



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



DINÂMICA DE INOCULANTE MICROBIANO ENCAPSULADO EM SOLOS SOB DIFERENTES CONDIÇÕES ABIÓTICAS

Vanessa Araujo Graciano

Monografia do Exame Geral de Defesa de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Orientadora:

Profa. Dra. Cristiane Sanchez Farinas

Bolsista (CAPES) – 88887.627851/2021-00

**São Carlos - SP
2023**

VANESSA ARAUJO GRACIANO

**DINÂMICA DE INOCULANTE MICROBIANO ENCAPSULADO EM SOLOS SOB
DIFERENTES CONDIÇÕES ABIÓTICAS**

Monografia do Exame Geral de Defesa de
Mestrado apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal de São Carlos.

Orientadora:

Profa. Dra. Cristiane Sanchez Farinas

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Cristiane Sanchez Farinas

Departamento de Engenharia Química - UFSCar

Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza

Departamento de Biotecnologia - UFSCar

Dra. Christiane Abreu de Oliveira Paiva

Embrapa Milho e Sorgo

São Carlos

2023

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal de São Carlos e ao PPGBiotec – Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade de realização do mestrado.

À Embrapa Instrumentação por conceder espaço físico com equipamentos, materiais e equipe especializada.

A Dra. Cristiane Sanchez Farinas por ter me acolhido e proporcionado um imenso aprendizado através de uma excelente orientação, com confiança, apoio e ensinamentos.

A banca examinadora, pela disponibilidade e interesse em contribuir para esse projeto de pesquisa.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional em toda minha vida escolar e acadêmica. Agradeço todo o amor, carinho e respeito que sempre dedicaram a mim.

A Julia Aoki pela amizade de longos anos, por sempre se fazer presente e me permitir ser minha versão mais honesta.

Ao Matheus Gasetta por ser ponto de paz, amor e cuidado diário.

A Ludimila e a Marina pela amizade e companheirismo dentro e fora do laboratório, e por toda ajuda e ensinamento durante a execução dos experimentos, vocês tornam o trabalho mais leve e divertido.

Aos colegas do laboratório de Bioprocessos e Bioprodutos 1 e 2, pelo suporte, boa convivência e trocas diárias. Em especial à Vanessa Molina pelo auxílio durante a produção do inoculante microbiano, à Rafaela Gama pela análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e ao Ricardo pelo contato e transporte da amostra de solo artificial para análise química e física.

Aos funcionários da Embrapa Instrumentação, em especial a Ana Cassales e a Joana, por todo cuidado com o laboratório e por sempre buscarem atender as nossas demandas, e ao Paulo Lasso pela análise de Difração de Raios-X (DRX).

À Stella por ter realizado a coleta do solo argiloso, e por tê-lo disponibilizado para execução do meu experimento, juntamente com os dados de análise química e física.

À Fernanda Batista (Embrapa Milho e Sorgo), por ser tão solícita e me auxiliar durante o preparo do solo artificial.

Ao Laboratório de Referência Nacional em Agricultura de Precisão (LANAPRE – Embrapa Pecuária Sudeste), sob supervisão do Dr. Alberto de Campos Bernardi, pela análise química e física do solo artificial.

Araujo Graciano, Vanessa. **Dinâmica de inoculante microbiano encapsulado em solos sob diferentes condições abióticas**. 2023. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2023.

RESUMO

O uso de microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF) na agricultura vem sendo considerada como uma alternativa promissora aos fertilizantes químicos. No entanto, um desafio ao realizar a inoculação com microrganismos é o solo apresentar alta complexidade em relação aos fatores bióticos e abióticos. O encapsulamento de microrganismos permite o isolamento físico e pode proporcionar uma maior proteção contra fatores do meio ambiente ou físico-químicos do solo. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do encapsulamento dos MSF quanto a sua abundância em solos sob diferentes condições abióticas. Para isso foi utilizada a cepa de *Bacillus subtilis* inoculada livre e encapsulada em matriz polimérica de amido em solo artificial e argiloso em quatro experimentos: experimento preliminar em solo artificial à 40 °C durante 21 dias; inoculação em solo artificial em diferentes condições de temperatura e salinidade durante 21 dias; e dois ensaios em solo argiloso em diferentes concentrações de NaCl à 30 °C durante 07 dias. Os resultados obtidos no teste preliminar a 40 °C mostraram uma maior abundância do *B. subtilis* encapsulado em comparação ao livre. No solo artificial, os resultados obtidos mostraram que o microrganismo encapsulado obteve maior abundância em baixa temperatura (15 °C) e diferentes concentrações de salinidade (0, 10 e 20 mM NaCl) durante os 21 dias em comparação com o microrganismo livre, com valor até 26 vezes maior em 20 mM aos 14 dias. À 30 °C, a abundância do *B. subtilis* encapsulado também foi maior em todas as condições de salinidade, mas a 45 °C não houve diferença significativa entre os tratamentos. No solo argiloso o *B. subtilis* encapsulado também mostrou maior abundância em comparação com o livre, mas essa abundância diminuiu em altas salinidades (100 mM e 200 mM), o que indica o efeito do estresse salino no desenvolvimento dos microrganismos. Os resultados aqui apresentados confirmam o potencial do *B. subtilis* encapsulado como uma boa estratégia para uso como biofertilizante na promoção da proteção dos microrganismos frente a condições abióticas adversas do solo e ambiente.

Palavras-chave: *Bacillus subtilis*; salinidade; temperatura; biofertilizante, solo.

Araujo Graciano, Vanessa. **Dynamics of encapsulated microbial inoculant in soil under different abiotic conditions**. 2023. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2023.

Abstract

Phosphate fertilizers are widely used in order to achieve high crop productivity, but their production processes are expensive and can cause environmental damage. An alternative for fertilization is the use of P-solubilizing microorganisms (PSMs). However, a challenge during the inoculation with microorganisms is the high complexity of the soil in relation to biotic and abiotic factors. To overcome this limitation, a strategy to improve the abundance of PSMs is the use of encapsulated microorganisms as an inoculant. This strategy can protect the microorganisms from adverse environmental effects, physical and chemical factors of the soil, and increase the shelf-life time. The present study evaluated the abundance of free and encapsulated *Bacillus subtilis* in the artificial and clay soil in four experiments: a preliminary experiment in artificial soil at 40 °C during 21 days; inoculation in artificial soil under different salinity and temperature conditions during 21 days; and two tests in clay soil under different salinity conditions at 30 °C during 7 days. A polymeric gelatinized starch matrix was used for microbial encapsulation. The preliminary test resulted in a higher abundance of the encapsulated microorganism compared with the free. The results in the treatment with the inoculation in artificial soil showed that the encapsulated *B. subtilis* had a higher abundance under low temperature (15 °C) and all salinity conditions (0, 10 and 20 mM NaCl) during the 21 days in comparison to free microorganism, with value up 26 times higher in 20 mM in 14 days. At 30 °C, the abundance of the microorganism was also higher in all salinity conditions, but at 45 °C there was no significant difference between free and encapsulated microorganisms. In the clay soil the encapsulated *B. subtilis* also had a higher abundance in comparison with the free microorganism, but this abundance decreased with high salinity condition (100 mM and 200 mM), reflecting how salinity stress affect the microorganisms developing. The results obtained here confirmed the potential of the encapsulated *B. subtilis* as a good strategy for

fertilization in providing protection of the microorganisms in adverse abiotic conditions.

Keywords: *Bacillus subtilis*; salinity; temperature; biofertilizer; soil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração com as consequências do uso de fertilizantes fosfatados em comparação com o uso de inoculantes microbianos.	14
Figura 2. Ilustração dos principais fatores abióticos que influenciam na fertilidade e saúde do solo, seguida de um mapa de solos do Brasil, fornecido pela Embrapa Solos (2020), que mostra a grande diversidade de solos presentes do país.	18
Figura 3. Armazenamento do solo artificial.	24
Figura 4. Armazenamento do solo argiloso.	25
Figura 5. Disposição dos pequenos potes contendo solo dentro de uma caixa do tipo organizadora para manter a umidade, acondicionados em incubadora.	28
Figura 6. Tubos de ensaio de 15 mL contendo 1 g de solo artificial (a-b) e argiloso (c-d) dissolvido em 10 mL solução salina 0,85 % para posterior extração de <i>B. subtilis</i>	30
Figura 7. Inoculante microbiano seco em estufa e em pó.	32
Figura 8. Padrões de DRX do amido, rocha bayóvar e da formulação.	33
Figura 9. Micrografia por microscopia eletrônica de varredura do inoculante microbiano encapsulado.	34
Figura 10. Abundância do <i>B. subtilis</i> (UFC/g) em solo artificial, nos tratamentos livre, controle e encapsulado, após os 7, 14 e 21 dias de inoculação.	37
Figura 11. Abundância do <i>B. subtilis</i> (UFC/g) em solo artificial, nos tratamentos livre e encapsulado, em diferentes níveis de salinidade (0 mM, 10 mM e 20 mM) a 15 °C em diferentes tempos. a) 7 dias, b) 14 dias e c) 21 dias.	40
Figura 12. Abundância do <i>B. subtilis</i> (UFC/g) em solo artificial, nos tratamentos livre e encapsulado, em diferentes níveis de salinidade (0 mM, 10 mM e 20 mM) a 30 °C em diferentes tempos. a) 7 dias, b) 14 dias e c) 21 dias.	41
Figura 13. Abundância do <i>B. subtilis</i> (UFC/g) em solo artificial, nos tratamentos livre e encapsulado, em diferentes níveis de salinidade (0 mM, 10 mM e 20 mM) a 45 °C em diferentes tempos. a) 7 dias, b) 14 dias e c) 21 dias.	42
Figura 14. Abundância do <i>B. subtilis</i> (UFC/g) em solo argiloso, nos tratamentos livre, controle e encapsulado, em diferentes níveis de salinidade (0 mM, 10 mM e 20 mM) após os 7 dias de inoculação.	45
Figura 15. Abundância do <i>B. subtilis</i> em placas de petri em meio TSB e ágar bacteriológico após a extração do solo com 7 dias de inoculação. Tratamentos encapsulado, livre e controle submetidos ao estresse por salinidade nas concentrações de NaCl 0, 10 e 20 mM. Diluição seriada 10 ⁻¹ em todas as placas.	46
Figura 16. Abundância do <i>B. subtilis</i> (UFC/g) em solo argiloso, nos tratamentos livre, controle e encapsulado, em diferentes níveis de salinidade (0 mM, 100 mM e 200 mM) após os 7 dias de inoculação.	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Experimentos realizados nos solos artificial e argiloso.....	29
Tabela 2. Propriedades químicas e físicas dos solos estudados.....	36
Tabela 3. Viabilidade do compósito fertilizante encapsulado (UFC/g) após um ano de armazenamento.....	53

SUMÁRIO

Capítulo 1 - Introdução	12
1.1 Objetivos	20
1.1.1 Objetivos gerais.....	20
1.1.2 Objetivos específicos	20
Capítulo 2 - Materiais e Métodos	20
2.1 Cepa bacteriana	20
2.2 Compósito fertilizante encapsulado	21
2.3 Caracterizações	21
2.3.1 Difração de Raios-X (DRX)	21
2.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	21
2.4 Preparo do inóculo e processo de encapsulamento	22
2.5 Preparo dos solos	23
2.5.1 Solo artificial	23
2.5.2 Solo argiloso	24
2.6 Ensaio em solo com a bactéria encapsulada, livre e livre com adição de compósito fertilizante sem microrganismo.....	25
2.6.1 Extração do compósito fertilizante encapsulado.....	25
2.6.2 Preparo do microrganismo livre.....	26
2.6.3 Tratamento controle	27
2.6.4 Experimentos em solo.....	27
2.6.5 Determinação da abundância do <i>Bacillus subtilis</i> 2084.....	29
2.7 Viabilidade do inoculante microbiano encapsulado após o armazenamento	31
2.8 Análises estatísticas.....	31
Capítulo 3 - Resultados e Discussão	32
3.1 Caracterizações	32
3.1.3 Difração de Raios-X (DRX)	32
3.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	33
3.1.3 Caracterização química e física dos solos artificial e argiloso.....	34
3.2 Experimento preliminar em solo artificial	37
3.3 Inoculação no solo artificial.....	38
3.4 Inoculação no solo argiloso	44
3.5 Inoculação no solo argiloso em alta salinidade.....	48
3.6 Viabilidade do inoculante microbiano encapsulado após um ano de armazenamento	52
Capítulo 4 - Conclusões	53
Capítulo 5 – Etapas futuras	55
Referências	56

Capítulo 1 - Introdução

A segurança alimentar tem se tornado uma preocupação mundial de grande relevância, principalmente dentro do cenário da agricultura. Produzir alimentos com qualidade e em quantidade para suprir a demanda da população é um interesse em comum entre as nações. No entanto, o atual cenário ambiental e as perspectivas futuras quanto às variações climáticas trazem incertezas sobre o acesso à segurança alimentar. Dados fornecidos pela FAO (2018) mostram que o setor agrícola contribui com 80 % da alimentação mundial e é o que mais sofre consequências com relação à seca, com perdas de até 83 %, e é também o setor que concebe aproximadamente 23 % de todas as perdas advindas de catástrofes ambientais. Essa problemática ambiental traz diversos prejuízos para a saúde e qualidade do solo, que impactam severamente a produção de alimentos. Isso acontece, pois, a degradação do solo influencia diretamente na fertilidade, causando assim estresses bióticos (patógenos) e abióticos (seca, salinidade, baixas e altas temperaturas, metais tóxicos, radiação UV, etc.) nas culturas (Santoyo et al., 2019).

O fósforo (P) é um elemento químico fundamental para os seres vivos, considerando sua atuação estrutural, funcional e na transmissão de energia (Nahas, 1991). No solo, esse elemento é separado em dois grupos, fósforo inorgânico e fósforo orgânico, conforme o composto ao qual está ligado. Nas plantas, o P é um dos principais nutrientes que limitam o crescimento e corresponde a aproximadamente 0,2 % da massa seca e, apesar da pequena quantidade, é vital na produção agrícola (Mullins, 2009; Klaic, 2017a). Sem a presença de P nas plantas, diversas funções são afetadas, como a formação e maturação de frutos, a floração, o crescimento das raízes e o número de células.

Como resultado do material de origem e da grande interação do P com os componentes do solo, os solos brasileiros sofrem com a carência desse elemento (Raij, 1991), já que menos de 0,1 % se apresenta na forma solúvel (Fardeau, 1996). O fósforo é geralmente encontrado em solos na forma de compostos de baixa solubilidade. Entretanto, as plantas podem absorver apenas o P que está dissolvido na água presente no solo (fosfato solúvel), que se encontra principalmente na forma de ânions H_2PO_4^- e HPO_4^{2-} (Fontes & Weed,

1996; Mullins, 2009; Krishnaraj & Dahale, 2014).

As rochas fosfáticas (RFs) são a principal fonte de matéria-prima para produção de fertilizantes fosfatados e são constantemente exploradas para suprir as altas demandas das indústrias de fertilizantes. A produção tradicional dessa classe de fertilizantes é baseada no processamento químico da rocha fosfática para obter fósforo inorgânico solúvel. Seu processo de produção envolve um alto consumo de energia, elevado gasto de ácido sulfúrico e ácido fosfórico, assim como a liberação de contaminantes no efluente gasoso, sendo assim, danoso ao meio ambiente e causando impactos prejudiciais a atmosfera (Klaic et al., 2018b).

As indústrias de fertilizantes usam a rocha fosfática como matéria prima para a produção do ácido fosfórico, e a rocha quando sofre o ataque com o ácido sulfúrico mais a água produz o sulfato de cálcio e ácido fluorídrico como subprodutos da reação. O sulfato de cálcio di-hidratado ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) compõe o fosfogesso ou gesso agrícola, que está entre os resíduos de origem industrial com alto teor de poluição e com maior impacto ambiental, devido a sua produção em larga escala (em média, cinco toneladas de gesso por tonelada de P_2O_5) e a difícil disposição, ficando em grande quantidade ao redor das indústrias de fertilizantes fosfatados, causando a contaminação de diversos recursos hídricos (Maschietto, 2009; Belchior, et al., 2010; Spirlandelli, 2017).

