



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE
Departamento de Morfologia e Patologia

BIANCA OLIVEIRA PESSA

INOCULANTE ENCAPSULADO EM MATRIZ DE POLISSACARÍDEO

SÃO CARLOS, SP

2024

Bianca Oliveira Pessa

INOCULANTE ENCAPSULADO EM MATRIZ DE POLISSACARÍDEO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado na Universidade Federal de São Carlos como requisito básico para a conclusão do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza
Departamento de Morfologia e Patologia,
Laboratório de Microbiologia e Parasitologia, LMP/UFSCar

Coorientador: Dr. Cauê Ribeiro de Oliveira
Embrapa Instrumentação, São Carlos - SP

SÃO CARLOS

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Folha de Aprovação

Assinatura dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa do Trabalho de Conclusão de Curso da candidata Bianca Oliveira Pessa, realizada em 06/02/2024

Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza
Universidade Federal de São Carlos

Dr. Caue Ribeiro de Oliveira
Embrapa Instrumentação

Dra. Vanessa Molina de Vasconcellos
Embrapa Instrumentação

“Dedico este trabalho aos meus pais Evânia e Pablo, e à minha irmã, Taís. Sem vocês, nada seria possível.”

“...passada a tempestade, você nem se lembrará de como a superou, como conseguiu sobreviver. Na verdade, nem sequer terá certeza de que a tempestade realmente tenha passado. Mas uma coisa é certa. Ao sair da tempestade, você não será a mesma pessoa que entrou nela. É este o motivo da tempestade.”

Haruki Murakami

AGRADECIMENTOS

Ao Caue Ribeiro de Oliveira, por me aceitar como estagiária e possibilitar tudo que veio disso.

À Vanessa Molina, pelas conversas e por todos os ensinamentos ao longo dos experimentos sem fim. Você foi fundamental para que eu chegasse até aqui e sou muito grata por ter conhecido você.

Ao meu orientador acadêmico, Clovis Wesley Oliveira de Souza, pelo apoio ao longo desse processo.

Aos meus pais e à minha avó, pelo apoio incondicional em cada etapa da vida.

À minha irmã, Taís, por estar do meu lado em cada decisão.

A todas as minhas amigas que viraram família, mas em especial à Taynara e à Pamela, pelas risadas em meio a todos os perrengues da vida.

Aos amigos do laboratório e funcionários da Embrapa, pelas conversas e aprendizados.

À Embrapa Instrumentação, pela infraestrutura e apoio institucional.

E a todos os que de alguma forma possibilitaram que eu concluísse a graduação.

RESUMO

O uso de microrganismos como biofertilizantes é uma alternativa promissora em relação aos métodos tradicionais de fertilização. Diversas cepas de bactérias do gênero *Bacillus* são reconhecidas por promover o crescimento vegetal, impactando positivamente no desenvolvimento de culturas. A produção de inoculantes microbianos viabiliza o uso de microrganismos nas áreas agrícolas, sendo vantajoso o encapsulamento dos mesmos para aumentar a viabilidade do produto. Entre os materiais para compor a matriz, o amido se destaca por ser biodisponível, biodegradável e ter baixo custo. O carvão ativado pode ser utilizado como aditivo nas composições de inoculantes, pois ele aumenta a capacidade de retenção de água no solo e fixação de nutrientes e fertilizantes. O objetivo deste projeto foi desenvolver e caracterizar um inoculante microbiano em pó tendo como matriz amido e carvão ativado, visando aumentar a proteção e o *shelf-life* dos esporos das bactérias *Bacillus megaterium* (CNPMS B119) e *Bacillus thuringiensis* (CNPMS B116). Os resultados alcançados evidenciam a eficácia do inoculante microbiano composto por amido e carvão no processo de encapsulamento de *Bacillus*. Micrografias MEV evidenciaram a presença de esporos de *Bacillus* nas matrizes de encapsulamento. O inoculante microbiano liberou uma alta concentração de células, e a formulação manteve a viabilidade dos microrganismos durante os seis meses de armazenamento. O uso dos biocompósitos no tratamento de sementes não interferiu na germinação da soja, e o revestimento das sementes com a formulação manteve concentrações superiores de esporos viáveis em comparação com sementes revestidas apenas com os esporos livres ao longo do período avaliado. Esses resultados ressaltam a eficiência da formulação como estratégia para o tratamento de sementes.

Palavras-chave: Inoculantes, encapsulamento, amido, carvão ativado.

ABSTRACT

The use of microorganisms as biofertilizers represents a promising alternative to traditional fertilization methods. Several strains of bacteria belonging to the *Bacillus* genus are acknowledged for their ability to promote plant growth, positively impacting crop development. The production of microbial inoculants makes it viable to apply microorganisms in agricultural areas, and encapsulating these microorganisms proves advantageous in enhancing product viability. Starch emerges as a prominent material for composing the matrix. due to its bioavailability, biodegradability, and low cost. Activated Charcoal can be used as an additive in inoculant compositions, as it increases soil water retention capacity and facilitates nutrient and fertilizer fixation. This project aims to develop and characterize a powdered microbial inoculant with a matrix of starch and activated charcoal, using spores from *Bacillus megaterium* (CNPMS B119) and *Bacillus thuringiensis* (CNPMS B116). The primary objective is aiming to increase the protection of microorganisms and shelf-life, ultimately promoting positive results in seed coating. The obtained results indicate the efficiency of the starch and charcoal-based microbial inoculant for encapsulating *Bacillus*. SEM micrographs revealed the presence of *Bacillus* spores in the encapsulation matrices. The bioinoculant release a high concentration of cells, and the formulation maintains the viability of microorganisms over the six-months storage period. The use of biocomposites in seed treatment did not interfere with soybean germination, and seed coating with the formulation maintained higher concentrations of viable cells compared to seeds coated only with free microorganisms throughout the evaluated period. These results highlight the effectiveness of the formulation as a strategy for seed treatment.

Keywords: Inoculants, encapsulation, starch, activated charcoal.

Sumário

1. Introdução	11
1.1. Biofertilizantes.....	11
1.2. Inoculantes Microbianos	12
1.3. Métodos de Encapsulamento.....	13
1.4. Matrizes	13
3. Objetivos	16
3.1. Geral	16
3.2. Específicos.....	16
4. Materiais e Métodos	17
4.1. Materiais	17
4.2. Obtenção dos Esporos.....	17
4.3. Preparação dos Inoculante Microbiano.....	18
4.4. Viabilidade dos <i>Bacillus</i> nos Bioinoculantes em Pó	18
4.5. Liberação Convencional e Via Hidrólise Enzimática	19
4.6. Caracterizações	20
4.7. Recobrimento das Sementes (TSI).....	21
4.8. Viabilidade dos <i>Bacillus</i> nas Sementes Revestidas.....	21
4.9. Ensaio de Germinação.....	22
4.10. Análise Estatística	23
5. Resultados e Discussão	23
5.1. Liberação Convencional e Via Hidrólise Enzimática	23
5.2. Shelf-life dos Biocompósitos em pó	24
5.3. Caracterizações	24
5.4. Viabilidade das Sementes Revestidas	30
5.5. Germinação	32
6. Conclusão	34

1. Introdução

1.1. Biofertilizantes

A intensificação da produtividade alimentícia é um dos maiores desafios enfrentados pela agricultura na atualidade. No entanto, essa grande demanda não é acompanhada por um aumento na disponibilidade de terras agricultáveis, levando à necessidade de utilizar fertilizantes químicos para atingir maiores níveis de produtividade (Pirtillä *et al.*, 2021). A aplicação de fertilizantes químicos na agricultura causa prejuízos à saúde humana e aos ecossistemas. Devido a sua alta solubilidade, a absorção insuficiente dos fertilizantes pelas plantas leva a contaminação da água por lixiviação e a efeitos degradantes sobre os solos, gerando um esgotamento da capacidade de reter água e um desequilíbrio em sua fertilidade. Nesse cenário, desenvolver tecnologias e produtos mais sustentáveis, e que possam aumentar a produtividade agrícola torna-se uma necessidade (Luo *et al.*, 2019).

