,1 \cdot 10^{13}$ UFC \cdot g $^{-1}$ de grânulo para o tratamento de 4% e atingiu $1,0 \cdot 10^{13}$ para o tratamento com 3% de alginato. Ao comparar os resultados obtidos com os resultados encontrados por Zago e colaboradores (2019) que produziram grânulos com *Azospirillum brasilense* usando várias formulações contendo alginato, verificamos que os valores obtidos foram correspondentes, visto que os autores obtiveram resultados de $7,86 \cdot 10^{12}$ no trigésimo dia para o tratamento com alginato apenas. Apesar da esfera de 4% ser mais rígida, observou-se que o AG15 cresceu no interior dos grânulos ao longo dos dias, os autores citados, também relataram variações de UFC no interior dos grânulos no decorrer dos dias. Ambos os tratamentos apresentaram maior perda nos últimos cinco dias avaliados, contudo, ainda apresentaram valores acima dos valores encontrados em fertilizantes comerciais, como o BiomaPhos[®] (Oliveira-Paiva *et al*, 20220) que possui $4 \cdot 10^9$ UFC \cdot mL $^{-1}$ (células viáveis). Assim, ressalta-se a promissora aplicabilidade comercial da cepa prospectada.

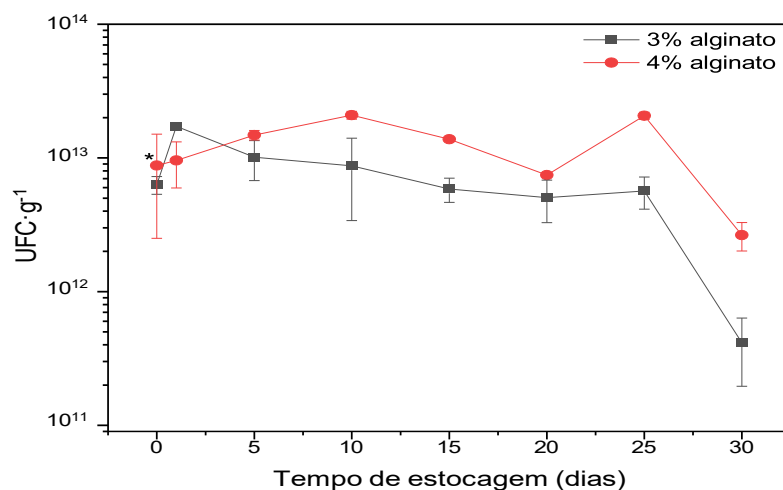


Figura 03: Variação de UFC (unidade formadora de colônia) por tempo. Os pontos seguidos por um asterisco (*) não apresentam diferença estatisticamente significativa a um nível de 5% de significância.

Os dados morfométricos obtidos são apresentados na Tabela 01. As dimensões da esfera exibiram tamanhos uniformes com baixo desvio padrão, confirmando que o protocolo gerou eficientemente esferas padronizadas. As dimensões dos grânulos foram menores na condição de alginato 3% quando comparado ao tratamento de 4%. O rendimento médio foi de $16,82 \pm 0,02$ esferas por mL de solução extrusada, com perdas durante o processo de produção devido à formação de esferas não conformes. Zago e colaboradores (2019) produziram grânulos por meio de uma pipeta Pasteur, o peso obtido variou de 17 a 38 mg e os diâmetros entre 3,30 e 4,30 mm.

Tabela 01: Dados morfométricos e rendimento de extrusão

Tratamento	Peso(g)	Diâmetro (mm)	Rendimento ($\text{un} \cdot \text{mL}^{-1}$)
Alginato 3%	$0,037 \pm 0,011^a$	$4,06 \pm 0,20^a$	$16,8 \pm 0,5^a$
Controle 3%	$0,038 \pm 0,0041^a$	$4,42 \pm 0,17^{ab}$	$16,9 \pm 0,6^a$
Alginato 4%	$0,042 \pm 0,003^a$	$4,44 \pm 0,15^b$	$16,8 \pm 0,2^a$
Controle 4%	$0,043 \pm 0,003^a$	$4,28 \pm 0,26^{ab}$	$16,8 \pm 0,3^a$

Os valores seguidos por letras iguais não diferem entre si estatisticamente, a um nível de significância de 5%.

A análise realizada no MEV apresentada na Figura 04, evidência o formato de gota do grânulo, isto ocorreu devido ao processo de extrusão lenta, resultando em gotas de alginato na solução de CaCl_2 .