A maior parte dos solos brasileiros são classificados como latossolos, que estão presentes em regiões tropicais e subtropicais, e têm como principais características a baixa fertilidade, o pH geralmente ácido e a grande retenção de água. Além de ter pouca disponibilidade de fósforo devido à alta adsorção de P e a formação de fosfatos de ferro e alumínio (Ribeiro et al., 2018), e a retenção do P em partículas do solo e óxidos, o que leva ao uso de fertilizantes químicos em larga escala para suprir essa deficiência nutricional.

A aplicação excessiva de fertilizantes químicos solúveis como o superfosfato simples e triplo para promover o crescimento de diversas culturas, tem resultado na poluição dos solos e corpos hídricos, levando a problemas como eutrofização de corpos d'água próximo a áreas agrícolas (Vassilev et al., 2015). Efeitos indiretos incluem a elevada proliferação de algas e a mortalidade dos peixes devido à redução do nível de oxigênio (Klaic et al., 2018b). Devido a estes

problemas, há uma tendência mundial em aderir práticas de agricultura sustentável e a utilização de biofertilizantes é uma alternativa que vem sendo proposta em diversas conferências ambientais (Kontic and Kontic, 2012; Florencio et al., 2022) (Figura 1).



Figura 1. Ilustração com as consequências do uso de fertilizantes fosfatados em comparação com o uso de inoculantes microbianos.

Uma solução para esses problemas é a inoculação de microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF), que aliados ou não a outros organismos benéficos, aumentam a taxa de crescimento das plantas (Klaic, 2017a). Os microrganismos desempenham um papel fundamental na ciclagem de fósforo no solo, sendo capazes de transformar o fósforo insolúvel em formas solúveis e acessíveis às plantas (Owen et al., 2015).

Entre os microrganismos promotores de crescimento de plantas estão os *Bacillus*, que fazem parte de um grupo de bactérias Gram-positivas amplamente distribuídas no ambiente, e contém, aproximadamente, 416 espécies (incluindo sinônimos) com características fisiológicas, metabólicas e fenotípicas distintas (Cohn F., 1875). Espécies desse gênero têm sido conhecidas como potenciais promotoras de crescimento de plantas por apresentarem características multifuncionais como a solubilização de fosfato (Wahyudi et al., 2011; Abreu et al., 2017, Bahadir et al., 2018; Florencio et al., 2022), a produção de ácido indol-

acético (AIA) e outros fitormônios (Abreu et al., 2017; Wahyudi et al., 2011; Mohite, 2013).

Dentre essas espécies está o *Bacillus subtilis*, que tem como característica a capacidade de formar de esporos quando submetido a condições em que os níveis de carbono, fósforo e nitrogênio estão abaixo do considerado ideal para promover crescimento, além de altas temperaturas e outros tipos de estresses, como salinidade, radiação, pH, etc. Esses endósporos apresentam uma grande importância quanto a sobrevivência do *B. subtilis* em ambientes com deficiência de nutrientes, temperaturas altas, níveis de pH desfavoráveis, entre outras condições prejudiciais à sua sobrevivência (Ni & Punja, 2019).

Mesmo alguns microrganismos apresentando condições favoráveis de proteção a fatores ambientais adversos, o uso de inoculantes microbianos na agricultura ainda é limitado devido à baixa viabilidade frente a condições abióticas, como temperatura, pH, exposição a pesticidas, etc. Assim, uma estratégia para aumentar a eficiência dos inoculantes é o uso desses microrganismos encapsulados. O encapsulamento de microrganismos permite o isolamento físico e proporciona proteção contra fatores do meio ambiente ou físico-químicos do solo (José et al., 2018). As vantagens do uso de microrganismos solubilizadores de fosfato encapsulados incluem um aumento no tempo de prateleira e sobrevivência no solo, além da proteção dos microrganismos de condições ambientais adversas (Vassilev et al., 2001; Jain et al., 2010; Vassileva et al., 2010; Vassilev et al., 2015; Klaic et al., 2018).

Neste sentido, estudos de encapsulamento usando amido têm sido realizados em nosso grupo de pesquisa e apresentam resultados que suportam o desenvolvimento de uma nova classe de biofertilizantes, possibilitando novas aplicações e estudos para avaliar formulações com minerais pouco solúveis como fonte de nutrientes para as plantas. Klaic et al. (2018b), por exemplo, desenvolveram compósitos fertilizantes a partir do processo de gelatinização de amido com dispersão simultânea de um mineral fosfatado e encapsulamento do fungo filamentoso *Aspergillus niger* C. Como resultado, observaram que este compósito aumentou a solubilidade do fosfato presente no mineral quando bioativado em solo, mostrando que a matriz de amido é um material ideal para a dispersão simultânea do fosfato e do encapsulado, maximizando o efeito da

solubilização de P por microrganismos.

Mais recentemente, Klaic et al. (2021) propuseram uma integração de óxido minerais em um compósito baseado em uma matriz de amido contendo óxido minerais e enxofre (S) dispersos que permitiram o encapsulamento do *Aspergillus niger*. Mostrando assim, que a produção de ácidos orgânicos e a oxidação de S promovida pelo *A. niger* encapsulado favoreceu a absorção de micronutrientes de fontes minerais em plantas. Lopes et al. (2023) estudaram a influência de diferentes aditivos nas propriedades de esferas de pectina e amido para o encapsulamento de *B. subtilis*. Dentre os resultados, foi constatado que o amido presente na matriz foi essencial para a morfologia das esferas, e todas as formulações conseguiram manter um número de células viáveis acima dos valores mínimos necessários para a produção de inoculantes microbianos, mesmo em condições de exposição a fungicida e radiação UV.

O amido oferece características vantajosas no uso como matriz para o encapsulamento simultâneo de MSF, pois apresenta baixo custo, é abundante e é um polímero natural biodegradável (dos Santos et al., 2015; Giroto et al., 2014; Giroto et al., 2017; Klaic et al., 2018b). Além disso, o amido pode servir como fonte de carbono e atuar no crescimento de microrganismos (Guimarães et al., 2018), favorecendo a colonização desses microrganismos no solo. Matrizes a base de amido também demonstraram reduzir o estresse físico de células microbianas e melhorar significativamente sua sobrevivência (Bashan et al., 2002; Vassilev et al., 2020).

O solo contém biomassa bacteriana de aproximadamente 95 %, chegando a um número elevado de células bacterianas em solos saudáveis (10^8 a 10^9 células/g de solo), enquanto solos que passam por situações de estresse, seja por fatores abióticos ou bióticos, podem ter bactérias com cerca de 10^4 células/g de solo (Rani et al, 2019). Dentre os estresses presentes no solo, estão as altas temperaturas, principalmente em solos arenosos em regiões brasileiras como o Centro-Oeste, Norte e Nordeste, que se relacionam diretamente ao estresse hídrico devido à incidência da seca e veranicos. Outros estresses incluem o encharcamento do solo, que causa a falta de aeração, a radiação UV, a falta de matéria orgânica, a competição com outros microrganismos e a salinidade pelo uso em excesso de fertilizantes e a seca, etc. Além de ser considerado muito

diverso, é um ambiente extremamente complexo, e apresenta um poder tamponável em relação a condições adversas, minimizando os efeitos da introdução de novos organismos (Figura 2).

Fatores abióticos



Temperatura

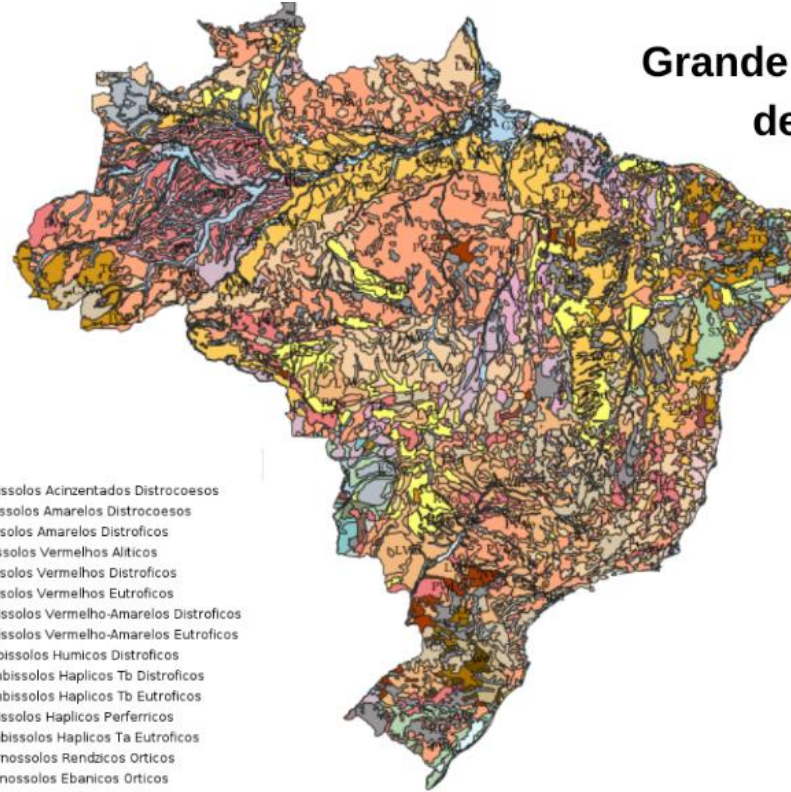


Salinidade

Legenda

- PACd - Argissolos Acinzentados Distrocóseos
- PAdx - Argissolos Amarelos Distrocóseos
- PAd - Argissolos Amarelos Distróficos
- PVal - Argissolos Vermelhos Alíticos
- PVd - Argissolos Vermelhos Distróficos
- PVe - Argissolos Vermelhos Eutróficos
- PVAd - Argissolos Vermelho-Amarelos Distróficos
- PV Ae - Argissolos Vermelho-Amarelos Eutróficos
- CHd - Cambissolos Húmicos Distróficos
- CXbd - Cambissolos Háplicos Tb Distróficos
- CXbe - Cambissolos Háplicos Tb Eutróficos
- CXj - Cambissolos Háplicos Perféricos
- CXve - Cambissolos Háplicos Ta Eutróficos
- MDo - Chernossolos Rendzicos Orticos
- MEo - Chernossolos Ebanicos Orticos
- MTo - Chernossolos Argiluvicos Orticos
- ESKg - Espodossolos Ferrihumiluvicos Hidromórficos
- ESKu - Espodossolos Ferrihumiluvicos Hiperespessos
- ESKo - Espodossolos Ferrihumiluvicos Orticos
- Gjo - Gleissolos Tiomórficos Orticos
- GZn - Gleissolos Salicos Sódicos
- GZo - Gleissolos Salicos Orticos
- GXbd - Gleissolos Háplicos Tb Distróficos
- GXvd - Gleissolos Háplicos Ta Distróficos
- GXve - Gleissolos Háplicos Ta Eutróficos
- LBd - Latossolos Brunos Distróficos
- LAd - Latossolos Amarelos Distróficos

Grande diversidade de solos



- LVdf - Latossolos Vermelhos Distroférricos
- LVd - Latossolos Vermelhos Distróficos
- LVef - Latossolos Vermelhos Eutróférricos
- LVe - Latossolos Vermelhos Eutróficos
- LVAdf - Latossolos Vermelho-Amarelos Distroférricos
- LV Ae - Latossolos Vermelho-Amarelos Eutróficos
- TCP - Luvisolos Cromicos Palicos
- TCo - Luvisolos Cromicos Orticos
- RLd - Neossolos Litólicos Distróficos
- RLe - Neossolos Litólicos Eutróficos
- RYbd - Neossolos Flúvicos Tb Distróficos
- RYbe - Neossolos Flúvicos Tb Eutróficos
- RYve - Neossolos Flúvicos Ta Eutróficos
- RRd - Neossolos Regolíticos Distróficos
- RRe - Neossolos Regolíticos Eutróficos
- RQg - Neossolos Quartzarenicos Hidromórficos
- RQo - Neossolos Quartzarenicos Orticos
- NVd - Nitossolos Vermelhos Distróficos
- NVe - Nitossolos Vermelhos Eutróficos
- NXd - Nitossolos Háplicos Distróficos
- NXe - Nitossolos Háplicos Eutróficos
- OXy - Organossolos Háplicos Hémicos
- SNo - Planossolos Natricos Orticos
- SXd - Planossolos Háplicos Distróficos
- SXe - Planossolos Háplicos Eutróficos
- FFc - Plintossolos Petricos Concrecionarios
- FXd - Plintossolos Háplicos Distróficos
- VGo - Vertissolos Hidromórficos Orticos
- VEK - Vertissolos Ebanicos Carbonaticos
- VEo - Vertissolos Ebanicos Orticos
- VXo - Vertissolos Háplicos Orticos
- AR - Afloramentos de Rochas
- DN - Dunas
- AGUA

Mapa de solos do Brasil. Embrapa Solos, 2020.

Figura 2. Ilustração dos principais fatores abióticos que influenciam na fertilidade e saúde do solo, seguida de um mapa de solos do Brasil, fornecido pela Embrapa Solos (2020), que mostra a grande diversidade de solos presentes do país.

A resistência à introdução de organismos deve-se a vários fatores bióticos e abióticos. Os fatores abióticos responsáveis pelo declínio das populações bacterianas introduzidas nos solos são principalmente a textura, tipo de argila, temperatura, pH e a disponibilidade de substratos orgânicos (Van Veen et al., 1997; Mendes & Junior, 2003). A umidade também é um fator importante que determina a sobrevivência dos microrganismos no solo (Baker, 1980; Zechman & Casida, 1982; Dupler & Baker, 1984). Assim como a salinidade, que é um fator preocupante de degradação do solo e é uma ameaça às comunidades microbianas, pois restringe a capacidade metabólica dos microrganismos à biodegradação (Rath & Rousk, 2015). Atualmente, a presença de grandes quantidades de NaCl no solo é um problema recorrente em muitas regiões ao redor do mundo (Nadeem et al., 2014).

Dentre os fatores adversos citados, os que mais afetam a produtividade das culturas são a temperatura e a salinidade. Cerca de 75 % das indenizações por perda de culturas na Proagro são referentes à seca, sendo as principais culturas atingidas o milho (52,74 %) e a soja (22,59 %) o que evidencia o quanto esse fator é comum e prejudicial para a agricultura no Brasil, dado esse que corrobora com o índice fornecido pela FAO, 2018 de que 83 % dos danos ambientais que prejudicam a agricultura são ocasionados pelas secas (Martins, 2021). E o fato de as principais áreas agricultáveis estarem localizadas em regiões áridas e semiáridas acaba por relacionar altas temperaturas a altos níveis de salinidade no solo, devido ao manejo inadequado da irrigação e aplicação em larga escala de fertilizantes sintéticos.

Um projeto recente realizado pela FAO e colaboradores de diversos países estabeleceu um mapa global de solos afetados pelo sal (<https://www.fao.org/global-soil-partnership/gasmap/en>), no qual mostra que aproximadamente 833 milhões de hectares de solo são afetados pelo sal ao redor do mundo, fator esse que deixa uma grande porcentagem dos solos inférteis e colabora para a insegurança alimentar de populações que cultivam alimentos (Nações Unidas Brasil, 2021), pois a salinidade prejudica a proporção de Na^+/K^+ , condiciona ao estresse osmótico e afeta os processos de crescimento e desenvolvimento das plantas (Parida & Das, 2005).