Uma alternativa em relação aos métodos tradicionais de fertilização é o uso de microrganismos, conhecidos como biofertilizantes (Pirtillä *et al.*, 2021). Algumas bactérias comumente utilizadas na agricultura são as dos gêneros *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Rhizobium* spp., e também fungos, como o *Trichoderma*, encontrados na rizosfera e considerados essenciais para o microbioma. Estes são considerados Microrganismos Promotores de Crescimento de Plantas (PGPM, em inglês, *Plant-Growth Promoting Microorganisms*) e possuem mecanismos capazes de intensificar o crescimento e desenvolvimento das plantas, através da solubilização de nutrientes, fixação de nitrogênio (N), produção de reguladores do crescimento vegetal (fitohormônios) e proteção contra patógenos (Fasusi, Cruz, Babalola, 2021).

As bactérias do gênero *Bacillus* sp. como as cepas *B. subtilis* (CNPMS B2084), *B. megaterium* (CNPMS B119), *B. thuringiensis* (CNPMS B116), entre outras, enquadram-se como principal gênero capaz de solubilizar fosfato e potássio. Os *Bacillus* produzem auxinas (IAA), um fitohormônio que estimula o crescimento vegetal, trazendo benefícios para as plantas. Eles também apresentam esporos resistentes a condições abióticas, aumentando a possibilidade de adaptação às aplicações no campo (Wu *et al.*, 2015; Souza *et al.*, 2015).

Embora muitos microrganismos possam influenciar positivamente o crescimento e o desenvolvimento vegetal, ainda há limitações em sua utilização para aumentar a produtividade agrícola. Isso ocorre devido à sobrevivência insatisfatória destes quando aplicados livremente no campo, uma vez que muitas células perdem a viabilidade devido a condições bióticas e abióticas adversas do ambiente (Berninger *et al.*, 2018).

1.2. Inoculantes Microbianos

A utilização de microrganismos na agricultura ocorre através de inoculantes, produtos com altas cargas microbianas que melhoram o desenvolvimento de culturas quando aplicados no solo, nas sementes ou nas folhas das plantas. A composição da formulação utilizada é imprescindível para o desenvolvimento eficaz de um inoculante, que normalmente é composta pelo microrganismo, por um agente carreador e aditivos. Os carreadores são os substratos utilizados no preparo das formulações que promovem a associação dos organismos com as plantas. Os aditivos atuam facilitando a estabilidade da formulação, a proteção aos microrganismos durante o armazenamento e transporte, além de proporcionarem um melhor desempenho do produto na aplicação (Alori e Babalola, 2017; John *et al.*, 2011).

Os inoculantes se apresentam em formulações sólidas, líquidas ou encapsuladas. Nas formulações sólidas, o microrganismo é incorporado superficialmente a carreadores orgânicos ou inorgânicos e se apresentam em formulações granulares ou em pó. Este método apresenta baixa taxa de sobrevivência do microrganismo durante o armazenamento e na aplicação devido a dessecação. Os inoculantes líquidos requerem a adição de altas concentrações de microrganismos, porém a viabilidade celular necessária para eficácia das formulações líquidas exige um maior número de aplicações no campo (Bashan *et al.*, 2013; John *et al.*, 2011).

Outro tipo de formulação consiste no encapsulamento do microrganismo em uma matriz. Essa técnica apresenta vantagens em relação às outras, porque o encapsulamento cria um microambiente propício ao crescimento e desenvolvimento do organismo e apresentam maior viabilidade durante e após aplicação. A principal questão relacionada a esse método é o custo de produção mais elevado em comparação aos demais, o que requer maiores estudos para definir possíveis formas de baratear sua produção (John *et al.*, 2011; Bashan *et al.*, 2013).

1.3. Métodos de Encapsulamento

Existem diferentes técnicas de encapsulamento disponíveis, cada uma com características distintas. A secagem por spray dryer, por exemplo, envolve a pulverização de uma suspensão contendo microrganismos em uma corrente de ar quente formando pequenas partículas secas com revestimento protetor. A extrusão consiste na incorporação do microrganismo em uma matriz sólida através de um processo de extrusão. Na emulsão, gotículas são formadas pela mistura de duas fases não miscíveis que encapsulam o microrganismo em uma camada lipídica ou proteica (Bashan *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2021).

Entre as técnicas, a escolha da matriz e dos aditivos, bem como o custo de desenvolvimento e a aplicabilidade desejada, variam. As características e necessidades fisiológicas do microrganismo vão influenciar diretamente nessas escolhas. É necessário buscar métodos relativamente simples, de baixo custo e que possam ser processados em condições que mantenham a viabilidade das células no produto final.

A técnica de encapsulamento utilizada neste trabalho foi o casting, no qual uma solução polimérica é preparada sob aquecimento e agitação, e em seguida é espalhada sob uma superfície para a formação de uma fina camada que passará pelo processo de secagem, permitindo a evaporação do solvente e a formação do filme, que serve como revestimento protetor. Cargas microbianas podem ser adicionadas durante o resfriamento. A mistura homogênea da solução e o tempo são parâmetros importantes nessa técnica (Bashan *et al.*, 2013; Fitch-Vargas *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2021).

1.4. Matrizes

A escolha dos materiais que vão compor a matriz deve considerar as propriedades químicas, físicas e nutricionais desejadas no produto para manter um número considerável de células viáveis. É interessante que os materiais sejam acessíveis, biodegradáveis e não apresentem toxicidade (Mahanty *et al.*, 2017). Um material que atende essas características é o amido, polímero natural encontrado em abundância, biodegradável e biocompatível. Ele é constituído por grânulos e pode ser

obtido de diversas fontes, como tubérculos, leguminosas e cereais (Mali, Grossmann e Yamashita, 2010).

O amido é um co-polímero, formado por duas macromoléculas, a amilose e amilopectina, com estruturas químicas diferentes. A amilose é um polissacarídeo formado por unidades de glicose ligados por ligações glicosídicas α -1,4, formando uma cadeia linear. A amilopectina é formada por unidades de glicose unidas em α -1,4 e α -1,6, originando uma estrutura ramificada. O amido possui regiões amorfas relacionadas as cadeias lineares da amilose e regiões cristalinas, relacionadas as cadeias paralelas da amilopectina. Variações entre as proporções de amilose e amilopectina resultam em grânulos de amido com padrões de difração de raio X específicos, com base na intensidade relativa dos picos (Mali, Grossmann e Yamashita, 2010).

Um processo físico-químico importante do amido é a gelatinização, que acontece pelo aquecimento dos grânulos em água. Com o aumento da temperatura, os grânulos de amido começam a absorver água e expandir. Esse processo leva à quebra das ligações de hidrogênio e à liberação da amilose e da amilopectina, que começam a interagir com a água. Como resultado, forma-se um gel viscoso. Após o resfriamento, a amilose e a amilopectina começam a recristalizar, formando novamente pontes de hidrogênio, no processo de retrogradação, diminuindo propriedades como a elasticidade. Entretanto, o processo de gelatinização do amido aumenta a eficácia na retenção de células, atuando positivamente no processo de encapsulamento e o amido também pode atuar como fonte de carbono para os microrganismos (Ratnayake e Jackson, 2009; Hoyos-Leyva *et al.*, 2018, Guo *et al.*, 2021; Vassilev *et al.*, 2020).