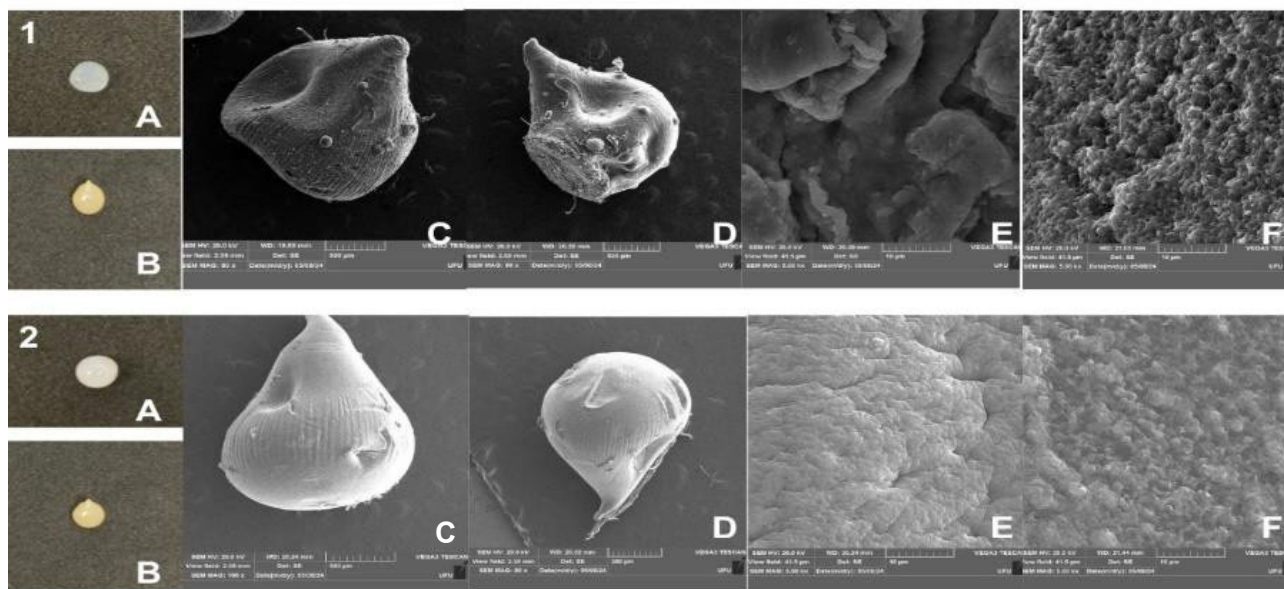


Figura 04: Aspectos morfológicos dos grânulos. 1. Alginato 3%; 2. Alginato 4%. A. Esfera de controle; B. Esfera de teste; C. Superfície externa do controle; D. Superfície externa do teste, aumento de 100x; E. Superfície interna do controle; F. Superfície interna do teste, aumento de 5000x.

Ao avaliar a conformação estrutural por MEV, observamos que a desidratação comprometeu a estrutura das esferas. No entanto é notório a presença de células nas Figuras 04 (F) enquanto, as Figuras 04 (E) não apresentam células, visto que são amostras controle. As células do isolado AG15 não foram encontradas em nenhuma das superfícies das esferas.

CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo demonstram que os bioinoculantes encapsulados em alginato tiveram estabilidade inicial durante os primeiros dias de armazenamento. A quantidade de células do isolado AG15 dentro dos grânulos variou ao longo dos 30 dias, para ambos os tratamentos, e, apesar de haver uma perda significativa nos últimos cinco dias, os valores permaneceram superiores aos encontrados em fertilizantes comerciais. Morfometricamente, as esferas mantiveram uniformidade com baixos desvios padrão, comprovando a eficiência do protocolo. A presença de células de AG15 foi confirmada por meio de MEV. Logo, podemos concluir que a encapsulação com alginato é eficiente na proteção as células de AG15, garantindo um número elevado de células viáveis, mesmo após 30 dias.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem profundamente o apoio financeiro das agências brasileiras de fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (APQ-04349-22 - FAPEMIG). Agradecem também o apoio financeiro da Satis Indústria e Comércio Ltda.

REFERÊNCIAS

CAPPUCCINO, J. C., SHERMAN, N. Microbiology: A Laboratory Manual. Pearson, New York. 12ed. p. 542. 2019.

FLORENCIO, C. *et al.* Quimica Nova, v. 45, n. 9, p. 1133-1145, 2022.

GLICK, B. R. Beneficial Plant-Bacterial Interactions. Cham: Springer, 2020. 2. ed. 383 p.

OLIVEIRA-PAIVA, C. A. *et al.* Viabilidade técnica e econômica do Biomaphos® (Bacillus

subtilis CNPMS B2084 e *Bacillus megaterium* CNPMS B119) nas culturas de milho e soja. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2020. 20 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 210). ODS 12.

REETHA, D. *et al.* International J. of Recent Scientific Research. v. 5., n. 12. p. 2178-2182, 2014.

SABERI-RISEH, R. *et al.* Encapsulation of Plant Biocontrol Bacteria with Alginate as a Main Polymer Material. International Journal of Molecular Sciences, v. 22, n. 20, p. 11165, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms222011165>. Acesso em: 16 maio 2024.

ZAGO, S. L. *et al.* J. of Agricultural Science, v. 11, n. 6, p. 269-280, 2019.

REALIZAÇÃO