Como as condições bióticas e abióticas são diversas e variáveis, não existe

uma regra geral de como otimizar a formulação de inoculantes e seu efeito na abundância dos microrganismos em solo, tornando-se necessário o estudo desses sistemas para melhor entendimento dos mecanismos de interação solo-microrganismo. Destaca-se ainda que essas alterações no perfil do solo podem ser ainda mais intensas em cenários futuros de mudanças climáticas. Um dos maiores desafios ao produzir um inoculante é promover a proteção do microrganismo, garantir a sua sobrevivência quando submetido a situações de estresse e assegurar que ele vai se manter viável no solo após a aplicação.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivos gerais

Este projeto de mestrado teve como objetivo avaliar o efeito do encapsulamento do microrganismo *Bacillus subtilis*, solubilizador de fosfato, quanto a sua abundância em solos sob diferentes condições abióticas.

1.1.2 Objetivos específicos

- Produzir o inoculante livre e encapsulado de *Bacillus subtilis* (CNPMS B2084) em matriz polimérica de amido;
- Caracterizar o inoculante microbiano produzido quanto às suas propriedades físico-químicas;
- Caracterizar os solos submetidos às diferentes condições de inoculação em relação às propriedades físico-químicas;
- Determinar a abundância do *B. subtilis* livre e encapsulado em dois tipos de solos com diferentes condições de salinidade e temperatura.

Capítulo 2 - Materiais e Métodos

2.1 Cepa bacteriana

A bactéria utilizada como inóculo foi a *Bacillus subtilis* (CNPMS B2084), pertencente à coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas-MG, que se mostrou eficiente quanto ao potencial de

solubilização e mineralização de fósforo e na promoção de crescimento de plantas (Oliveira et al., 2009; Ribeiro et al., 2018; Oliveira-Paiva et al., 2020; Sousa et al., 2020, Ribeiro et al., 2022).

2.2 Compósito fertilizante encapsulado

O compósito contendo amido e esporos de *Bacillus subtilis* foi preparado a partir do processo de gelatinização do amido 5 % p/v em uma solução de água destilada com 1 % (p/v) de glicerol e 10 % de rocha bayóvar, conforme a metodologia adaptada descrita por Klaic et al., 2018b. Primeiro foi pesado separadamente 10 g de amido, 20 g de bayóvar e 2 g de glicerol mais 198 g de água destilada. O amido e o glicerol mais a água destilada foram colocados em banho maria a 96 °C sob agitação constante por 30 minutos até formar um gel homogêneo. Depois de formado o gel, foi retirado do banho maria e foi adicionada a rocha bayóvar, permanecendo em agitação. Quando a temperatura do material atingiu 35 °C foi adicionado o microrganismo no volume calculado (Tópico 2.4), ficando em agitação por cerca de cinco minutos. Na sequência, a formulação em gel foi colocada em uma folha acrílica, usada como esteira, para secar em estufa a 30 °C por 24 horas.

2.3 Caracterizações

2.3.1 Difração de Raios-X (DRX)

Análises de Difração de Raios-X foram feitas para identificar as fases que compõem o material, desde os reagentes puros ao material final produzido. O equipamento utilizado foi um difractômetro LabX XRD-6000 (Shimadzu, Japão), operado com radiação Cu-K α ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$), tensão de 30 kV e corrente de 30 mA. Os difratogramas foram registrados para 2θ de 4° a 70°, usando uma velocidade de varredura contínua de 2° min⁻¹.

2.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A observação da morfologia do inoculante microbiano encapsulado foi realizada através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) utilizando um

microscópio Sigma (Zeiss, Alemanha). A operação do dispositivo foi feita a uma tensão acelerada de 5 kV com ampliação de 1000x, distância de trabalho de 10 mm e detector de elétrons secundários.

2.4 Preparo do inóculo e processo de encapsulamento

A partir de uma coleção estoque (-80 °C) de *B. subtilis* 2048, a bactéria foi reativada pela técnica de esgotamento em placa de petri em meio de cultivo caldo Triptona de Soja (TSB – 30 g/L) e ágar bacteriológico (15 g/L) a 30 °C por 12 horas. Após esse período, uma colônia da bactéria isolada a partir do esgotamento foi transferida para 50 mL de pré-inóculo (caldo TSB) e acondicionado em incubadora orbital a 250 rpm por 14 a 16 horas, com o intuito de melhorar a esporulação da bactéria. Posteriormente, 10 % do pré-inóculo foi transferido para um Erlenmeyer (500 mL) contendo 100 mL de caldo TSB e submetido a agitação constante de 250 rpm a 30 °C durante 72 horas. Após esse período, o inóculo foi transferido para tubos falcons (50 mL), centrifugados a 8000 rpm, 4 °C por 20 minutos. As células foram ressuspensas em ± 20 mL de solução salina (NaCl 0,85 %) estéril com auxílio de um agitador vórtex para homogeneização. Uma alíquota da cultura suspensa foi diluída, no mínimo 40 vezes, em solução salina e sua densidade ótica foi lida em espectrofotômetro em 540 nm. Sendo:

$$\text{Absorbância} = 1 = 10^8 \text{ UFC/mL}$$

O volume da cultura necessário para inocular 10^9 UFC/g de massa seca de polímero foi calculado a partir da Equação 1:

$$\text{Volume} = \frac{\text{massa seca de polímero} * 10^9}{\text{absorbância medida} * \text{diluição}} \quad (1)$$

Para o encapsulamento do *B. subtilis*, a formulação polimérica foi produzida de acordo com o Tópico 2.2. Após a gelatinização do amido a 96 °C por cerca de 30 minutos e posterior adição da rocha (bayóvar) a 35 °C, um volume de cultura referente a 10^9 UFC/g de massa seca de polímero foi

adicionado à temperatura ambiente para ser homogeneizado. O gel inoculado foi vertido em folha de acrílico e colocado para secar em estufa de circulação de ar. A secagem foi feita durante 24 horas a 30 °C. Depois de seco, o composto inoculado passou pelo moinho de bolas por 20 minutos até formar um pó, e em seguida peneirado em uma granulometria de 150 µm.

2.5 Preparo dos solos

2.5.1 Solo artificial

O solo artificial foi produzido seguindo um procedimento padrão previamente estabelecido pelo Dr. Caue Ribeiro, pesquisador na Embrapa Instrumentação, São Carlos, São Paulo, para experimentos em casa de vegetação. Este solo foi produzido em laboratório e é composto por uma mistura contendo 80 % de areia (70 % de areia branca e 30 % de areia fina 0 mm) e 20 % de caulinita (composição: $Al_4(Si_4O_{10})(OH)_8$). Após sua produção, o solo foi autoclavado por 15 minutos a 121 °C para esterilização e uma amostra foi submetida a análise química no Laboratório de Referência Nacional em Agricultura de Precisão (LANAPRE – Embrapa Pecuária Sudeste), sob supervisão do Dr. Alberto de Campos Bernardi.

Depois de esterilizado, o solo foi pesado e armazenado em pequenos potes plásticos identificados, tendo um volume final de 80 g (Figura 3).



Figura 3. Armazenamento do solo artificial.

2.5.2 Solo argiloso

O solo argiloso foi previamente coletado por pesquisadores do nosso grupo de estudos em projetos anteriores. A coleta foi realizada no LANAPRE - Embrapa Pecuária Sudeste, e uma caracterização química básica foi realizada. O solo foi peneirado para remoção de partículas indesejadas, esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121 °C, e posteriormente acondicionado na estufa a 60 °C por 24 horas para secagem.

Depois de esterilizado e seco, o solo foi pesado e armazenado em pequenos potes plásticos identificados, tendo um volume final de 50 g (Figura 4).



Figura 4. Armazenamento do solo argiloso.

2.6 Ensaio em solo com a bactéria encapsulada, livre e livre com adição de composto fertilizante sem microrganismo

Quatro experimentos foram realizados, sendo dois no solo artificial e dois no argiloso.

2.6.1 Extração do composto fertilizante encapsulado

Inicialmente, foi avaliada a liberação do *Bacillus subtilis* 2084 a partir do composto fertilizante encapsulado produzido. Um grama do material encapsulado (equivalente a 10^9 UFC/g de polímero) foi adicionado a um Erlenmeyer (250 mL) com 50 mL de solução salina NaCl 0,85 %, e posteriormente colocado em uma incubadora shaker orbital a 30 °C, 250 rpm por 2 horas. Após a extração do material, realizou-se a diluição seriada da amostra e inoculação em meio TSB e ágar bacteriológico adicionando 20 μ L da solução e espalhando pela placa. Esse ensaio foi feito a partir de triplicata biológica (3

Erlenmeyers) e triplicata analítica para cada diluição. As placas inoculadas foram armazenadas a 26 °C por 24 horas para contagem das colônias formadas.

Em seguida, para avaliar a abundância (UFC/g) do *B. subtilis* em solo, inicialmente foram realizados cálculos para determinar a quantidade de material encapsulado a ser utilizado no solo artificial (Equação 2) e no solo argiloso (Equação 3). Sendo:

$$UFC/g = \frac{1 \text{ g de microrganismo encapsulado} * 1,5 * 10^7}{UFC/g \text{ de material encapsulado produzido}} \quad (2)$$

$$UFC/g = \frac{1 \text{ g de microrganismo encapsulado} * 1,5 * 10^6}{UFC/g \text{ de material encapsulado produzido}} \quad (3)$$

2.6.2 Preparo do microrganismo livre

Para a obtenção do microrganismo livre, foi feito um inóculo a partir do *Bacillus subtilis* 2084 da forma que foi descrita no Tópico 2.4. Na sequência, foi realizada a diluição seriada da amostra e inoculação em meio TSB e ágar bacteriológico adicionando 20 µL da solução e espalhando pela placa. Esse ensaio foi feito a partir de triplicata biológica e triplicata analítica para cada diluição. As placas inoculadas foram armazenadas a 26 °C por 24 horas para contagem das colônias formadas.

Após a contagem das colônias, foram feitos cálculos a partir das Equações 4 e 5 para determinar a quantidade de microrganismo livre a ser adicionado no solo artificial e argiloso, respectivamente.

$$M.O. Livre (UFC/mL) \text{ solo artificial} = \frac{1 \text{ mL de m.o. livre} * 1,5 * 10^7}{UFC/mL \text{ de m.o. livre do inóculo produzido}} \quad (4)$$

$$M.O. Livre (UFC/mL) \text{ solo argiloso} = \frac{1 \text{ mL de m.o. livre} * 1,5 * 10^6}{UFC/mL \text{ de m.o. livre do inóculo produzido}} \quad (5)$$

2.6.3 Tratamento controle

O preparo do microrganismo livre seguiu os mesmos passos descritos nos Tópicos 2.4 e 2.6.2. Já a obtenção do compósito polimérico foi realizada de acordo com a metodologia presente no Tópico 2.2, sem a adição de esporos de *B. subtilis*, contendo apenas amido, bayóvar e glicerol. O intuito desta etapa foi avaliar se somente a presença dos componentes da formulação no solo traria ao microrganismo uma melhor fonte de sobrevivência, ou se é o encapsulamento a partir desses materiais que promove a proteção ao *Bacillus*, e conseqüentemente sua abundância no solo. A quantidade de cada material foi a mesma aplicada de acordo com os valores calculados para o microrganismo livre e encapsulado.

2.6.4 Experimentos em solo

Como descrito previamente nos Tópicos 2.5.1 e 2.5.2, os solos preparados foram separados em pequenos potes plásticos identificados e pesados em um volume de 80 g/pote (solo artificial) e 50 g/pote (solo argiloso). Em todos os recipientes foi adicionada solução nutritiva adaptada de Hoagland & Arnon (1950) na seguinte composição em g/L: (K_2SO_4), 44,5; (KH_2PO_4), 136,0; ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), 221,0; ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), 215,0; ($(NH_4)_2SO_4$), 138,67; (H_3BO_4), 0,74; ($(NH_4)MO_7O_{24} \cdot 4H_2O$), 0,37; ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$), 0,39; ($MnSO_4 \cdot H_2O$), 1,52; ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), 0,10, solução de Fe-EDTA (26,1 g de EDTA dissódico em 286 ml de NaOH Mol L^{-1} , misturado com 24,9 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$. Arejado por uma noite e completado a 1 L) e água destilada esterilizadas. A umidade dos solos ficou em 60 % e o pH entre 7 e 8 (solo artificial) e 5 e 6 (solo argiloso), quando avaliado em H_2O .

Cada frasco teve o *B. subtilis* (10^4 UFC/g de solo argiloso e 10^5 UFC/g de solo artificial) adicionado de acordo com o tratamento presente na identificação, sendo: encapsulado, livre e controle (livre mais a formulação de amido). Após a inoculação, o solo foi misturado individualmente com espátulas autoclavadas e todo o processo foi feito dentro da capela de fluxo laminar para evitar contaminações externas. Depois de finalizada essa etapa, os potes foram

levemente rosqueados para manter aeração e distribuídos dentro de uma caixa plástica do tipo organizadora, contendo uma pequena faixa de água para manter a umidade desejada, essa caixa foi então fechada e acondicionada dentro de uma incubadora ajustada na temperatura programada (Figura 5).



Figura 5. Disposição dos pequenos potes contendo solo dentro de uma caixa do tipo organizadora para manter a umidade, acondicionados em incubadora.

Os quatro experimentos variaram em tipo de solo, temperatura, salinidade, duração e tipo de inoculação (Tabela 1).

Tabela 1. Experimentos realizados nos solos artificial e argiloso.

Solo	Duração	Tratamento	Temperatura	Salinidade
Artificial	21 dias	Microrganismo livre	40 °C	0 mM
		Encapsulado		
		Controle		
Artificial	21 dias	Microrganismo livre	15, 30 e 45 °C	0, 10 e 20 mM
		Encapsulado		
Argiloso	07 dias	Microrganismo livre	30 °C	0, 10 e 20 mM
		Encapsulado		
		Controle		
Argiloso	07 dias	Microrganismo livre	30 °C	0, 100 e 200 mM
		Encapsulado		
		Controle		

2.6.5 Determinação da abundância do *Bacillus subtilis* 2084

Para determinar a abundância do *Bacillus subtilis*, amostras de 1 g de solo foram coletadas de acordo com a duração de cada experimento, aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação, dissolvidas em 10 mL de solução salina 0,85 % (Figura 6) e submetidas a agitação de 150 rpm, a 30° C por uma hora em uma incubadora shaker (Wu et al., 2012). Em seguida, foi realizada a diluição seriada das amostras, e as bactérias viáveis foram contadas usando a técnica de espalhamento em placas de ágar nutriente que ficaram incubadas a 26 °C por 24 horas. Amostras em duplicata analítica e biológica foram examinadas em cada tempo de amostragem. Os solos foram avaliados em diferentes tempos para que fosse possível determinar a abundância da cepa com mais acurácia.

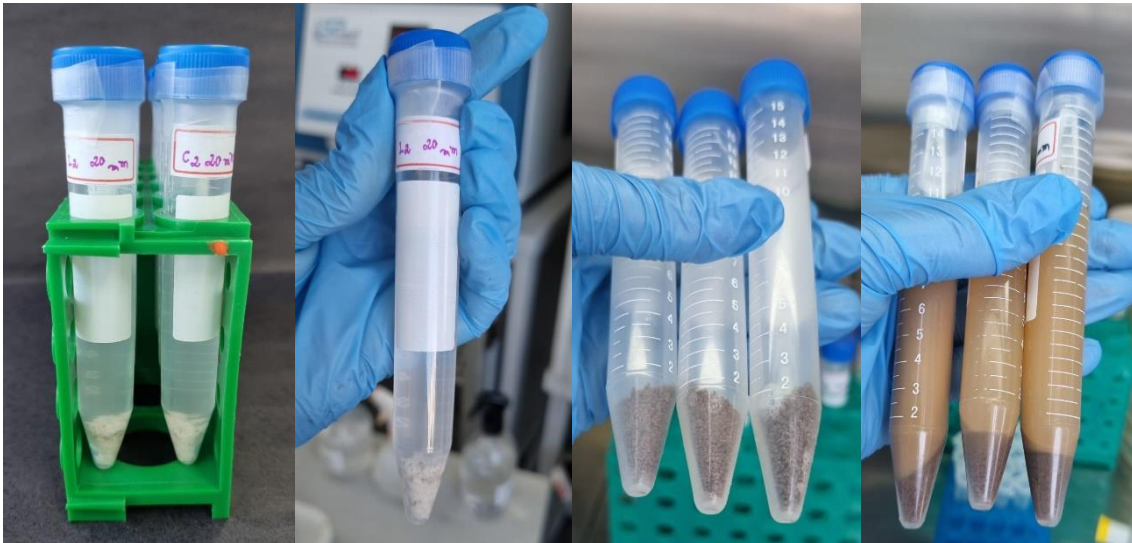


Figura 6. Tubos de ensaio de 15 mL contendo 1 g de solo artificial e argiloso dissolvido em 10 mL solução salina 0,85 % para posterior extração de *B. subtilis*.