Durante a produção de filmes por casting, o amido passa pelo processo de gelatinização. O amido normalmente não é o único componente da matriz. Para a formação de filmes com maior elasticidade, plastificantes como glicerol ou sorbitol podem evitar a retrogradação dos grânulos de amido. Além disso, podem ser utilizados também aditivos, que podem incluir polímeros naturais ou sintéticos, minerais ou argilas como carvão, zeólita, bentonita, considerados uma boa alternativa para explorar novas matrizes mais ecológicas (Bashan *et al.*, 2013; Berninger *et al.*, 2018; Lateef *et al.*, 2016).

O carvão mineral, composto principalmente por carbono, aumenta a capacidade de retenção de água no solo e fixação de nutrientes e fertilizantes,

reduzindo sua perda por lixiviação. A distribuição de poros em toda superfície do carvão fornece um ambiente propício para a sobrevivência das bactérias. Do ponto de vista agrícola, o carvão atua na melhoria das propriedades físicas e biológicas do solo (Vlajkov *et al.*, 2023). Nas formulações com amido, o carvão auxilia no crescimento das plantas, na resistência a patógenos, na estimulação da germinação de sementes e melhorando a qualidade do solo (Egamberdieva *et al.*, 2018; Soudek *et al.*, 2017).

1.5. Aplicação do Microrganismo Encapsulado

Uma vez que os microrganismos encapsulados são comprovadamente viáveis, eles podem ser aplicados diretamente no solo através de diferentes métodos, como aplicação no sulco de plantio, tratamento de sementes, aplicação foliar, ou através de sistemas de irrigação (Oliveira *et al.*, 2021).

O microrganismo encapsulado pode ser aplicado no revestimento da semente durante o processo de Tratamento de Sementes Industrial (TSI). O TSI é processo no qual as sementes são tratadas com diferentes produtos químicos para melhorar sua qualidade, proteger contra pragas e patógenos, e promover um melhor estabelecimento das plantas, o qual pode incluir a aplicação de fungicidas, inseticidas, micronutrientes e outros agentes benéficos para proteger as sementes e promover o crescimento saudável das plantas desde o início do ciclo de vida. Essa prática tem como objetivo aumentar a eficiência agrícola, proteger as sementes de doenças e pragas, e melhorar o rendimento das culturas. A aplicação desses componentes ocorre pela deposição de uma fina camada dos materiais na superfície das sementes, sem alterar seu tamanho ou formato (Ma, 2019; Camargo *et al.*, 2022; Carderelli *et al.*, 2022).

2. Justificativa

Frente à crescente demanda por alternativas aos fertilizantes químicos e à necessidade de alta produtividade agrícola e resistência das plantas a condições bióticas e abióticas, os inoculantes microbianos destacam-se como uma alternativa vantajosa. Dentre os microrganismos PGPM, as bactérias do gênero *Bacillus*, especialmente as cepas *B. megaterium* e *B. thuringiensis*, podem ser utilizadas

individualmente ou combinadas para obter os melhores resultados em relação à eficácia do produto. Além disso, ao considerar as vantagens descritas acima sobre o uso de polímeros naturais em relação aos sintéticos, as formulações contendo esporos de *Bacillus* encapsulados em uma matriz com amido e carvão surgem como um bioinoculante promissor no cenário atual.

3. Objetivos

3.1. Geral

Este projeto teve como propósito desenvolver um inoculante microbiano em pó capaz de manter a viabilidade celular e prolongar o tempo de armazenamento (shelf-life) dos esporos de *Bacillus*. O objetivo foi comparar a liberação e a viabilidade de um bioinoculante utilizando *Bacillus megaterium* (CNPMS B119); *Bacillus thuringiensis* (CNPMS B116); e a combinação das duas cepas. Todos foram produzidos em uma matriz à base de amido e carvão e utilizados no revestimento de sementes de soja.

3.2. Específicos

- Desenvolver uma matriz a base de amido de milho e carvão ativado comercial e incorporar os microrganismos: *Bacillus megaterium* (CNPMS B119), *Bacillus thuringiensis* (CNPMS B116) e a combinação das duas cepas em uma mesma matriz;
- Teste de viabilidade dos microrganismos encapsulados;
- Avaliar o shelf-life dos bioinoculantes ao longo de 6 meses;
- Revestir sementes de soja com os materiais e com microrganismo livre;
- Avaliar a germinação das sementes no tempo zero e após 3 meses de estocagem.
- Avaliar a viabilidade dos microrganismos nas sementes revestidas com o microrganismo livre e encapsulado.

4. Materiais e Métodos

4.1. Materiais

A produção das matrizes desse trabalho utilizou amido de milho (Amidex 3001, Ingredion), carvão ativado pó (C1012.06.AH, Synth) sementes de soja (COOPAGRÍCOLA Ce t. de Soja C1, safra 2021/2022, lote: 302022-313), polímero e pó secante comerciais fornecidos pela empresa Laborsan, inseticida Cropstar® (Bayer), fungicida Maxim® (Syngenta), Caldo Triptona de Soja (TSB, KASVI) e esporos de *Bacillus megaterium* (CNPMS B119) e *Bacillus thuringiensis* (CNPMS B116).

4.2. Obtenção dos Esporos

As bactérias utilizadas foram obtidas a partir da Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo (CNPMS) (Minas Gerais, Brasil). Para cada microrganismo, um criotubo contendo 2,5 ml de suspensão de células ($\sim 2,10^8$ UFC/mL) armazenados a -80°C , descongelado à temperatura ambiente, foi reativado em 50 mL de meio de cultura líquido de caldo de triptona de soja (TSB) em erlenmeyers de 500 mL, o qual foi incubado no shaker por 16h a 250 rpm a 30°C . Para a obtenção dos esporos, 10% deste inóculo foi adicionado em 50 mL de um meio TSB novo em erlenmeyers de 500 mL, por 72 horas a 250 rpm a 30°C (metodologia adaptada de VELLOSO, 2023).

Após 72h, o meio de cultivo foi centrifugado a 8000 rpm, 4°C por 10 minutos, para a completa precipitação das células, e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas com o mesmo volume em solução NaCl 0,85% estéril. Para eliminar as células viáveis restantes, as suspensões foram colocadas por 15 minutos em banho maria a 80°C . Após isso, as suspensões de esporos das duas cepas estavam prontas para serem incorporadas ao material. Parte da suspensão das bactérias produzidas foram secas em estufa à $30-35^\circ\text{C}$ por 24h e, após secagem completa, armazenadas como microrganismo livre para posterior utilização no recobrimento de sementes.

4.3. Preparação dos Inoculante Microbiano

A preparação do inoculante microbiano, para todas as amostras, constituiu na preparação do gel composto de amido, em banho maria a 90°C, sob agitação constante. Após a gelatinização, foi adicionado o carvão ativado, e a suspensão de esporos foi ajustada com solução salina 0,85%, para a concentração final de aproximadamente $1,7 \times 10^9$ UFC/ g de sólido. Por fim, o gel inoculante precursor foi seco em estufa com circulação de ar a 35°C por 24h. Após a secagem, o filme formado foi moído para formação de um pó fino (pó secante). O bioinoculante em pó produzido foi armazenado em falcons de 50 mL à temperatura ambiente. Ele foi posteriormente utilizado em substituição ao pó secante durante a etapa final do Tratamento de Sementes Industrial (TSI).