Para determinar a UFC/g da massa de solo colocada na extração foi feito o cálculo a partir da Equação 6 para cada unicata contabilizada.

$$M.O. \text{ extraído (UFC/g)} = \frac{N^{\circ} \text{ da contagem de colônias (UFC)} * FD * \text{diluição da contagem} * LD}{\text{Massa seca do material colocado na extração (g)}} \quad (6)$$

Em que:

FD = fator de diluição (1/mL);

LD = volume do líquido de extração (mL).

2.7 Viabilidade do inoculante microbiano encapsulado após o armazenamento

O pó produzido a partir do encapsulamento do *B. subtilis* 2084 foi estocado em um tubo Falcon de 50 mL e armazenado em temperatura ambiente por um ano. Para avaliar a viabilidade e tempo de prateleira do material produzido, foi feita uma liberação de 1 g do pó em 50 mL de solução salina 0,85 % por 2 horas a 30 °C e 250 rpm. Em seguida, foi feita a diluição seriada dos respectivos materiais e inoculada em meio TSB e ágar bacteriológico por 24 h a 26 °C para contar as colônias formadas.

O cálculo para determinar a UFC/g do inoculante microbiano encapsulado produzido foram feitos a partir da Equação 7 para cada unicata contabilizada.

$$M.O. \text{ extraído (UFC/g)} = \frac{N^{\circ} \text{ da contagem de colônias (UFC)} * FD * \text{diluição da contagem} * LD}{\text{Massa seca do material colocado na extração (g)}} \quad (7)$$

Em que:

FD = fator de diluição (1/mL);

LD = volume do líquido de extração (mL).

A extração e o cálculo foram feitos no dia em que o composto fertilizante foi produzido e após um ano de armazenamento.

2.8 Análises estatísticas

Os dados da análise de sobrevivência do microrganismo nos solos foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey a um nível de confiança de 95 %, utilizando o software Origin 9.8.

Capítulo 3 - Resultados e Discussão

3.1 Caracterizações

A caracterização dos materiais puros e do inoculante microbiano produzido (Figura 7) foi realizada para a melhor compreensão de sua natureza. Logo, as principais fases cristalinas foram investigadas por Difratoimetria de Raios-X (Figura 8) e a morfologia do inoculante foi observada por Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (Figura 9).



Figura 7. Inoculante microbiano seco em estufa e em pó.

3.1.3 Difração de Raios-X (DRX)

A Figura 8 ilustra os padrões de DRX do amido, da rocha bayóvar e da formulação obtida com o *B. subtilis*. O padrão referente ao amido já é bem estabelecido e está de acordo com outros trabalhos da literatura (Manek et al., 2012; Todica et al., 2016). Já o padrão do mineral bayóvar apresentou duas fases cristalinas principais, referentes a alfa-quartzo (SiO_2 , PDF2 file #01-089-8934) e uma fase fluorapatita rica em fosfato ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$, PDF2 file #01-087-2462). As mesmas fases foram identificadas no trabalho de Klaic et al. (2017) que foi usado como base para a produção do inoculante. Além disso, foi possível observar que as partículas de bayóvar foram distribuídas com sucesso na matriz

de amido uma vez que o padrão da formulação é bastante semelhante ao da rocha.

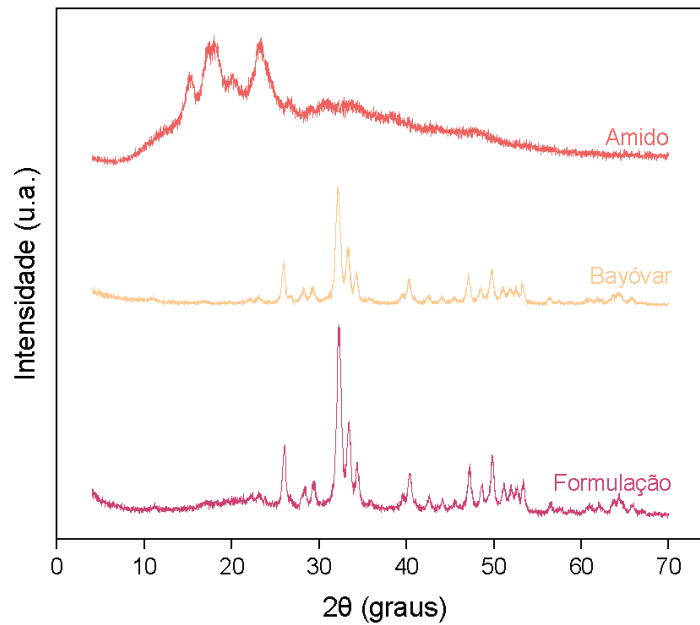


Figura 8. Padrões de DRX do amido, rocha bayóvar e da formulação.

3.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Figura 9 apresenta a morfologia do inoculante produzido. Foi possível observar um material com partículas soltas e não homogeneidade no tamanho destas partículas. Além da presença de rugosidade na superfície do inoculante.

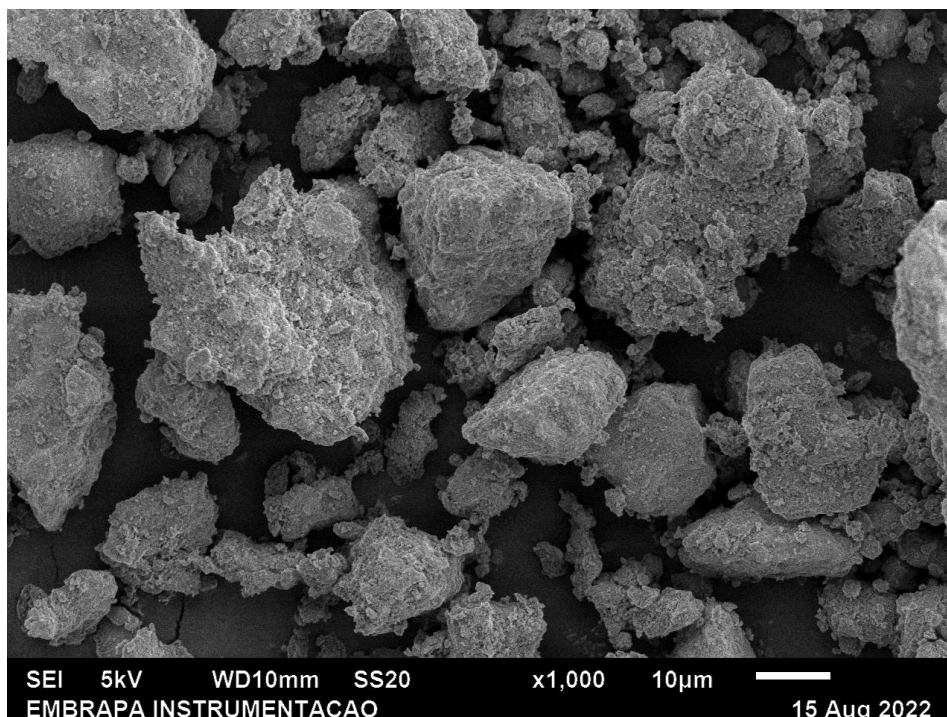


Figura 9. Micrografia por microscopia eletrônica de varredura do inoculante microbiano encapsulado.

3.1.3 Caracterização química e física dos solos artificial e argiloso

Dados fornecidos pelo Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Solos e Recursos Ambientais do Instituto Agrônomo (IAC) auxiliaram na interpretação e análise dos resultados obtidos na caracterização química e física dos solos artificial e argiloso. Para ambos os solos o pH foi determinado em solução 0,01 mol/L de cloreto de cálcio, que possibilita resultados mais consistentes do que os obtidos com H₂O, que é um procedimento que pode ser afetado pela presença de sais (Raij et al., 2001).

Os resultados na análise do solo artificial (Tabela 2) mostram que ele apresenta um pH com acidez muito baixa (>6) e saturação por bases alta (71-90 %), parâmetros correlacionados. Quanto aos micronutrientes, os resultados indicam teor médio de cobre (0,3-0,8), ferro (5-12) e manganês (1,3-5) e baixo nível de zinco (0-0,5). A classificação para o P_{resina} é baseada na adubação recomendada para culturas perenes, e para o solo artificial ele é considerado baixo (6-12). Esse solo foi produzido como um modelo com o intuito de fornecer

as condições necessárias para o desenvolvimento do *Bacillus subtilis* 2084 a fim de avaliar condições de estresse com menos variáveis. Sendo assim, o solo é rico em quantidade de nutrientes como o cálcio, por exemplo.

No Brasil predominam os latossolos e argissolos (58 % da área), essas classes de solos são conhecidas por serem ácidos e de baixa fertilidade natural (Embrapa Solos, 2011). O solo argiloso (Tabela 2) é o mais próximo da realidade que encontramos na maior parte do Brasil, pois apresenta pH com acidez muito alta (até 4,3) e saturação por bases baixa (26-50 %). Quanto aos micronutrientes, os resultados indicam alto teor de cobre (>0,9) e ferro (>12), e médio teor de manganês (1,3-5) e zinco (0,6-1,2). O valor obtido para o P_{resina} foi considerado muito baixo (0-5).

Tabela 2. Propriedades químicas e físicas dos solos estudados.

Solo	pH ¹	M.O.	K _{resina}	Ca	Mg	H+Al	CTC ²	V ³	P _{resina}	Zn	Cu	Fe	Mn	Areia	Silte	Argila
	CaCl ₂	g dm ⁻³		mmol _c dm ⁻³			%		mg dm ⁻³	g kg ⁻¹	
Artificial	7,4	6	1,2	46	20	10	77	87	10	0,2	0,8	10	2,2	774	94	132
Argiloso	4,3	13	1,3	9	2	35	47	26	4	0,6	0,9	14	2	663	34	303

¹ pH = determinado em CaCl₂

² Capacidade de troca catiônica

³ Porcentagem de saturação de base do solo

3.2 Experimento preliminar em solo artificial

Inicialmente, foi realizado um ensaio preliminar em solo artificial incubado a 40 °C, para observação do desempenho do microrganismo na forma livre, encapsulado e controle (livre com formulação de amido). Os resultados obtidos após os sete, quatorze e vinte e um dias de inoculação encontram-se na Figura 10.

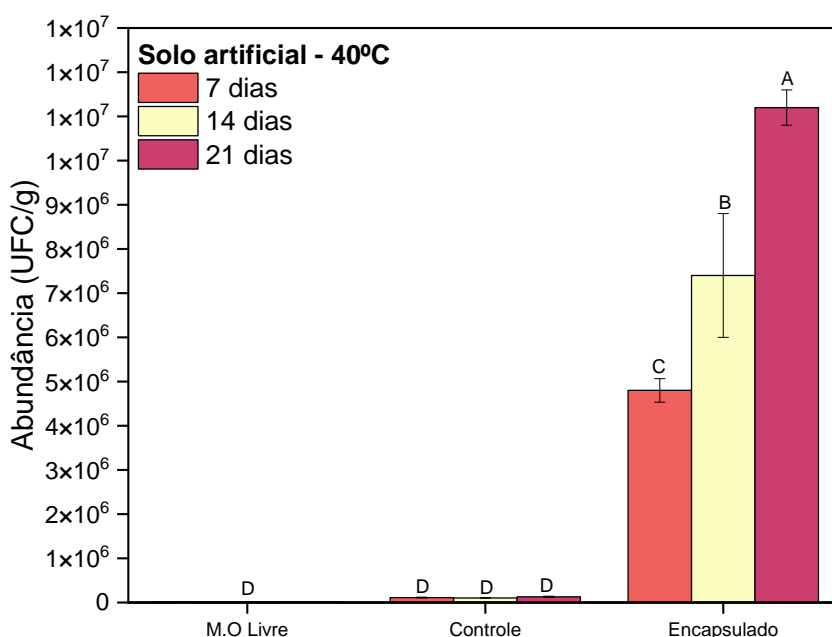


Figura 10. Abundância do *B. subtilis* (UFC/g) em solo artificial, nos tratamentos livre, controle e encapsulado, após os 7, 14 e 21 dias de inoculação.

*Valores seguidos de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de média Tukey ($p < 0,05$).

Verificou-se diferença significativa do tratamento encapsulado em relação aos demais tratamentos durante os 21 dias de experimento. E foi possível observar um aumento na proteção do *B. subtilis* permitindo o crescimento do microrganismo encapsulado com o passar dos dias. Aumento esse que corrobora com os dados encontrados na literatura sobre os efeitos desta técnica em promover uma liberação controlada uniforme e gradual das células (Kim et al., 2012; Bashan et al., 2016). O resultado do tratamento encapsulado foi 785,05

vezes maior que o livre e 86,59 vezes maior que o livre mais formulação de amido em 21 dias.

O amido contém grânulos em sua estrutura interna que faz com que ele seja capaz de transportar nutrientes e microrganismos (Qi & Tester, 2019), características que o qualifica como um importante aditivo durante o processo de encapsulamento. O bom desempenho desse aditivo descrito na literatura (Klaic et al, 2017a; Klaic et al., 2021, Lopes et al, 2023) levantou a hipótese de que somente a presença do amido no solo também poderia fornecer ao *B. subtilis* uma maior fonte nutricional e de energia para o seu desenvolvimento, mesmo não passando pelo processo de encapsulamento. No entanto, analisando os resultados, o tratamento que continha o microrganismo livre acompanhado da formulação, contendo amido, bayóvar e glicerol, não obteve crescimento semelhante ao encapsulado, apresentando valores inferiores de proteção. O que evidencia a efetividade do encapsulamento quando associado a bons aditivos como o amido.

Dentre os objetivos desejados para se obter um bom inoculante microbiano está o transporte do microrganismo juntamente com os nutrientes, assim como o estabelecimento de um ambiente favorável para que esse microrganismo se desenvolva e se multiplique (Klaic et al., 2021). E através desses resultados preliminares, constatou-se que a formulação produzida apresentou potencial em transportar os nutrientes junto ao *B. subtilis* para se adaptar ao solo e proliferar, mesmo que em uma porcentagem inferior à da inoculação.

3.3 Inoculação no solo artificial

Dado o bom desempenho do microrganismo inoculado nos experimentos preliminares, nesta etapa foram avaliadas duas situações de estresse, salinidade e temperatura, visando analisar como elas influenciam no desenvolvimento do *B. subtilis* no solo artificial. O ensaio foi dividido por temperaturas (15, 30 e 45 °C) e submetidos a três níveis de salinidade (0, 10 e 20 mM). Para cada conjunto de temperatura e salinidade, o desempenho do microrganismo em sua forma

livre e encapsulada foram avaliados. As Figuras 11, 12 e 13 apresentam os resultados dessa etapa.