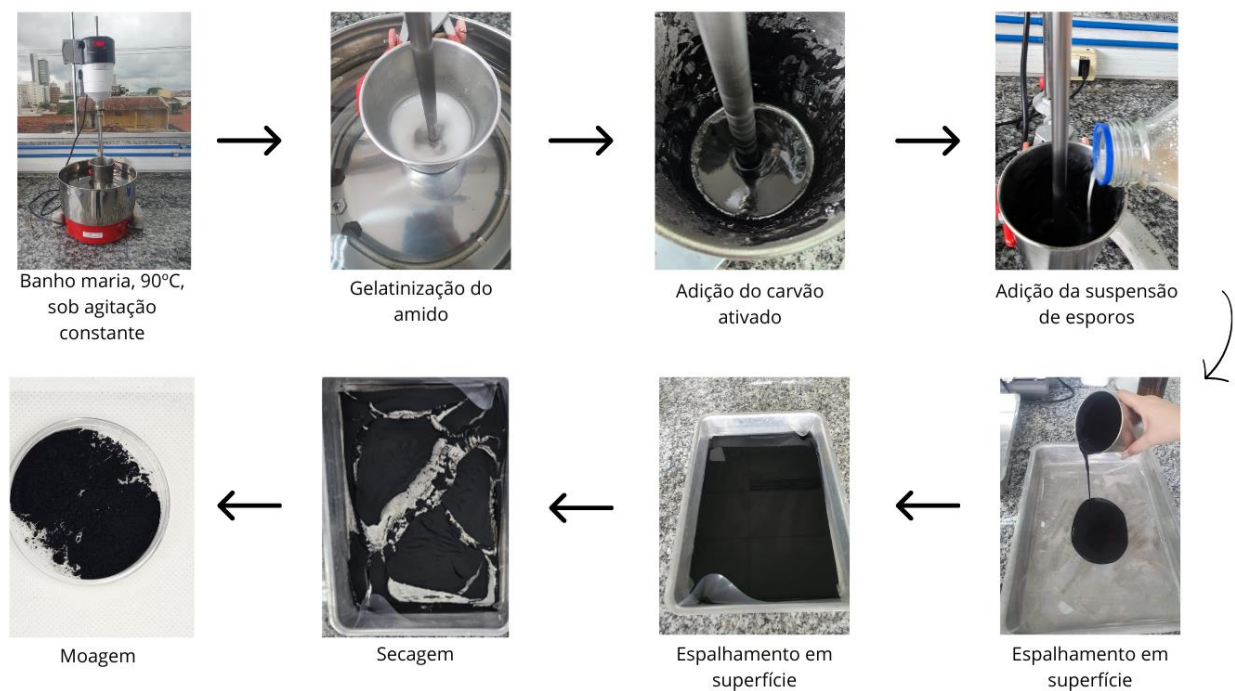


Figura 1 - Preparo do inoculante microbiano.

4.4. Viabilidade dos *Bacillus* nos Bioinoculantes em Pó

Os ensaios de viabilidade foram avaliados em intervalos de dois meses, com duração de seis meses. O protocolo de avaliação de viabilidade utilizado foi: 0,1 g de

bioinoculante em pó adicionado em 5 mL de solução NaCl 0,85% estéril em tubos vedados de 5 mL. O sistema foi mantido sob agitação constante com giros de 360° a 30 rpm, por 2 horas a 50°C. Os ensaios foram realizados em triplicata. Em seguida, uma alíquota dessa suspensão foi submetida ao procedimento de diluição seriada, e diferentes diluições foram plaqueadas em meio TSB ágar (spread-plate). As placas foram mantidas em câmara BOD por 24h a 30°C, e então foi realizado a contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC).

O cálculo para determinação de UFC/g do pó secante pelo método de contagem em placa de Petri foi realizado pela seguinte equação 1:

$$\frac{UFC}{g} = \frac{N \times FD \times diluição \times volume\ de\ extração}{massa\ seca\ extração} \quad (1)$$

Sendo:

N = número médio de colônias das três placas na diluição selecionada;

FD = fator de diluição;

Diluição = diluição seriada em que a contagem das colônias em placa é obtida;

Volume de extração = 5 mL;

Massa seca extração = 0,1g.

Neste trabalho, visando maior aproveitamento do material, as placas de Petri foram divididas em quatro partes, nas quais o volume pipetado foi de 20 µl. Por essa razão, o *FD* é uma constante obtida através da equação 2:

$$FD = \frac{volume\ total}{volume\ pipetado} = \frac{1000\mu l}{20\ \mu l} = 50 \quad (2)$$

4.5. Liberação Convencional e Via Hidrólise Enzimática

Para avaliar a liberação dos *Bacillus* encapsulados na matriz de amido e carvão, o protocolo utilizado foi similar ao utilizado no item 4.4, no qual 0,1g de bioinoculante em pó foi adicionado em 5 mL de solução NaCl 0,85% estéril. Para avaliar a liberação convencional foi utilizada somente a solução salina. Já para a análise via hidrólise enzimática foi utilizado as enzimas doadas pela Novozymes, BAN® 480 LS (alfa-amilase que hidrolisa rapidamente o amido gelatinizado) e GlucoGo 2x (glucoamilase (AMG) que tem capacidade de quebrar as ligações α-1,4 e

α -1,6 das cadeias de amilopectina). As enzimas foram adicionadas na solução salina na concentração de 1 μ L de cada enzima/mL de solução salina. Para ambas as análises, o sistema foi mantido sob agitação constante com giros de 360° a 30 rpm, por 2 horas a 50°C. Os ensaios foram realizados em triplicata. Em seguida, uma alíquota de cada amostra passou pelo procedimento de diluição seriada, e diferentes diluições foram plaqueadas em meio TSB-ágar (técnica spread-plate). As placas foram mantidas em câmara BOD por 24h a 30°C para então proceder a contagem das UFC.

4.6. Caracterizações

A caracterização morfológica superficial dos materiais foi realizada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (JSM-6510, JEOL). Os materiais foram colocados em stubs de alumínio, fixados em fitas de carbono e revestidos com uma fina camada de ouro em uma câmara de ionização (BALTEC Med. 020). A imagem por MEV foi realizada usando o modo elétron secundário e as micrografias foram tiradas em diferentes magnificações.

A caracterização química dos materiais foi obtida por Espectroscopia Infravermelha de Transformada de Fourier (FTIR), usando um espectrofotômetro Bruker RAM II, modelo Vertex 70 equipado com acessório de reflectância atenuada total (ART) (Bruker Scientific Instruments, EUA). O espectro foi obtido no intervalo entre 4000 e 400 cm^{-1} para um total de 32 varreduras por amostra e com uma resolução de 2 cm^{-1} .

Além disso, os materiais foram caracterizados por difração de raios-X (DRX) usando um difratômetro XRD-6000 (Shimadzu) operando com radiação de Cu K α ($\lambda = 0,1546 \text{ nm}$), na tensão de 30 kV e corrente 40 mA. A intensidade relativa dos picos de difração foi registrada na faixa angular 2θ de 4–70°, usando uma velocidade de varredura contínua de 2° min^{-1} .

O comportamento térmico dos materiais foi avaliado por Análise Termogravimétrica (TGA), utilizando o equipamento TA, modelo SDT650, seguindo as condições de 10°C/min de 25 - 600°C sob fluxo de ar 50 mL/min em um cadinho de alumina.

4.7. Recobrimento das Sementes (TSI)

Para o recobrimento das sementes foi utilizado o Tratamento de Sementes Industrial (TSI). Inicialmente, para produção do TSI tradicional, 1 kg de sementes foi adicionado à drageadeira. Com as sementes sob agitação constante, 3 mL do inseticida Cropstar foi adicionado até a secagem (~1 min), seguido da adição de 1 mL do fungicida Maxin também até secagem (~1 min) e 2 mL do polímero comercial (Laborsan) e, por fim, 1 g do pó secante foi adicionado, para garantir que as semente não fiquem com umidade residual atrapalhando o seu processo de germinação. Nas amostras dos TSI produzidos com o inoculantes microbianos foram realizadas as mesmas etapas de recobrimento, porém o pó secante foi substituído pelo pó do inoculante microbiano.

Para avaliar o potencial de proteção que o encapsulamento pode proporcionar ao microrganismo, foi testado também o TSI contendo esporos livres. Nessas amostras, o pó secante foi substituído pela suspensão em pó de *B. megaterium* (B119) e *B. thuringiensis* (B116) puros. Após estes procedimentos, parte das sementes foram pesadas de acordo com a massa de 100 sementes (previamente estabelecida, ~14g) e armazenadas a temperatura ambiente, em tubos falcons de 50 mL para serem utilizadas nos ensaios de viabilidade. A outra parte das sementes foi armazenada em sacos de papel kraft, para utilização nos ensaios de germinação. O protocolo de revestimento das sementes foi baseado em diretrizes comerciais e adaptado para simular processos industriais (Accinelli *et al.*, 2016; Brasil, 2009).

4.8. Viabilidade dos *Bacillus* nas Sementes Revestidas.

Os ensaios de viabilidade das sementes foram avaliados a cada dois meses, em tempo “zero” (1 dia após a preparação do pó), dois, quatro e seis meses. O protocolo para avaliação da viabilidade utilizado foi: aproximadamente 100 sementes adicionadas em 100 mL de solução salina NaCl 0,85% estéril em erlenmeyers de 500 mL. O sistema foi mantido sob agitação constante em Shaker a 250 rpm, por 30 minutos a 25°C. Os ensaios foram realizados em triplicata. Em seguida, a amostra passou pelo protocolo de diluição seriada e plaqueamento em meio TSB ágar. As

placas foram mantidas em câmara BOD por 24h a 30°C para então proceder a contagem das células (metodologia adaptada Brasil, 2009).

O cálculo para determinação de UFC/semente é descrito na equação 3:

$$\frac{UFC}{semente} = \frac{N \times diluição \times FD \times volume\ de\ extração}{n^{\circ}\ de\ sementes} \quad (3)$$

Sendo:

N = número médio de colônias das três placas na diluição selecionada;

Diluição = diluição seriada em que a contagem das colônias em placa é obtida;

FD = fator de diluição;

Volume de extração = volume da solução extratora de células (100ml);

Nº de sementes = 100 sementes.

4.9. Ensaio de Germinação

No teste de germinação foram utilizadas as sementes de soja revestidas com o pó secante comercial e as revestidas com os bioinoculantes produzidos. O teste foi realizado logo após o revestimento (tempo zero) e após três meses de armazenamento das sementes. Os testes foram instalados com dez repetições de 15 sementes por rolo de papel de germinação, umedecidos com água deionizada, à temperatura de 25°C por sete dias. Durante o experimento, foi adicionada água deionizada estéril diariamente para manter a umidade e com fotoperíodo de 7h de luz por dia. Na contagem final foi contabilizado o percentual de sementes germinadas (SG), através da equação 4:

$$SG = \frac{\text{número de sementes germinadas}}{\text{total de sementes}} \times 100 \quad (4)$$

4.10. Análise Estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata e os valores obtidos foram expressos em termos de média \pm desvio padrão. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey (5% de significância) para comparação das médias.

5. Resultados e Discussão

5.1. Liberação Convencional e Via Hidrólise Enzimática

As formulações encapsuladas para o revestimento de sementes devem fornecer condições para manter o microrganismo vivo por mais tempo, e que em contato com o solo, permita a liberação e seu desenvolvimento. Os resultados referentes à liberação das diferentes cepas dos *Bacillus* encapsulados são apresentados na Tabela 1. A concentração de células viáveis na liberação convencional atinge 10^8 UFC g^{-1} , em todas as amostras, aproximando-se dos resultados obtidos por meio da hidrólise enzimática e da quantidade total de microrganismo inicial (aproximadamente 10^9 UFC/g de sólido). Esses dados sugerem que a liberação dos microrganismos encapsulados é eficiente, ou seja, a matriz não encapsula irreversivelmente o esporo, eliminando a necessidade de aplicação adicional de enzimas para degradar o material, permitindo a liberação e posterior crescimento do microrganismo.

Tabela 1 – Liberação do microrganismo encapsulado em condições convencionais e por hidrólise enzimática

Microrganismo	Concentração (UFC g^{-1})	
	Liberação convencional	Liberação hidrolisada
B119	$4,6 \times 10^8$ b	$3,8 \times 10^9$ a
B116	$3,1 \times 10^8$ b	$1,7 \times 10^9$ a,b
B119 + B116	$7,1 \times 10^8$ a,b	$1,0 \times 10^9$ a,b

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

5.2. Shelf-life dos Biocompósitos em pó

Além de avaliar a liberação dos microrganismos encapsulados, um aspecto importante é avaliar a manutenção da viabilidade durante o armazenamento. Os resultados apresentados na Tabela 2 demonstram que todos os biocompósitos, armazenados na forma de pó, ao longo dos seis meses de estocagem, descaíram apenas uma ordem de grandeza do valor inicial, atingindo pelo menos a concentração de 10^8 UFC g^{-1} .

Tabela 2 – Tempo de prateleira dos biocompósitos em pó

Microrganismo	Concentração (UFC g^{-1})			
	0	2 meses	4 meses	6 meses
B119	$2,7 \times 10^9$ ^a	$2,1 \times 10^9$ ^a	$4,5 \times 10^8$ ^b	$2,5 \times 10^8$ ^b
B116	$2,7 \times 10^9$ ^a	$7,9 \times 10^9$ ^a	$3,2 \times 10^8$ ^b	$1,8 \times 10^8$ ^b
B119 + B116	$4,9 \times 10^9$ ^a	$1,2 \times 10^9$ ^a	$6,6 \times 10^8$ ^b	$1,7 \times 10^8$ ^b

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Os resultados mostram que não houve diferenças significativas entre os tratamentos. O desempenho dos biocompósitos pode estar relacionado tanto à presença do amido quanto do carvão, uma vez que ambos podem ser utilizados como fonte de carbono pelas bactérias (Hoyos-Leyva *et al.*, 2018). Esses resultados indicam que as formulações propiciam a sobrevivência dos microrganismos, sem perdas consideráveis na viabilidade das células durante o processo. Os trabalhos de Rohman *et al.* (2020) e Khlibsuwan *et al.* (2018) apontam que o grande potencial do amido em reter células auxilia o encapsulamento e sobrevivência dos microrganismos.

5.3. Caracterizações

A Microscopia Eletrônica de Varredura foi realizada para caracterizar os materiais em relação à morfologia superficial. A Figura 1 apresenta a caracterização do pó de amido e carvão e da formulação contendo amido, carvão e esporos de *B. thuringiensis* (B116) e *B. megaterium* (B119).