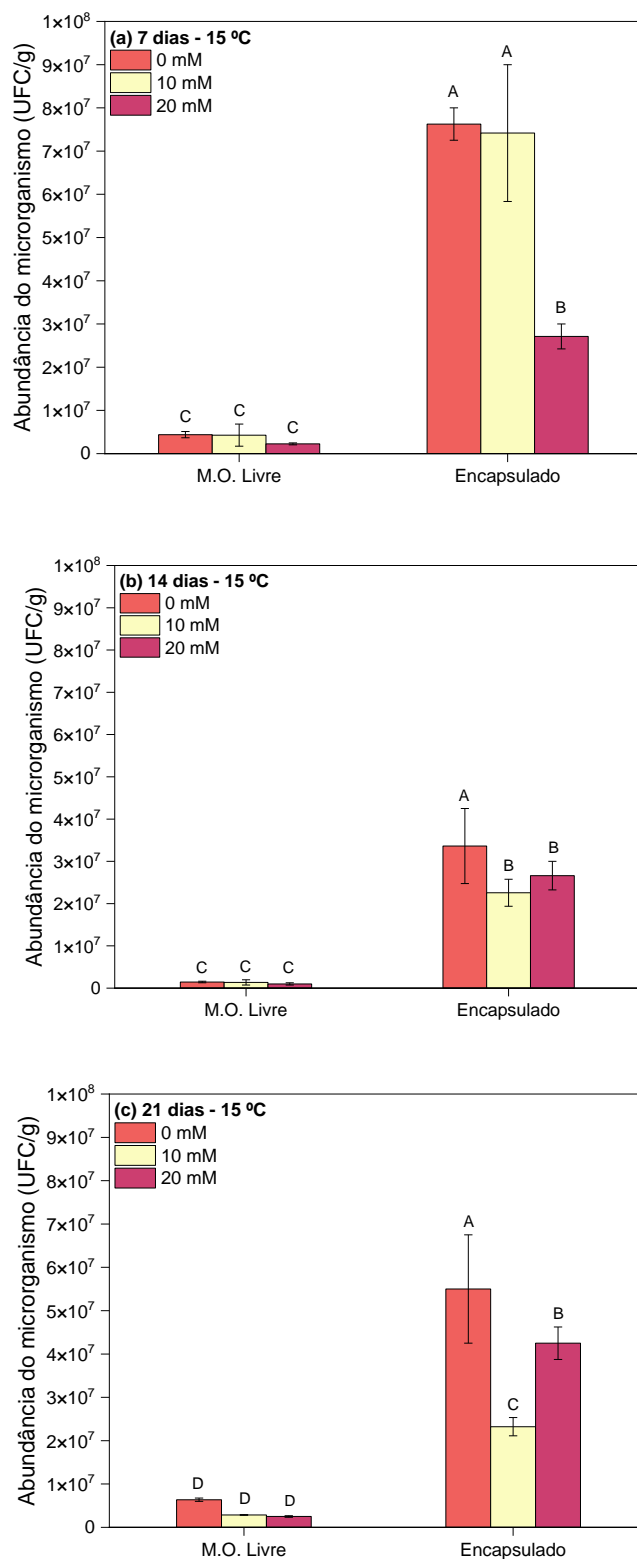


Figura 11. Abundância do *B. subtilis* (UFC/g) em solo artificial, nos tratamentos livre e encapsulado, em diferentes níveis de salinidade (0 mM, 10 mM e 20 mM de NaCl) a 15 °C em diferentes tempos. a) 7 dias, b) 14 dias e c) 21 dias.

*Valores seguidos de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de média Tukey ($p < 0,05$)

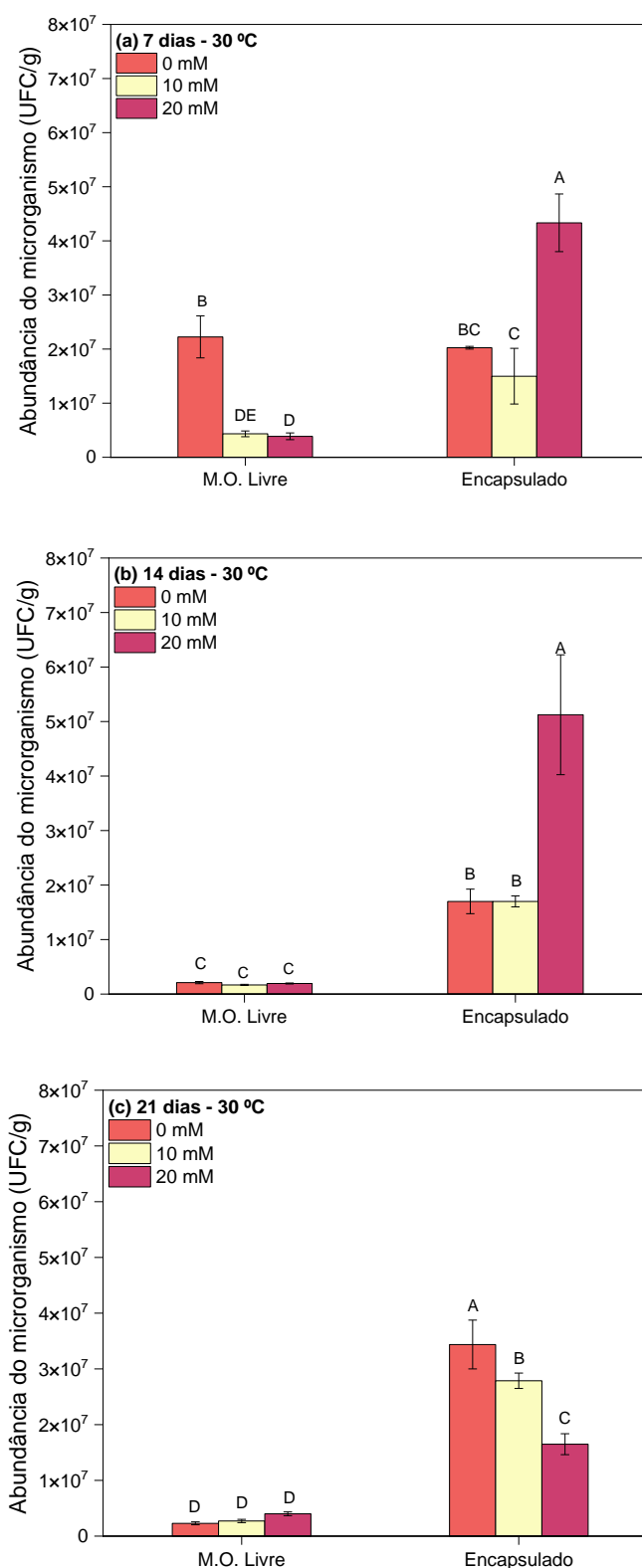


Figura 12. Abundância do *B. subtilis* (UFC/g) em solo artificial, nos tratamentos livre e encapsulado, em diferentes níveis de salinidade (0 mM, 10 mM e 20 mM de NaCl) a 30 °C em diferentes tempos. a) 7 dias, b) 14 dias e c) 21 dias.

*Valores seguidos de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de média Tukey ($p < 0,05$)

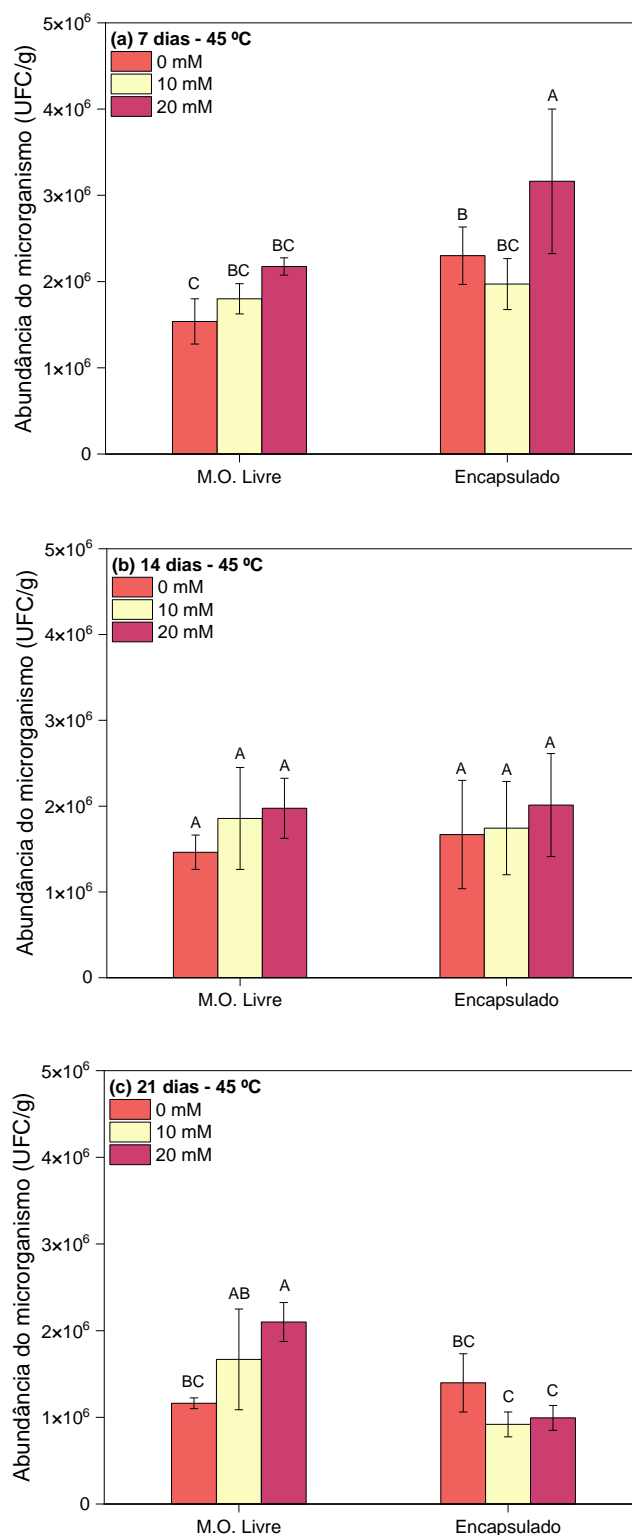


Figura 13. Abundância do *B. subtilis* (UFC/g) em solo artificial, nos tratamentos livre e encapsulado, em diferentes níveis de salinidade (0 mM, 10 mM e 20 mM de NaCl) a 45 °C em diferentes tempos. a) 7 dias, b) 14 dias e c) 21 dias.

*Valores seguidos de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de média Tukey ($p < 0,05$)

Nos ensaios em 15 °C (Figura 11 a-c) foi possível observar que o encapsulamento conseguiu oferecer maior proteção ao microrganismo em comparação ao livre, sendo diferentes significativamente. O melhor desempenho para o material encapsulado foi obtido no solo sem estresse salino (0 mM). Para salinidade 0 mM, os valores de $7,63 \times 10^7$; $3,36 \times 10^7$ e $5,5 \times 10^7$ aos 7, 14 e 21 dias respectivamente, foram alcançados. No solo com salinidade de 10 mM, houve uma colonização do *B. subtilis* muito alta nos primeiros 7 dias ($7,42 \times 10^7$), mas depois esse desenvolvimento caiu para $2,26 \times 10^7$ aos 14 dias e $2,32 \times 10^7$ aos 21 dias. Já na maior salinidade (20 mM), o nível de proteção aumentou com o passar do tempo. Nos primeiros 7 dias a abundância na colonização foi de $2,71 \times 10^7$, aos 14 dias decaiu para $2,66 \times 10^7$, chegando a $4,25 \times 10^7$ aos 21 dias, o que pode ser considerado um alto nível de proteção ao microrganismo.

Em 30 °C, o resultado obtido também mostrou um melhor desempenho do material encapsulado quando comparado ao livre (Figura 12 a-c). O ensaio sem estresse salino (0 mM) apresentou uma leve queda da sobrevivência em 14 dias (de $2,03 \times 10^7$ para $1,70 \times 10^7$) seguido de um aumento na colonização do microrganismo aos 21 dias ($3,44 \times 10^7$). Para 10 mM, os valores observados foram $1,5 \times 10^7$, $1,7 \times 10^7$ e $2,79 \times 10^7$, enquanto para 20 mM, houve uma queda mais expressiva das UFC ao longo do tempo, para 7, 14 e 21 dias respectivamente ($4,33 \times 10^7$, $5,13 \times 10^7$ e $1,65 \times 10^7$). É importante salientar que neste ensaio, em 14 dias, foi observado uma maior abundância do *B. subtilis* no tratamento com 20 mM de salinidade em comparação com os demais. Isso indica um importante efeito de proteção térmica inicial da matriz na situação mais drástica de estresse avaliada, em uma temperatura mais próxima da temperatura ambiente e, portanto, hipoteticamente mais próxima de condições reais de aplicação. Neste ensaio, apesar do *B. subtilis* ter apresentado uma menor abundância, com relação a temperatura de 15 °C do material encapsulado, ainda assim foram observados bons valores de abundância, evidenciando sua capacidade de proteção térmica do microrganismo conferida pelo encapsulamento.

Em contrapartida os tratamentos em 45 °C (Figura 13 a-c) apresentaram resultados de abundância similares entre o microrganismo livre e encapsulado

durante os 21 dias de experimento, diferindo significativamente apenas no dia 7 e apresentando um desempenho inferior ao livre aos 21 dias. A maior proteção do microrganismo encapsulado ($3,16 \times 10^6$) foi observada na salinidade 20 mM em 7 dias enquanto a colonização do microrganismo livre não ultrapassou $2,18 \times 10^6$ ao longo de todo o ensaio. Esse resultado evidencia que a temperatura é um fator que influenciou diretamente no desenvolvimento do microrganismo neste ensaio.

De forma geral, a partir dos resultados apresentados foi possível observar que tanto a salinidade como a temperatura influenciaram significativamente os tratamentos avaliados. O efeito da salinidade foi mais visível nos ensaios a 15 °C e 30 °C em que, em ambos os casos, houve uma maior proteção do *B. subtilis* encapsulado em comparação ao microrganismo livre. Assim, os valores obtidos de abundância do *Bacillus* nessas temperaturas, mostraram um efeito positivo do encapsulamento na proteção do microrganismo. Já com relação à temperatura, os tratamentos a 45 °C evidenciaram que, tanto o microrganismo livre como o encapsulado, ficaram suscetíveis as condições mais estressantes, não sendo observada a proteção obtida nos demais tratamentos. Em contrapartida, os resultados em 15 °C e 30 °C se mostraram bastante promissores com relação à sobrevivência e abundância do microrganismo nas condições avaliadas.

3.4 Inoculação no solo argiloso

Em sequência aos experimentos nas diferentes condições de estresse avaliadas em solo artificial, foi realizado um novo ensaio avaliando novamente três salinidades (0, 10 e 20 mM), a 30 °C, dessa vez em solo argiloso, para avaliar o desempenho do microrganismo livre, encapsulado e um tratamento controle, que consistiu na inoculação do microrganismo livre mais a adição da formulação de amido. Logo, os resultados da abundância do *B. subtilis* (UFC/g) analisados após os sete dias de inoculação em solo argiloso encontram-se na Figura 14. E o resultado da abundância do microrganismo em placas com meio

de cultura TSB e ágar bacteriológico, após 7 dias de inoculação está presente na Figura 15.