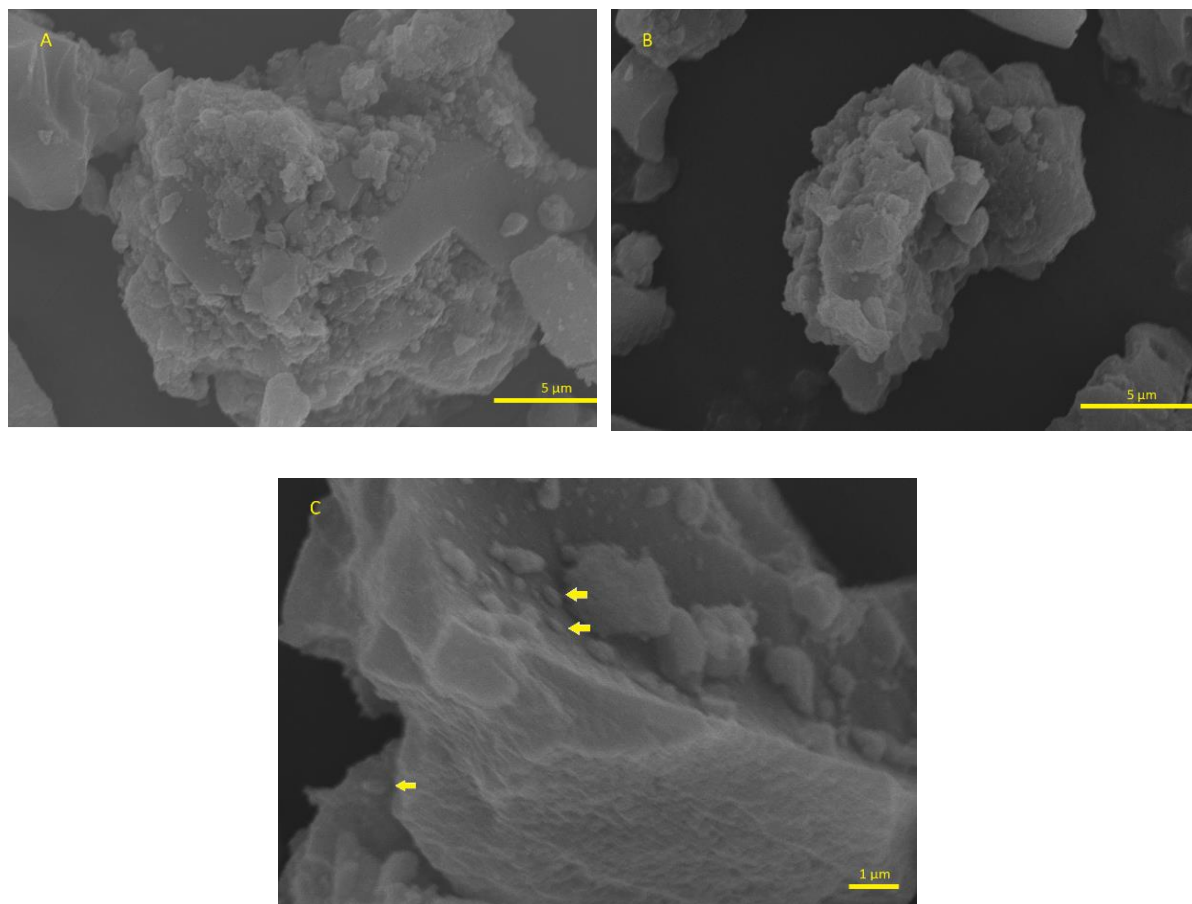


Figura 2 – Imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) em diferentes magnificações.

Na imagem: A) Formulação Amido + Carvão. B) Formulação Amido + Carvão + B119/B116. C) Formulação Amido + Carvão + B119/B116, evidenciando os esporos dos microrganismos na formulação. Nas imagens é possível observar estruturas mais lisas do carvão misturadas com grumos provenientes do amido. Devido ao processo de moagem aplicado no filme, também foi possível observar tamanhos bem irregulares em relação as partículas que formam o pó. As células vegetativas de *Bacillus* apresentam forma de bastonetes com tamanho aproximado entre 2 a 6 μm e 1 μm de diâmetro (Errington; Aart, 2020), levando em consideração o tamanho reduzido do esporo em relação a células vegetativas, nas imagens MEV obtidas na maior magnificação, foi possível observar alguns prováveis esporos aderidos à superfície dos filmes, indicados pelas flechas. Para confirmar a presença desses esporos, tanto na superfície quanto no interior do filme (esporos encapsulados),

sugere-se que as imagens de MEV sejam refeitas com técnicas de otimização de parâmetros adequadas, como o aumento de contraste e maior brilho utilizando metais pesados, o vapor de óxido de ósmio, por exemplo, serve de agente de contraste para localizar células, pois fornecem ligações diferenciais em lipídios, que geralmente estão localizados nas membranas e compartimentos celulares, além de imagens provenientes do filme fraturado (Joubert *et al.*, 2016; Fedorenko *et al.*, 2019).

A Figura 3 apresenta os resultados de FTIR dos materiais puros e dos pós inoculantes com e sem microrganismos. Essa análise indica as vibrações moleculares que permitem a identificação de grupos funcionais e as interações moleculares.

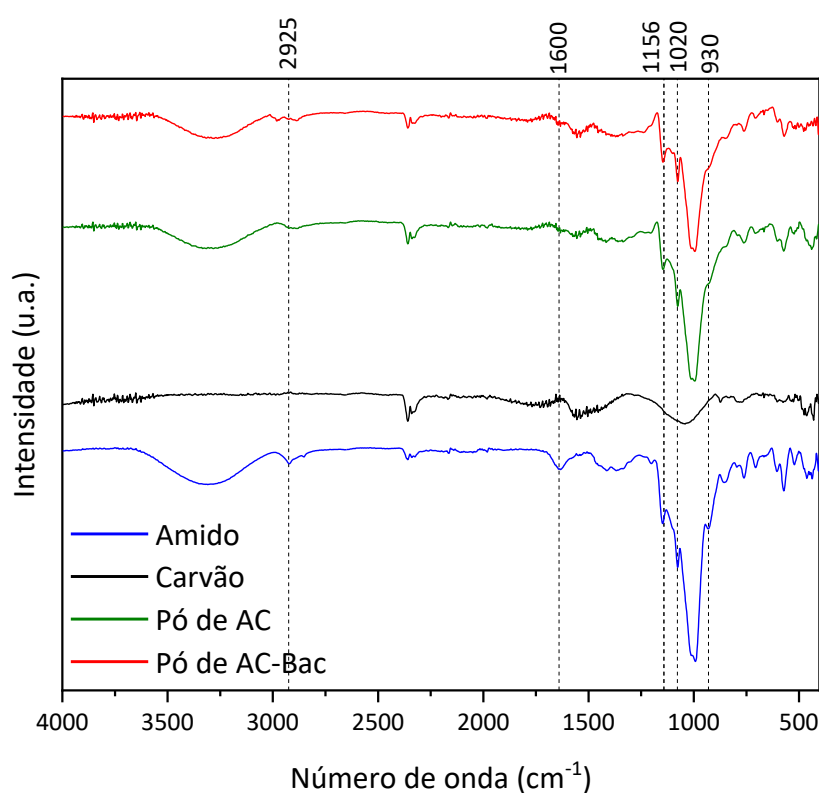


Figura 3 – Espectros de FTIR dos materiais puros e dos pós dos inoculantes.

Para o amido, existe uma correlação entre os picos do FTIR, a proporção de amilopectina e a quantidade de duplas hélices dos grânulos de amido. A região entre 3500 - 3000 cm^{-1} está relacionada às vibrações de estiramento das ligações de hidroxila (OH). As bandas que aparecem em 2920-2930 cm^{-1} estão relacionadas a vibração do CH_2 , e diminuem a intensidade no material que teve o carvão adicionado. As bandas referentes a ligações de C-H estão em torno de 1300 - 1200 cm^{-1} . A presença de ligações C-O resulta em bandas entre 1500 - 1000 cm^{-1} . Os picos em

1156 e 1020 cm^{-1} são característicos da ligação C-O do anel de glicose anidra. As bandas em 930 cm^{-1} estão associadas à ligação α (1-4) glicosídica (Govindaraju *et al.*, 2019). Um pico isolado em torno de $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ está relacionado a forte ligação à água presente no amido, devido a sua natureza higroscópica (Pozo *et al.*, 2018). Para o carvão, as bandas em torno de 1800 - 1600 cm^{-1} indicam ligações duplas C=O e ligações duplas C=C são observadas nas bandas entre 1600 - 1400 cm^{-1} . As bandas em 2900 – 2800 cm^{-1} são referentes ao estiramento das ligações C-H (Pavia, Lampman e Kriz, 2001). Comparando os materiais de carvão e amido sem e com o microrganismo, é possível notar o aparecimento do pico em 1235 cm^{-1} , correspondente às vibrações no plano da amida III, devido ao estiramento C-N e à deformação N-H o grupamento amida pode estar presente nos aminoácidos que constituem os microrganismos (Bet, Goissis e Lacerda, 2001). Os pós contendo amido e carvão apresentam picos menos intensos se comparados ao filme de amido puro, indicando a influência do carvão na composição.

A Figura 4 indica os padrões de difração de raios-X (DRX) para os materiais. Essa análise estuda a cristalinidade dos materiais. Materiais cristalinos apresentam picos com alta intensidade, enquanto estruturas amorfas geram bandas (Silva *et al.*, 2019).

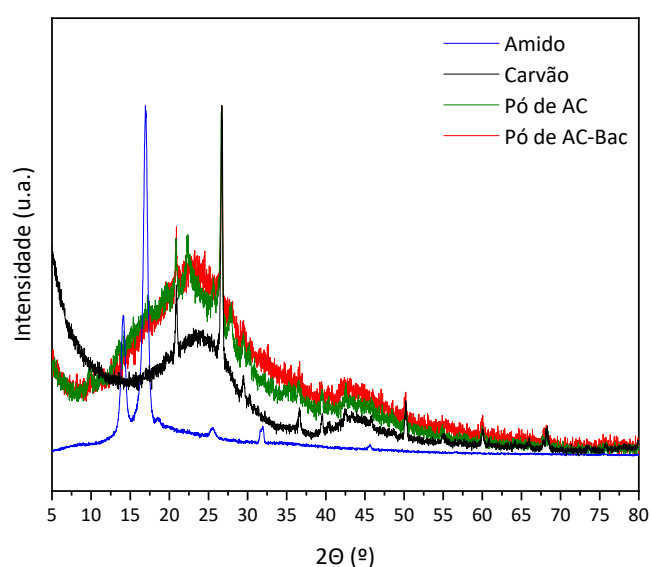


Figura 4 – Espectros de DRX dos materiais puros e dos inoculantes em pó.

No geral, todos os materiais analisados são mais amorfos. No difratograma é possível analisar os picos característicos do amido de milho nos ângulos de difração

2θ em aproximadamente 15° e 20° (Pozo *et al.*, 2018). Os padrões de cristalinidade do amido variam conforme o comprimento das cadeias de amilopectina e a presença de água. As farinhas de milho e trigo apresentam padrões de cristalinidade tipo A (Lima *et al.*, 2012). Esses picos desapareceram nos filmes com a adição de carvão e com a adição do carvão e da bactéria, indicando que o processo de gelatinização do amido foi mais eficaz, provavelmente o controle de temperatura e a homogeneização naquelas bateladas foram melhores no preparo dos géis, os grânulos absorveram melhor água, as moléculas de amilose saíram dos grânulos inchados, desestruturando ainda mais as cadeias cristalinas, deixando o material mais amorfo.

Em relação ao carvão, os resultados estão de acordo com Silva *et al.* (2019), que indica o carvão como um material com base amorfa, porém com incidência de alguns picos de cristalinidade. A formulação de amido e carvão, com e sem microrganismo, apresenta uma estrutura amorfa, mantendo os picos de cristalinidade provenientes do carvão.

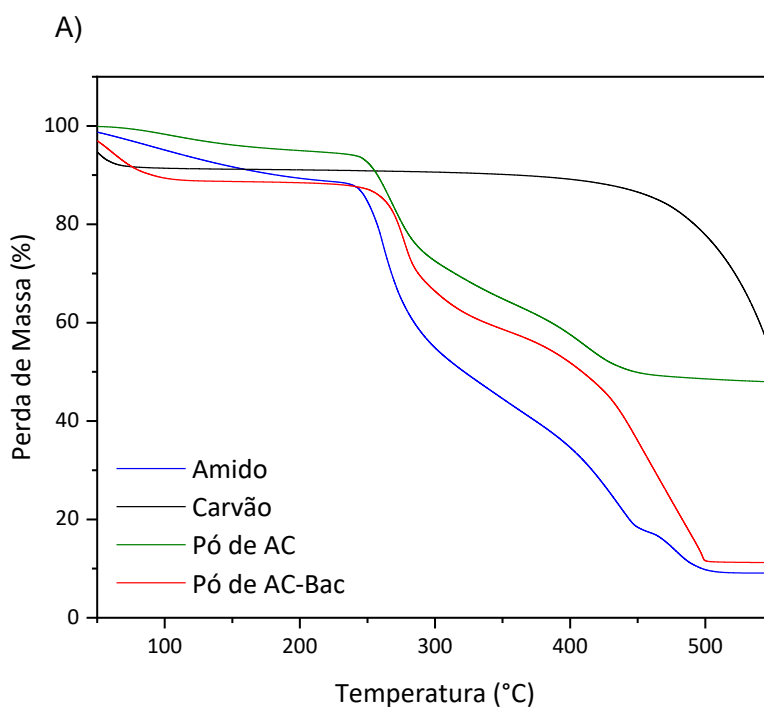
A Análise Termogravimétrica (TGA) indica a perda de massa em função da temperatura e a estabilidade térmica das amostras. A Figura 5 mostra os resultados da análise do amido, do carvão e dos pós produzidos com e sem microrganismos. A partir dos dados de perda de massa (Figura 4A) foi possível determinar a temperatura média de degradação e o percentual de materiais inorgânicos das amostras, e da curva derivada do termograma (Figura 4B) foi possível determinar as temperaturas nas quais a velocidade de degradação é máxima para cada uma das amostras.

O amido de milho presente nas amostras apresenta dois principais estágio de perda de massa. O primeiro relaciona-se com a evaporação/desidratação do amido e ocorre entre 50°C até 150°C . O segundo estágio relaciona-se com a degradação térmica e desidratação química do amido, iniciando-se por volta dos 240°C , com temperatura de degradação máxima de 260°C , finalizando por volta dos 490°C (Lima *et al.*, 2012). É possível observar duas temperaturas de decomposição no DTG, a temperatura mais baixa relacionada a cisão de cadeias longas, e a segunda em temperatura mais alta envolvendo a decomposição dos anéis de glicose. Além disso, no pó contendo apenas amido há o aparecimento de picos adicionais na DTG por volta dos 480°C , provavelmente relacionado às estruturas mais cristalinas, corroborando com os dados encontrados no espectro de raio-X. Regiões mais cristalinas possuem maior teor de amilopectina, que requerem temperaturas mais altas para degradação, devido ao seu maior peso molecular e às microestruturas mais estáveis, que

necessitam de mais energia para as quebras das cadeias moleculares. O último estágio de carbonização ocorre na temperatura acima de 500°C (Liu *et al.*, 2013).

É possível observar que a temperatura de degradação máxima do amido ocorre por volta de 260°C, enquanto a perda de massa que ocorre com o carvão inicia-se apenas acima de 450°C. De acordo com Li e Chen (2018), o número de picos, a temperatura de combustão e a intensidade dos picos obtidos com DTG variam conforme a composição do carvão utilizado.

O percentual de cinzas finais obtido na amostra de amido e carvão, condiz com a porcentagem encontrada para o amido e para o carvão, pois o pó inoculante tem a proporção de 1:1. Entretanto, o mesmo não ocorre com a amostra contendo o microrganismo. Apesar do perfil de degradação das amostras condizerem com o encontrado na literatura, para elucidar o teor de cinzas o ideal seria a repetição da análise para o pó do inoculante microbiano.