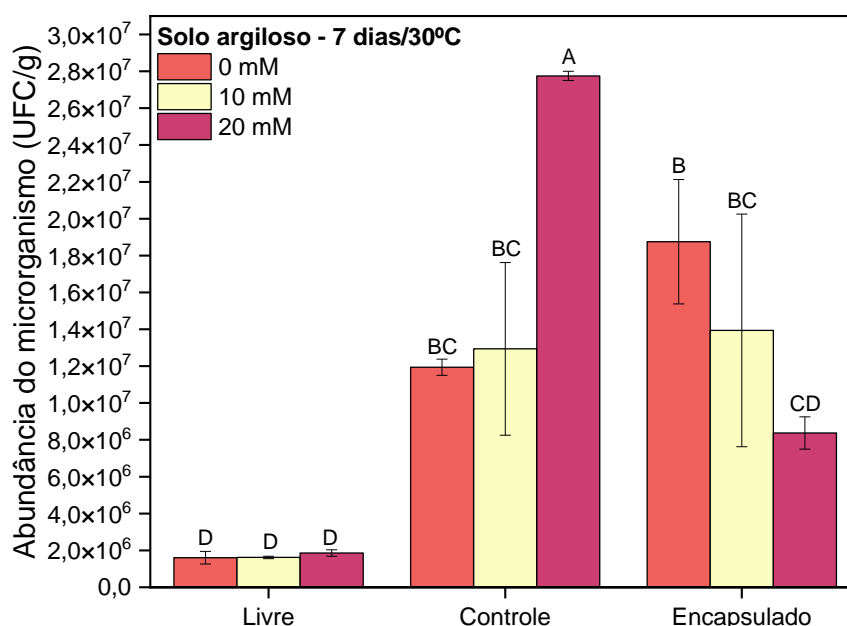


Figura 14. Abundância do *B. subtilis* (UFC/g) em solo argiloso, nos tratamentos livre, controle e encapsulado, em diferentes níveis de salinidade (0 mM, 10 mM e 20 mM de NaCl) após os 7 dias de inoculação.

*Valores seguidos de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de média Tukey ($p < 0,05$).

A partir dos resultados apresentados no gráfico presente na Figura 14, podemos constatar que diferente do que foi observado anteriormente, o tratamento encapsulado não se mostrou estatisticamente diferente do tratamento controle em 0 mM e 10 mM, e em 20 mM com relação aos dois tratamentos com microrganismo livre. Nesse ensaio, o melhor desempenho foi do controle em 20 mM ($2,78 \cdot 10^7$ UFC/g), que diferiu significativamente dos demais tratamentos.

Apesar do encapsulado não se mostrar diferente significativamente, um dado interessante sobre esse ensaio é que o *B. subtilis* cresceu ao longo dos sete dias, visto que ele foi adicionado na concentração de 3×10^4 UFC/g de solo e na extração final ele atingiu os valores de $1,88 \cdot 10^7$ UFC/g em 0 mM; $1,39 \cdot 10^7$ UFC/g em 10 mM e $8,38 \cdot 10^6$ UFC/g em 20 mM. Sendo maior que o tratamento

com o microrganismo livre em 11,67 vezes (0 mM); 8,61 vezes (10 mM) e 4,5 vezes (20 mM).

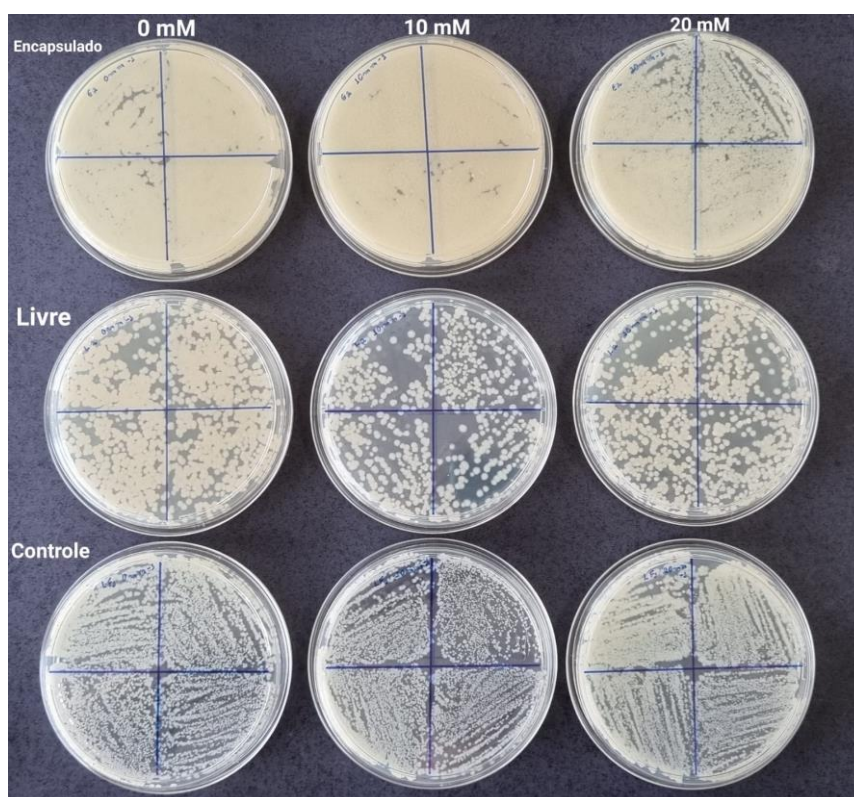


Figura 15. Abundância do *B. subtilis* em placas de petri em meio TSB e ágar bacteriológico após a extração do solo com 7 dias de inoculação. Tratamentos encapsulado, livre e controle submetidos ao estresse por salinidade nas concentrações de NaCl 0, 10 e 20 mM. Diluição seriada 10^{-1} em todas as placas.

Na Figura 15 é possível visualizar a abundância do *B. subtilis* encapsulado em comparação aos demais tratamentos. Assim como é possível observar que há uma diminuição dessa abundância conforme há o aumento do nível de NaCl presente no solo, assim como podemos observar nos resultados mostrados na Figura 14.

Um estudo de revisão feito por Rath & Rousk (2015) relata que o aumento das concentrações de sal no ambiente também aumenta a osmolaridade fora da célula microbiana, conforme a concentração externa de sal aumenta, a célula perde água. Altas salinidades ($> 4 \text{ dS m}^{-1}$) costumam estar associadas a baixa disponibilidade de água, e ambos os fatores influenciam no potencial total de água no solo, que afeta diretamente na microbiota desse ambiente, pois com

pouca água disponível os microrganismos passam pelo processo de desidratação.

A queda na colonização do microrganismo não necessariamente acontece pelo estresse direto à salinidade causado na célula microbiana, em algumas situações pode ser pela disponibilidade da matéria orgânica no solo, ou pela baixa disponibilidade de carbono, prejudicando a respiração (Rath & Rousk, 2015). E uma consideração importante é que o tipo de sal utilizado influencia nos resultados de estresse obtidos em diferentes pesquisas.

Wu et al., 2012, avaliou o efeito da salinidade (50, 100, 150 e 200 mM) na liberação da *Raoultella planticola* Rs-2 encapsulada em uma esfera de matriz de alginato, amido e bentonita no solo durante 60 dias a 20 °C, com umidade de 40 %. E os resultados obtidos demonstraram que a liberação das células bacterianas foi similar em todos os solos testados, alcançando $2,78 \times 10^{11}$ UFC/g de solo em 100 mM de sal e $1,55 \times 10^{12}$ UFC/g de solo com 150 mM de sal em 15 dias de experimento. No entanto, a liberação foi bem mais lenta na maior salinidade (200 mM) em vários intervalos de tempo.

Guo et al., 2012, avaliaram o efeito da inoculação de uma co-cultura de bactérias *Klebsiella oxytoca* Rs-5 e BCL-8 (mistura dos *Bacillus subtilis* SL-13, SL-14 e SL-44) livres e encapsuladas na promoção de crescimento do algodão, proteção do estresse causado a essa cultura pela salinidade (120 mM NaCl) do solo e atenuação do crescimento do fungo *Rizoctonia solani*. Dentre os resultados, eles observaram que a riqueza de espécies na microbiota do solo a partir do tratamento com a co-cultura de bactérias encapsuladas foi maior do que a observada no livre. Ao final do experimento, constataram que a eficiência na colonização de espécies bacterianas do tratamento encapsulado era similar à do solo não estressado com o sal, destacando assim, a efetividade do encapsulamento na colonização de espécies bacterianas mesmo em condições de estresse.

Nesse sentido, as informações encontradas na literatura mostram que a presença de sal causa estresse ao microrganismo, influenciando em seu desenvolvimento e na saúde do solo. Em contrapartida, os dados obtidos nesse

experimento, quando se compara o tratamento encapsulado com o livre, mostram que o encapsulamento pode promover uma melhor proteção ao *B. subtilis* para enfrentar essa condição adversa e assim se desenvolver com mais eficiência e proporcionar uma maior produtividade às culturas.

3.5 Inoculação no solo argiloso em alta salinidade

Após avaliar os resultados obtidos no ensaio em solo argiloso e artificial com o *B. subtilis* nas salinidades de 0, 10 e 20 mM, constatou-se que seria interessante fazer um novo ensaio no solo argiloso em níveis de salinidade mais extremas, de 100 e 200 mM.

Esse experimento seguiu os mesmos passos do ensaio anterior, mas com a alteração das concentrações de NaCl (0, 100 e 200 mM). Os resultados da abundância do *B. subtilis* (UFC/g) analisados após os sete dias de inoculação em solo argiloso encontram-se na Figura 16.

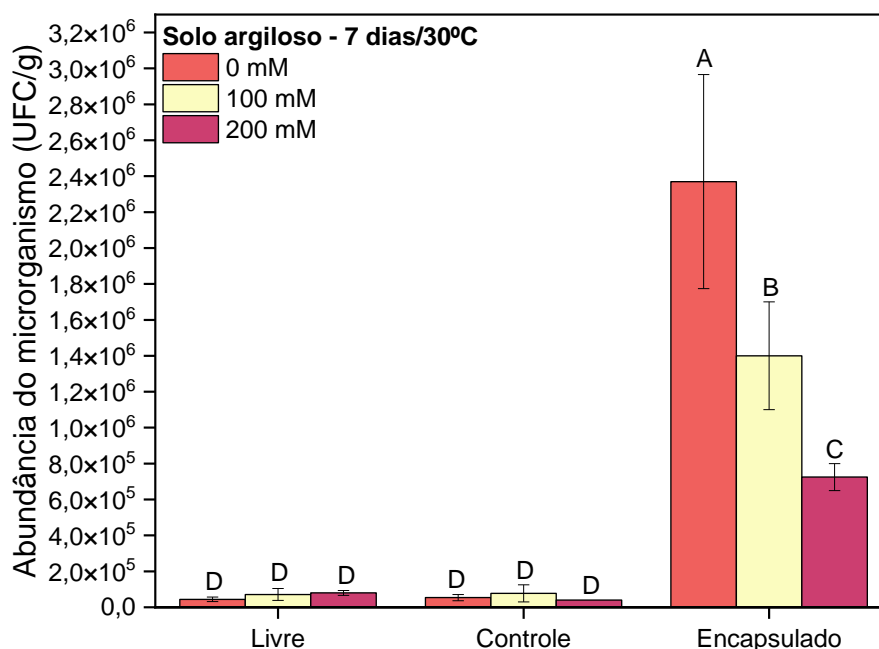


Figura 16. Abundância do *B. subtilis* (UFC/g) em solo argiloso, nos tratamentos livre, controle e encapsulado, em diferentes níveis de salinidade (0 mM, 100 mM e 200 mM de NaCl) após os 7 dias de inoculação.

*Valores seguidos de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de média Tukey ($p < 0,05$).

Os resultados mostram que seguindo o que foi observado nos experimentos anteriores, o microrganismo encapsulado apresentou uma abundância maior em comparação aos demais tratamentos. Evidenciando que mesmo em condições altas de estresse por salinidade, o *B. subtilis* continua tendo uma melhor proteção e sobrevivência no solo.

Nesse ensaio era esperado obter diferença significativa entre os níveis de salinidade, visto que as condições eram mais extremas que as avaliadas anteriormente. E através do gráfico apresentado (Figura 16) fica evidente que conforme houve o aumento de NaCl, a abundância do microrganismo diminuiu, diferindo significativamente os três níveis de salinidade. No entanto, a proteção do *B. subtilis* encapsulado foi evidentemente superior (acima de 9 vezes, mesmo em 200 mM) aos tratamentos com inoculação livre e controle, mesmo tendo um declínio no seu desenvolvimento conforme houve o aumento da salinidade.

Rousk et al., (2011b) analisou a relação entre a tolerância as concentrações de sal *in situ* (entre 0 e 400 mM NaCl) com a tolerância microbiana ao sal (entre 0 e 640 mM NaCl) com adição de matéria orgânica em diversos solos salinos da Líbia, e seus dados mostraram que nas concentrações de NaCl mais altas (400 e 640 mM) a inibição do crescimento dos microrganismos foi superior a 90 % em todos os solos.

Considerando a quantidade de microrganismo adicionado no solo (3×10^4 UFC/g de solo), houve crescimento do *B. subtilis* ao longo dos sete dias, visto que em 0 mM de NaCl o tratamento encapsulado apresentou aumento em 79 vezes; para 100 mM o encapsulado apresentou um aumento em 47 vezes; e em 200 mM o encapsulado se apresentou superior em 24 vezes.

Assim como nos ensaios preliminares em solo artificial, a hipótese de que a presença do amido poderia proporcionar um melhor desempenho no desenvolvimento do microrganismo livre a partir da adição da formulação contendo amido, fosfato de rocha bayóvar e glicerol no solo, também se mostrou ineficiente nesse experimento. Os resultados mostram que esse aditivo não conferiu um desenvolvimento melhor (controle: 0 mM: $5,81 \times 10^4$; 10 mM: $7,75 \times 10^4$ e 20 mM: 4×10^4) com relação ao *B. subtilis* livre (0 mM: $4,42 \times 10^7$; 10 mM: $7,13 \times 10^4$ e 20 mM: 8×10^4), apresentando resultados semelhantes e não

diferindo significativamente. Sendo assim, ele não atingiu o nível de sucesso obtido com o processo de encapsulamento, evidenciando que o uso do amido como aditivo confere proteção ao microrganismo, graças à adesão celular aos seus grânulos, proporcionando proteção mecânica das células bacterianas, além de promover um suporte nutricional, influenciando em uma multiplicação no número de células (Bashan, et al., 2002; Vassilev, et al., 2020).

Estudos realizados em plantas que avaliaram o desempenho de microrganismos em garantir um melhor desenvolvimento e proteção quando presentes em solos com salinidades de valores aproximados aos utilizados nesse ensaio mostram o sucesso que eles podem alcançar.

Um trabalho feito por Zakavi e colaboradores (2022), estudou isolados do gênero *Bacillus* na promoção de crescimento da cultura do milho em condições de estresse por salinidade. Nos resultados, obtiveram um aumento significativo no peso seco da massa da raiz (50 %), broto (29 %), comprimento do broto (16 %) e da raiz (8 %) com a aplicação das bactérias no solo em condições de estresse (100 mM de NaCl), quando comparado com o tratamento controle sem a inoculação, mas na mesma condição de estresse. No entanto, o *B. subtilis* resultou na inibição da formação do broto, e curto comprimento do broto, comparado com o controle, dado que ressalta a importância do encapsulamento para melhorar o desempenho desse microrganismo em condições de estresse.

Abulfaraj & Jalal, 2021, estudaram o efeito de isolados de três rizobactérias, *Pseudomonas fluorescens* (M₁), *Pseudomonas putida* (M₂) e *Bacillus subtilis* (M₃), com relação ao crescimento e produção de componentes químicos de três cultivares de soja em dois níveis de estresse por salinidade, 200 mM e 400 mM. Dentre os resultados, eles constataram que os parâmetros de crescimento nos tratamentos de salinidade decaíram, principalmente em 400 mM de NaCl, mas a inoculação com as bactérias diminuiu os efeitos adversos causados pelo estresse ao NaCl nas cultivares de soja. Quanto a porcentagem final de germinação, o *B. subtilis* apresentou o melhor desempenho em reduzir os efeitos prejudiciais causados por ambas as salinidades.

Na literatura, existe relato do comportamento da inoculação do *B. subtilis* com relação a germinação de sementes (%) e crescimento das raízes (cm) do feijão comum após 8 dias em condições de estresse causado pela salinidade.

Lastochkina et al., 2021, constatou que conforme houve o aumento da concentração de NaCl (0, 85, 170 e 340 mM), conseqüentemente houve uma diminuição na porcentagem de germinação das sementes e crescimento das raízes, mas a proteção se manteve superior ao tratamento não inoculado.

Wang et al., 2018, também avaliou isolados de *Bacillus* em condições de estresse por salinidade, mas na cultura do pimentão, e explorou os níveis 0, 100, 200 e 300 mM de NaCl. A inoculação da WU-13 (*B. subtilis*) resultou em um aumento significativo no peso fresco (52,33 %), peso seco (80,66 %), altura do broto (30,49 %) e comprimento da raiz (143,12 %), comparado com os tratamentos não inoculados em condições de estresse por salinidade. Mesmo na condição extrema de 300 mM, o *B. subtilis* apresentou um bom desempenho, e teve como estratégia a indução do acúmulo de clorofila nas mudas sob estresse salino. Os principais resultados presentes no trabalho citado indicam que o alívio do estresse se deu principalmente pelo aumento na produção de prolina causado pelas bactérias, e o bom desempenho no crescimento, principalmente com relação a biomassa da raiz das mudas, se deu depois da inoculação com as cepas e estava relacionado a melhor absorção de fosfato que elas proporcionaram.

A partir desses e outros trabalhos encontrados na literatura é possível constatar que o *B. subtilis* consegue desempenhar um bom papel de promotor de crescimento vegetal em condições elevadas de salinidade e mesmo nessa condição de estresse, ele consegue ser um bom solubilizador de fosfato. Com os dados obtidos no experimento em solo argiloso com a inoculação do *B. subtilis* encapsulado pode-se esperar um desempenho ainda maior, considerando a proteção do microrganismo e o maior tempo de prateleira do inoculante microbiano encapsulado. Estudos que avaliaram o encapsulamento de outros microrganismos a partir de diferentes matrizes quanto as respostas ao estresse por NaCl obtiveram bons resultados, enfatizando o benefício do encapsulamento em promover proteção aos microrganismos e melhora no desenvolvimento das culturas.

Komal et al., 2019, avaliaram o efeito do encapsulamento da bactéria *Pantoea agglomerans* a partir de alginato e cloreto de cálcio, na atenuação dos efeitos do estresse pela salinidade (100 mM NaCl) na promoção de crescimento

do arroz durante 30 dias. Como resultado, eles observaram uma melhora significativa no crescimento da planta suplementada com o microrganismo encapsulado em comparação ao livre, com relação ao aumento do comprimento, biomassa, pigmentos fotossintéticos e diminuição no nível de prolina. O arroz com a presença da *P. agglomerans* encapsulada também teve uma diminuição na presença do sódio e aumento no nível do cálcio e potássio. O encapsulamento também promoveu uma alta colonização da bactéria nas raízes das plantas.

Maged et al., 2019, estudaram três cepas de rizobactérias, *Paenibacillus polymyxa* MSRH5, *Bacillus nakamurai* MSRH1, e *Bacillus pacificus* MSRH3 quanto ao crescimento do trigo sob estresse por salinidade, usando o alginato de sódio. As bactérias encapsuladas com o alginato foram avaliadas nas raízes de plantas de trigo através da microscopia eletrônica de transmissão. Nos resultados eles observaram que o encapsulamento preveniu a destruição da rizosfera do trigo mesmo com o estresse pela salinidade, preservando as plantas e reduzindo os efeitos prejudiciais causados pelo NaCl no solo.

Uma pesquisa publicada recentemente por Zheng et al., 2023, estudou o *Bacillus pumilus* encapsulado em matriz de PVA-AS (poli vinil álcool - alginato de sódio) na promoção do crescimento e alívio de estresse abiótico causado pela salinidade (50 mM) e a seca na *Pharbitis nil* (corda de viola ou glória da manhã). E através da inoculação com as microesferas de *B. pumilus* houve um aumento significativo no comprimento e diâmetro da raiz e haste, e também no peso seco da planta, além do aumento da população da bactéria na raiz.

3.6 Viabilidade do inoculante microbiano encapsulado após um ano de armazenamento

A Tabela 3 apresenta os resultados de viabilidade do material após um ano de armazenamento em temperatura ambiente ± 25 °C. O composto fertilizante produzido mostrou uma diminuição no seu desempenho em UFC/g, caindo da ordem de 10^{10} para 10^7 UFC/g comparado com o valor inicial do material. Apesar da redução em três ordens de magnitude, ele ainda apresenta uma elevada quantidade de microrganismos e está dentro dos valores pré-

determinados no presente projeto para aplicação no solo artificial ($1,5 \times 10^7$) e no solo argiloso ($1,5 \times 10^6$).

Para avaliar melhor a viabilidade do inoculante, seria interessante ter mais dados, como aos seis meses, por exemplo, para assim acompanhar o desenvolvimento do microrganismo ao longo do tempo, principalmente porque segundo dados obtidos do MAPA (Ministério da Agricultura e Pecuária), 2011, na legislação brasileira, inoculantes a partir de rizobactérias devem atender a concentração mínima de 10^9 células viáveis por grama⁻¹ ou mL⁻¹ por pelo menos seis meses (Hungria et al., 2020).

Tabela 3. Viabilidade do compósito fertilizante encapsulado (UFC/g) após um ano de armazenamento.

Armazenamento	0 meses (UFC/g)	1 ano (UFC/g)
Formulação encapsulada	$3,40 \times 10^{10} \pm 1,6 \times 10^9$	$2,44 \times 10^7 \pm 6,05 \times 10^6$

Capítulo 4 - Conclusões

As avaliações dos ensaios conduzidos tanto em solo artificial quanto no argiloso mostraram que o inoculante microbiano produzido à base de *Bacillus subtilis* 2084 encapsulado em matriz polimérica de amido apresenta um grande potencial de aplicação no solo para garantir a proteção das culturas frente a condições abióticas, como salinidade e temperatura, garantindo assim a proteção do microrganismo encapsulado e sua efetividade em promover a solubilização de fosfato e consequente desenvolvimento da planta de interesse.

O bom desempenho do *B. subtilis* encapsulado foi evidente em todos os ensaios, quando comparado com o microrganismo na condição livre, mesmo estando submetido aos estresses por temperatura e salinidade. No solo artificial em 7 dias a 15 °C, o resultado do microrganismo encapsulado foi superior ao livre em 17,35 vezes em 0 mM, 17,33 vezes em 10 mM e 11,99 vezes em 20 mM. Em 14 dias, houve um maior aumento, pois o encapsulado foi 23,12 vezes maior que o livre em 0 mM, 16,71 vezes em 10 mM e 26,63 vezes em 20 mM. E

em 21 dias, a abundância do *B. subtilis* encapsulado se manteve superior, sendo 8,63 vezes maior que o livre em 0 mM, 8,16 vezes maior em 10 mM e 16,96 vezes em 20 mM.

No solo argiloso em 7 dias a 30 °C, o tratamento encapsulado chegou a ser 54 vezes maior que o livre em 0 mM de sal, 20 vezes maior em 100 mM e 9 vezes em 200 mM, se mostrando muito eficiente mesmo em altas concentrações de salinidade.

Os dados dos experimentos que foram submetidos a 40 e 45 °C apresentaram os resultados mais baixos de abundância do microrganismo encapsulado, chegando a 10^5 , enquanto nas demais temperaturas de 15 e 30 °C esse parâmetro se manteve em 10^7 ao longo dos 21 dias. Mas mesmo apresentando valores mais baixos de abundância, em 40 °C o *B. subtilis* encapsulado foi 418 vezes maior que o livre em 7 dias, 616 vezes maior em 14 dias e 785 vezes maior em 21 dias.

A salinidade diminuiu o nível de proteção oferecida ao microrganismo pelo encapsulamento pois houve um aumento em sua concentração tanto no solo argiloso quanto no solo artificial a 15 °C e a 30 °C a partir de 14 dias, mas mesmo assim essa proteção se manteve superior ao *B. subtilis* livre e controle. Na maior concentração de NaCl (200 mM), o microrganismo encapsulado obteve um crescimento 24 vezes maior que o adicionado inicialmente no solo argiloso (3×10^4 UFC/g), enquanto o livre teve um crescimento de apenas 2,67 vezes. No solo artificial, aos 21 dias em 15 °C, o *B. subtilis* encapsulado cresceu 293 vezes em 0 mM, 124 vezes em 10 mM e 227 vezes em 20 mM com relação a quantidade de microrganismos adicionada ao solo no momento da inoculação (3×10^5 UFC/g). E em 30 °C, esse crescimento se mostrou superior em 183 vezes em 0 mM, 149 vezes em 10 mM e 88 vezes em 20 mM.

Quanto a viabilidade do inoculante microbiano encapsulado, ele apresentou um bom resultado considerando o período de um ano de armazenamento sem o controle de temperatura ou umidade. No entanto, seria necessário um ensaio mais completo, com mais extrações ao longo do tempo para obtenção de mais dados e resultados mais completos.

São muitos os estudos que buscam a produção de bons bioinoculantes, almejando encontrar formulações de sucesso que se encaixam nas características ideais, mas as pesquisas relacionadas a aplicação desses bioprodutos em diferentes tipos de solos e frente às condições ambientais adversas ainda são muito escassas. Nesse sentido, esse trabalho traz respostas interessantes e necessárias, pois ele avalia o bom desempenho do microrganismo encapsulado em dois tipos de solos e em condições de estresse por temperatura e salinidade, que são conhecidas por afetarem a saúde do solo e a produção de diversas culturas. Os resultados aqui apresentados ressaltam a importância de estudar microrganismos encapsulados na promoção da saúde do solo, principalmente quanto a ciclagem de nutrientes essenciais, em condições desfavoráveis, pois são nessas circunstâncias que é possível ter respostas mais completas sobre a eficácia do encapsulamento e quais suas contribuições para uma agricultura mais sustentável. Outras aplicações tecnológicas destas formulações aqui estudadas também podem contribuir para o sucesso dos processos de recobrimento de sementes e fertilizantes com microrganismos, levando-se em consideração a alta salinidade encontrada nestes substratos e estresses aqui estudados, dentre outros.

Capítulo 5 – Etapas futuras

Os próximos passos são avaliar a abundância do *Bacillus subtilis* encapsulado e livre em solo não esterilizado e em condições de estresse abiótico, utilizando a biologia molecular, com a técnica de qPCR para obter resultados mais completos sobre o desempenho do microrganismo encapsulado no solo e conciliar com os dados obtidos até o presente momento.

Referências

ABREU, C. S., FIGUEIREDO, J. E., OLIVEIRA, C. A., DOS SANTOS, V. L., GOMES, E. A., RIBEIRO, V. P., et al. Maize endophytic bacteria as mineral phosphate solubilizers. **Genet. Mol. Res.** 16, 2017 doi: 10.4238/gmr16019294

ABULFARAJ, A. A.; JALAL, R. S. Use of plant growth-promoting bacteria to enhance salinity stress in soybean (*Glycine max* L.) plants. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, 7, p. 3823-3834, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.03.053>

BAHADIR, P.S.; LIAQAT, F.; ELTEM, R. Plant growth promoting properties of phosphate solubilizing *Bacillus* species isolated from the Aegean Region of Turkey. **Turkish Journal of Botany**, v. 42, n. 2, p. 183-196, 2018. <https://doi.org/10.3906/bot-1706-51>

BAKER, K.F. Microbial antagonism--the potential for biological control. **Contemporary Microbial Ecology**, Academic Press, New York, p. 327-347, 1980.

BASHAN, Y.; HERNANDEZ, J.P.; LEYVA, L.A.; BACILIO, M. Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. **Biol. Fertil. Soils** 35, 359–368, 2002. <https://doi.org/10.1007/s00374-002-0481-5>

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L.E.; PRABHU, S.R. Superior polymeric formulations and emerging innovative products of bacterial inoculants for sustainable agriculture and the environment. In *Agriculturally Important Microorganisms*; Singh, H., Sarma, B., Keswani, C., Eds.; Springer: Singapore, 2016. http://doi.org/10.1007/978-981-10-2576-1_2

BELCHIOR, E. B., SOUSA, T. C. R., MOREIRA, J. M. M. A. P., AGUIAR, J. L. P., & TEIXEIRA, L. P. Avaliação dos impactos do uso do gesso agrícola na cultura da soja em algumas áreas do cerrado. **Embrapa Cerrados, Planaltina**, 2010.

CHABOT, R; ANTOUN, H; CESCAS, M.P. Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 10, p. 941-947, Canada, 1993.

CONLEY, D.J.; PAERL, H.W.; HOWARTH, R.W.; BOESCH, D.F.; SEITZINGER, S.P.; HAVENS, K.E.; LANCELOT, C.; LIKENS, G.E. Controlling Eutrophication: Nitrogen and Phosphorus. **Science**, 323(5917), p. 1014-1015, 2009. <https://doi.org/10.1126/science.1167755>

DOS SANTOS, B.R.; BACALHAU, F.B.; PEREIRA, T.D.; SOUZA, C.F.; FAEZ, R. Chitosan-Montmorillonite microspheres: A sustainable fertilizer delivery system. **Carbohydrate Polymers**, 127, 340-346, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.064>

DUPLER, M.; BAKER, R. Survival of *Pseudomonas putida*, a biological control agent, in soil. **Phytopathology**, v. 74, p. 195-200, 1984.

EMBRAPA. Solos no Brasil. Embrapa, 2011. Disponível em: <
<https://www.embrapa.br/en/tema-solos-brasileiros/solos-do-brasil> > Acesso em:
02 de novembro de 2022.

FARDEAU, J.C. Dynamics of phosphate in soils: an isotopic outlook. **Fertility Research**, v.45, p.91-100, 1996. <https://doi.org/10.1007/BF00790658>

FLORENCIO, C.; BORTOLETTO-SANTOS, R.; FAVARO, C.; BRONDI, M. G.; VELLOSO, C.; KLAIC, R.; RIBEIRO, C.; FARINAS, C.; MATTOSO, L. Avanços na produção e formulação de inoculantes microbianos visando uma agricultura mais sustentável. **Química Nova**. 2022. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170909>.

FONTES, M.P.F.; WEED, S.B. Phosphate adsorption by clays from Brazilian Oxisols, relationships with specific surface area and mineralogy. **Geoderma**, v. 72, p. 37-51, 1996. [https://doi.org/10.1016/0016-7061\(96\)00010-9](https://doi.org/10.1016/0016-7061(96)00010-9)

GALKIEWICZ, J.P.; KELLOGG, C.A. Cross-kingdom amplification using bacteria-specific primers: complications for studies of coral microbial ecology. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, p. 7828-7831, 2008. <https://doi.org/10.1128/aem.01303-08>

GIROTO, A.S.; DE CAMPOS, A.; PEREIRA, E.I.; CRUZ, C.C.T.; MARCONCINI, J.M.; RIBEIRO, C. Study of a nanocomposite starch-clay for slow-release of herbicides: evidence of synergistic effects between the biodegradable matrix and exfoliated clay on herbicide release control. **Journal of Applied Polymer Science**, 131 (23), 2014. <https://doi.org/10.1002/app.41188>

GIROTO, A.S.; GUIMARAES, G.G.F.; FOSCHINI, M.; RIBEIRO, C. Role of slow-release nanocomposite fertilizers on nitrogen and phosphate availability in soil. **Scientific Reports**. 7, 11, 2017. <https://doi.org/10.1038/srep46032>

GUIMARÃES, G.G.F.; KLAIC, R.; GIROTO, A.S.; MAJARON, V.F.; AVANSI, W.; FARINAS, C.S.; RIBEIRO, C. Smart Fertilization Based on Sulfur-Phosphate Composites: Synergy among Materials in a Structure with Multiple Fertilization Roles. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 6, p. 12187-12196, 2018. <http://dx.doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b02511>

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; CAMPOS, L. J. M.; MENNA, P.; BRANDI, F.; RAMOS, Y. G. Seed pre-inoculation with *Bradyrhizobium* as time-optimizing option for large-scale soybean cropping systems. **Agronomy Journal**, 112, p. 5222-5236, 2020.

INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS (IAC). Interpretação de Resultados de Análise de Solo. Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Solos e Recursos Ambientais do Instituto Agronômico. Disponível em:

<https://www.iac.sp.gov.br/produtoseservicos/analisedosolo/interpretacaoanalise.php#:~:text=O%20teor%20de%20mat%C3%A9ria%20org%C3%A2nica%20C3%A9%20%C3%BAtil%20para%20dar%20id%C3%A9ia,g%2Fdm3%20para%20solos%20argilosos.>

JAIN, R.; SAXENA, J.; SHARMA, V. The evaluation of free and encapsulated *Aspergillus awamori* for phosphate solubilization in fermentation and soil–plant system. **Applied Soil Ecology**, v. 46, p. 90-94, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.06.008>

JOSÉ, L. HERNÁNDEZ MENDOZA, P.L.; LÓPEZ, H., BRAVO, A.S.; OLIVARES, J.G.G.; CASTILLEJOS, G.C.R., VELÁSQUEZ, J.C.Q. Conservación por microencapsulación de bacterias de uso agrícola: *Azospirillum brasilense*. **Bolivian Journal of Chemistry**, v. 35, n.4, p. 117-122, 2018.

KIM, K. Y; JORDAN, D; McDONALD, G. A. Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. **Biology and Fertility of Soils**, v. 26, n. 2, p. 79-87, Germany, 1998. <https://doi.org/10.1007/s003740050347>

KIM, I.Y.; PUSEY, P.L.; ZHAO, Y.; KORBAN, S.S.; CHOI, H.; KIM, K.K. Controlled release of *Pantoea agglomerans* E325 for biocontrol of fire blight disease of apple. **Journal of Controlled Release**, 161, 109–115, 2012.
<http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.028>

KLAIC, R.; PLOTTEGHER, F.; RIBEIRO, C.; ZANGIROLAMI, T. C. C.; & FARINAS, C. S. S. A novel combined mechanical-biological approach to improve rock phosphate solubilization. **International Journal of Mineral Processing**, 161, 50–58, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.minpro.2017.02.009>

KLAIC, R.; GIROTO, A.S.; GUIMARÃES, G.G.F.; PLOTTEGHER, F.; RIBEIRO, C.; ZANGIROLAMI, T.C.; FARINAS, C.S. Nanocomposite of starch-phosphate rock bioactivated for environmentally-friendly fertilization. **Minerals Engineering**, 128, p. 230-237, 2018b.
<https://doi.org/10.1016/j.mineng.2018.09.002>

KLAIC, R.; GUIMARÃES, G.G.F.; GIROTO, A.S.; BERNARDI, A.C.C.; ZANGIROLAMI, T.C.; RIBEIRO, C.; Farinas, C.S. Synergy of *Aspergillus niger* and Components in Biofertilizer Composites Increases the Availability of Nutrients to Plants. **Current Microbiology**, v. 1, p. 1, 2021.
<https://doi.org/10.1007/s00284-021-02406-y>

KOMAL, K. B.; PADMA, P. B. D. Alleviation of salinity stress in rice plant by encapsulated salt tolerant plant growth promoting bacteria *Pantoea agglomerans* strain KL and its root colonization ability. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 65, 2019. <https://doi.org/10.1080/03650340.2019.1584395>

KONTIC, B.; D. KONTIC. A viewpoint on the approval context of strategic environmental assessments. **Environmental Impact Assessment Review**, v. 32, p. 151- 155, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.eiar.2011.07.003>

KRISHNARAJ, P.U.; DAHALE, S. Mineral Phosphate Solubilization: Concepts and Prospects in Sustainable Agriculture. **Proceedings of the Indian National Science Academy**, v. 80, p. 389-405, 2014. <http://dx.doi.org/10.16943/ptinsa/2014/v80i2/55116>

LASTOCHKINA, O. (2019). **Bacillus subtilis-Mediated Abiotic Stress Tolerance in Plants**. In: Islam, M., Rahman, M., Pandey, P., Boehme, M., Haesaert, G. (eds) *Bacilli and Agrobiotechnology: Phytostimulation and Biocontrol. Bacilli in Climate Resilient Agriculture and Bioprospecting*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-15175-1_6

LASTOCHKINA, O.; ALINIAEIFARD, S.; GARSHINA, D.; GARIPOVA, S.; PUSENKOVA, L.; ALLAGULOVA, C.; FEDOROVA, K.; BAYMIEV, A.; KORYAKOV, I.; SOBHANI, M. Seed priming with endophytic *Bacillus subtilis* strain-specifically improves growth of *Phaseolus vulgaris* plants under normal and salinity conditions and exerts anti-stress effect through induced lignin deposition in roots and decreased oxidative and osmotic damages, **Journal of Plant Physiology**, v. 263, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2021.153462>.

LOPES, M. M.; OLIVEIRA-PAIVA, C. A.; FARINAS, C. S. Modification of pectin/starch-based beads with additives to improve *Bacillus subtilis* encapsulation for agricultural applications, **International Journal of Biological Macromolecules**, v.246, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125646>

MAGED, M.; ABO-KOURA, H.A.; BISHARA, M.M.; GOMAA, I.M. Microencapsulation: Toward the Reduction of the Salinity Stress Effect on Wheat Plants Using NPK Rhizobacteria. **Biotechnol. J. Int.**, 23, 1–18, 2019.

MANEK, R. V.; BUILDERS, P. F.; KOLLING, W. M.; EMEJE, M.; & KUNLE, O. O. Physicochemical and binder properties of starch obtained from *Cyperus esculentus*. **AAPS PharmSciTech**, 13(2), 379–388, 2012. <https://doi.org/10.1208/s12249-012-9761-z>

MAPA DE SOLOS DO BRASIL. Embrapa Solos, 2020. Disponível em: < http://geoinfo.cnps.embrapa.br/layers/geonode%3Abrasil_solos_5m_20201104 > Acesso em: 27 de outubro de 2022.

MARTINS, G. Diagnóstico sobre sistemas de dados agrícolas do Brasil para um sistema nacional de avaliação de danos e perdas por desastres na agricultura. Brasília, **FAO**. 2021. <https://doi.org/10.4060/cb6527pt>

MASCHIETTO, E. H. G. Gesso agrícola na produção de milho e soja de alta fertilidade e baixa acidez em subsuperfície em plantio direto. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, PR. 2009.

MENDES, I. de C; REIS JUNIOR, F.B. dos. Microrganismos e disponibilidade de fósforo (P) nos solos: uma análise crítica. Embrapa Cerrados, Planaltina/DF. 2003.

MOHITE, B. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 13, n. 3, p. 638-649, 2013.
<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162013005000051>

MULLINS, G. Phosphorus, Agriculture & the Environment, Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia State University, and the U.S. Department of Agriculture cooperating, 2009.

MURPHY, J., RILEY, J.P. Citation-classic - a modified single solution method for the determination of phosphate in natural-waters. **Current Contents/Agriculture Biology & Environmental Sciences** (12), 16-16, 1986.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88444-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88444-5)

NAÇÕES UNIDAS BRASIL. 1,5 bilhão de pessoas vivem com solo salgado demais para ser fértil. Nações Unidas Brasil. 2021. Disponível em <https://brasil.un.org/pt-br/152392-15-bilhao-de-pessoas-vivem-com-solo-salgado-demais-para-ser-fertil#:~:text=Novo%20Mapa%20Global%20de%20Solos,planeta%20%C3%A9%20afetado%20pelo%20sal>. Acesso em: 28 de outubro de 2022.

NADEEM, S. M.; AHMAD, M.; ZAHIR, Z. A.; JAVAID, A.; ASHRAF, M. The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. **Biotechnology Advances**, v. 32, 2, p. 429-448, 2014.

NAHAS, E. Ciclo do fósforo: transformações microbianas. FUNEP, Jaboticabal, p. 67, 1991.

NEMERY, J.; GARNIER, J. BIOGEOCHEMISTRY The fate of phosphorus. **Nature Geoscience**, 9(5), p. 343-344, 2016.

NI, L.; PUNJA, Z. K. (2019). Management of Fungal Diseases on Cucumber (*Cucumis sativus* L.) and Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Crops in Greenhouses Using *Bacillus subtilis*. In: Islam, M., Rahman, M., Pandey, P., Boehme, M., Haesaert, G. (eds) Bacilli and Agrobiotechnology: Phytostimulation and Biocontrol. Bacilli in Climate Resilient Agriculture and Bioprospecting. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-15175-1_1

OLIVEIRA, C.A.; ALVES, V.M.C.; MARRIEL, I.E.; GOMES, E.A.; SCOTTI, M.R.; CARNEIRO, N.P.; GUIMARÃES, C.T.; SCHAFFERT, R.E.; SÁ, N.M.H. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, n. 9, p. 1782-1787, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.01.012>

OWEN, D.; WILLIAMS, A.; GRIFFITH, G.; WITHERS, P. Use of commercial bioinoculants to increase agricultural production through improved phosphorous acquisition. **Applied Soil Ecology**, v. 86, p. 41-54, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.09.012>

PAIVA, C.A. de O.; MARRIEL, I.E.; GOMES, E.A.; COTA, L.V.; dos SANTOS, F.C.; TINOCO, S.M. de S.; LANA, U.G. de P.; OLIVEIRA, M.C.; MATTOS, B.B.; ALVES, V.M.C.; RIBEIRO, V.P.; JUNIOR, R.V. Recomendação agronômica de cepas de *Bacillus subtilis* (CNPMS B2084) e *Bacillus megaterium* (CNPMS B119) na cultura do milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2020. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 260).

PARIDA, A. K.; DAS, A. B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, 3, p. 324-349, 2005.

QI, X.; TESTER, R. F. Starch granules as active guest molecules or microorganism delivery systems. **Food Chemistry**, v. 271, 182-186, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.177>.

RAIJ, B. van; ANDRADE, J.C. de; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. Análise Química para Avaliação da Fertilidade de Solos Tropicais. Campinas, **Instituto Agrônomo**, 285p. 2001

RAIJ, B.V. Fertilidade do solo e adubação. **Associação Brasileira para a Pesquisa da Potassa e do Fosfato**, p. 329-343, Piracicaba/SP, 1991.

RANI, U.; SHARMA, S. AND KUMAR V. (2019). *Bacillus* Species: A Potential Plant Growth Regulator. In: Islam, M., Rahman, M., Pandey, P., Boehme, M., Haesaert, G. (eds) *Bacilli and Agrobiotechnology: Phytostimulation and Biocontrol. Bacilli in Climate Resilient Agriculture and Bioprospecting*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-15175-1_2

RATH, K.M.; ROUSK, J. Salt effects on the soil microbial decomposer community and their role in organic carbon cycling: A review. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 81, p. 108-123, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.11.001>

RIBEIRO, V.P.; MARRIEL, I.E.; SOUSA, S.M. de; LANA, U.G. de P.; MATTOS, B.B.; PAIVA, C.A.O.; GOMES, E.A. Endophytic *Bacillus* strains enhance pearl millet growth and nutrient uptake under low-P. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49S, p. 40-46, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.06.005>

ROUSK, J, ELYAAGUBI, F.K., JONES, D.L., GODBOLD, D.L. Bacterial salt tolerance is unrelated to soil salinity across an arid agroecosystem salinity gradient. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, Issue 9, p. 1881-1887, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.05.007>

SANTOYO, G.; EQUIHUA, A.; FLORES, A.; SEPULVEDA, E.; VALENCIA-CANTERO, E.; SANCHEZ-YAÑEZ, S. M.; MORALES, L. R.; GOVINDAPPA, M. AND SANTOS-VILLALOBOS, S. (2019). Plant Growth Promotion by ACC Deaminase-Producing *Bacillis* Under Salt Stress Conditions. In: Islam, M.,

Rahman, M., Pandey, P., Boehme, M., Haesaert, G. (eds) Bacilli and Agrobiotechnology: Phytostimulation and Biocontrol. Bacilli in Climate Resilient Agriculture and Bioprospecting. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-15175-1_5

SINGH, S.; KAPOOR, K.K. Inoculation with phosphate solubilizing microorganisms and a vesicular arbuscular mycorrhizal fungus improves dry matter yield and nutrient uptake by wheat grown in a sandy soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 28, n. 2, p. 139-144, United States, 1999. <https://doi.org/10.1007/s003740050475>

SPIRLANDELLI, G. Impactos ambientais do sulfato de cálcio provenientes da produção de ácido fosfórico. I Encontro de Desenvolvimento de Processos Agroindustriais, 2017.

TODICA, M.; NAGY, E.M.; NICULAESCU, C.; STAN, O.; CIOICA, N.; POP, C.V. XRD investigation of some thermal degraded starch based materials. **Journal of Spectroscopy**.16(1):1-6., 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9605312>

VAN VEEN, J.A.; VAN OVERBEEK, L.S.; VAN ELSAS, J.D. Fate and Activity of Microorganisms Introduced into Soil. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 2, p. 121 – 135, Netherlands, 1997. <https://doi.org/10.1128/mnbr.61.2.121-135.1997>

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M.; FENICE, M.; FEDERICI, F. Immobilized cell technology applied in solubilization of insoluble inorganic (rock) phosphates and P plant acquisition. **Bioresource Technology**, v. 79, p. 263-271, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00017-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00017-7)

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M.; LOPEZ, A.; MARTOS, V.; REYES, A.; MAKSIMOVIC, I.; EICHLER-LOEBERMANN, B.; MALUSA, E. Unexploited potential of some biotechnological techniques for biofertilizer production and formulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 4983-4996, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6656-4>

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M.; MARTOS, V.; DEL MORAL, L.F.; KOWALSKA, J.; TYLKOWSKI, B.; MALUSÁ, E. Formulation of microbial inoculantes by encapsulation in natural polysaccharides: focus on beneficial properties of carrier additives and derivatives. **Frontiers in Plant Science**, v. 11: 270, 2020. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00270>

VASSILEVA, M.; SERRANO, M.; BRAVO, V.; JURADO, E.; NIKOLAEVA, I.; MARTOS, V.; VASSILEV, N. Multifunctional properties of phosphate-solubilizing microorganisms grown on agro-industrial wastes in fermentation and soil conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 1287-1299, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2366-0>

WAHYUDI, A.T.; ASTUTI, R.P.; WIDYAWATI, A.; MERYANDINI, A.; NAWANGSIH, A.A. Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from

rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting rhizobacteria. **Journal of Microbiology Indonesia**, v. 3, n. 2, p. 34-40, 2011.

WANG, W.; WU, Z.; HE, Y.; HUANG, Y.; LI, X.; YE, B. Plant growth promotion and alleviation of salinity stress in *Capsicum annuum* L. by *Bacillus* isolated from saline soil in Xinjiang. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.164, p. 520-529, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.08.070>

WU, Z.; GUO, L.; QIN, S.; LI, C. Encapsulation of *R. planticola* Rs-2 from alginate-starch-bentonite and its controlled release and swelling behavior under simulated soil conditions. **Journal Industrial Microbioly Biotechnology**, v. 39, p. 317-327, 2012.

ZAKAVI, M.; ASKARI, H.; SHAHROOEI, M. Maize growth response to different *Bacillus* strains isolated from a salt-marshland area under salinity stress. **BMC Plant Biol** 22, 367, 2022. <https://doi-org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1186/s12870-022-03702-w>

ZECHMAN, J.M.; CASIDA, L.E.J. Death of *Pseudomonas aeruginosa* in soil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 28, p. 788-794, 1982. <https://doi.org/10.1139/m82-1>

ZHENG, L.; X.; MA; LANG, D.; ZHANG, X.; ZHOU, L.; WANG, L.; ZHANG, X. Eco-friendly bio-encapsulation from sodium alginate-trehalose-kaolin and its performance evaluation in improving plant growth under salt or/and drought conditions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 209, 123-134, 2023