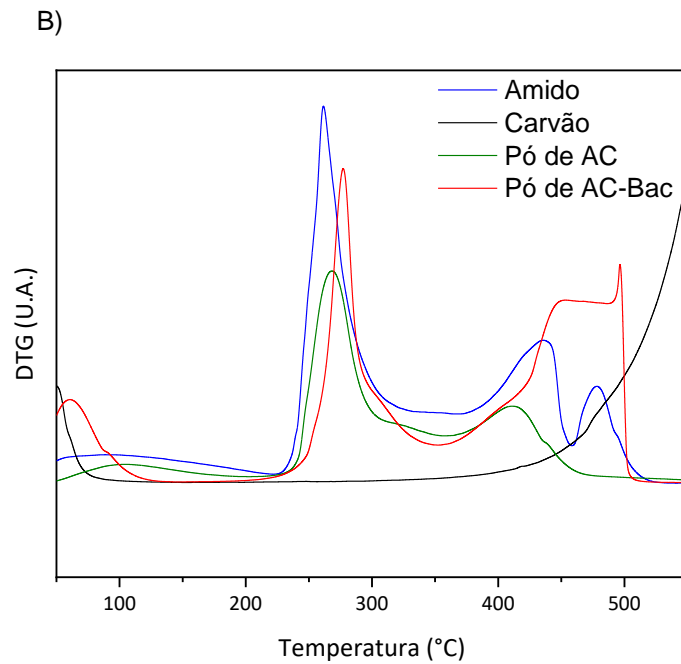


Figura 5 – Termogramas dos materiais puros e dos pós inoculantes. A) Perfil de perda de massa e B) DTG.

5.4. Viabilidade das Sementes Revestidas

Considerando a possibilidade de aplicação dos biocompósitos no revestimento das sementes de soja, outro ponto importante é avaliar a manutenção da viabilidade dos microrganismos nas sementes ao longo do tempo, uma vez que são aplicadas camadas de outros químicos que podem apresentar certo grau de toxicidade para o microrganismo.

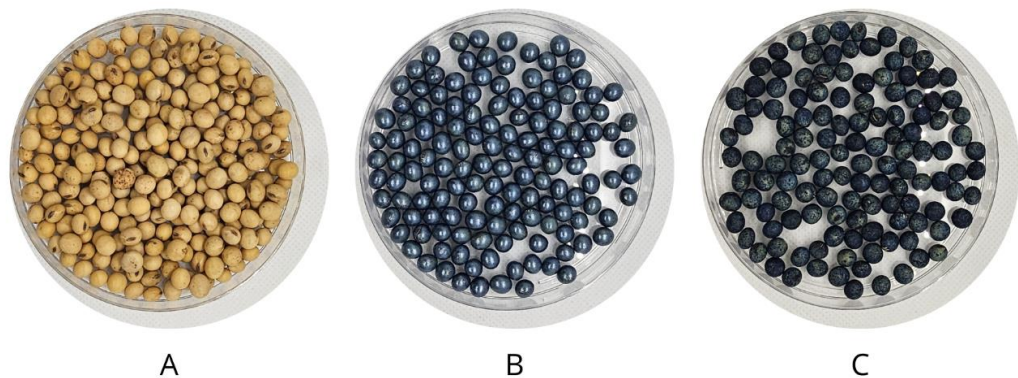


Figura 6 - Sementes de Soja (A: sem revestimento; B: revestimento TSI tradicional; C revestimento de Amido/Carvão).

A Tabela 3 apresenta os dados de viabilidade dos esporos das cepas de *Bacillus* encapsulados na matriz de amido/carvão e dos esporos livres aplicados diretamente na semente. Como a mesma quantidade de gramas de esporos foi adicionada nos dois tratamentos, a concentração de esporos nas sementes contendo de microrganismos livres apresenta uma concentração inicial de UFC/semente maior porque contém apenas esporos, enquanto o pó inoculante contém carga de amido e carvão.

Tabela 3 – Viabilidade (UFC/semente) das sementes revestidas no armazenamento

Revestimento	Microrganismo	0 meses	2 meses	4 meses	6 meses
Amido/ Carvão/Bac	B119	$1,7 \times 10^5$ ^b	$2,8 \times 10^5$ ^a	$1,2 \times 10^5$ ^b	$1,8 \times 10^5$ ^b
	B116	$1,8 \times 10^5$ ^a	$2,0 \times 10^5$ ^a	$9,7 \times 10^4$ ^{a,b}	$5,8 \times 10^4$ ^b
	B119 + B116	$1,4 \times 10^5$ ^b	$2,8 \times 10^5$ ^a	$1,3 \times 10^5$ ^b	$1,4 \times 10^5$ ^b
MO livre	B119	$2,8 \times 10^6$ ^A	$1,9 \times 10^6$ ^B	$1,8 \times 10^6$ ^B	$1,2 \times 10^4$ ^C
	B116	$7,3 \times 10^6$ ^A	$2,1 \times 10^6$ ^B	$3,3 \times 10^6$ ^B	$7,9 \times 10^3$ ^C

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Letras minúsculas e maiúsculas indicam grupos diferentes de análise.

As sementes nas quais o pó secante adicionado continha os esporos encapsulados na matriz de amido e carvão mantiveram as concentrações iniciais de UFC/semente ao longo dos seis meses de armazenamento. A maior estabilidade da viabilidade no armazenamento ocorreu com os esporos de *B. megaterium* (B119) e com a mistura das duas cepas, mantendo a concentração de 10^5 ao longo dos seis meses de armazenamento. Já as bactérias livres acabaram morrendo ao longo dos 6 meses de armazenamento, reduzindo 2 e 3 ordens de grandeza para a cepa B119 e B116, respectivamente. Indicando que os insumos utilizados no TSI ao longo do tempo são prejudiciais ao microrganismo, e o revestimento a base de amido e carvão protege os esporos, mantendo a viabilidade do microrganismo.

Os esporos das cepas de *Bacillus* encapsulados nas matrizes de amido e carvão apresentam uma viabilidade estendida, tanto no armazenamento dos biocompósitos em pó quanto no armazenamento das sementes com revestimento. O amido e o carvão, além de favorecerem o encapsulamento dos esporos, podem atuar

como uma barreira protetora para o microrganismo durante a aplicação no revestimento das sementes (Hoyos-Leyva *et al.*, 2016; Vassilev *et al.*, 2020).

5.5. Germinação

Considerando a germinação como um fator que impacta diretamente o rendimento das culturas, é importante determinar se os recobrimentos realizados nas sementes influenciam na capacidade de germinação das sementes de soja. A Tabela 4 mostra a porcentagem de germinação das sementes com os tratamentos no tempo 0 e após três meses de armazenamento.

Tabela 4 – Porcentagem germinação no tempo 0 e 3 meses

Revestimento	0	3 meses
TSI Tradicional	92,1 ^a	81,4 ^b
Amido/Carvão/B119	91,4 ^a	86,5 ^b
Amido/Carvão/B116	93,2 ^a	84,3 ^b
Amido/Carvão/B119 + B116	94,5 ^a	86,0 ^b

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Independente do revestimento aplicado, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na germinação inicial das sementes. Isso indica que a aplicação do inoculante microbiano não influenciou negativamente o processo da germinação. Também não houve prejuízos na germinação das sementes após 3 meses de estocagem, indicando que o inoculante microbiano não impediu o processo de respiração da semente e não aumentou a umidade, fatores que contribuiriam negativamente para a germinação da semente.



Figura 7 - Germinação Soja (A: logo após o revestimento; B: após três meses de armazenamento).

Esses resultados preliminares da germinação indicam que os componentes do inoculante tem características adequadas para ser usado no revestimento nas sementes. Conforme indica Cardarelli *et al.* (2022) a aplicação do revestimento nas sementes permite o contato entre os microrganismos e as raízes logo no momento da germinação e seu benefício às plantas surge nos estágios iniciais de desenvolvimento.

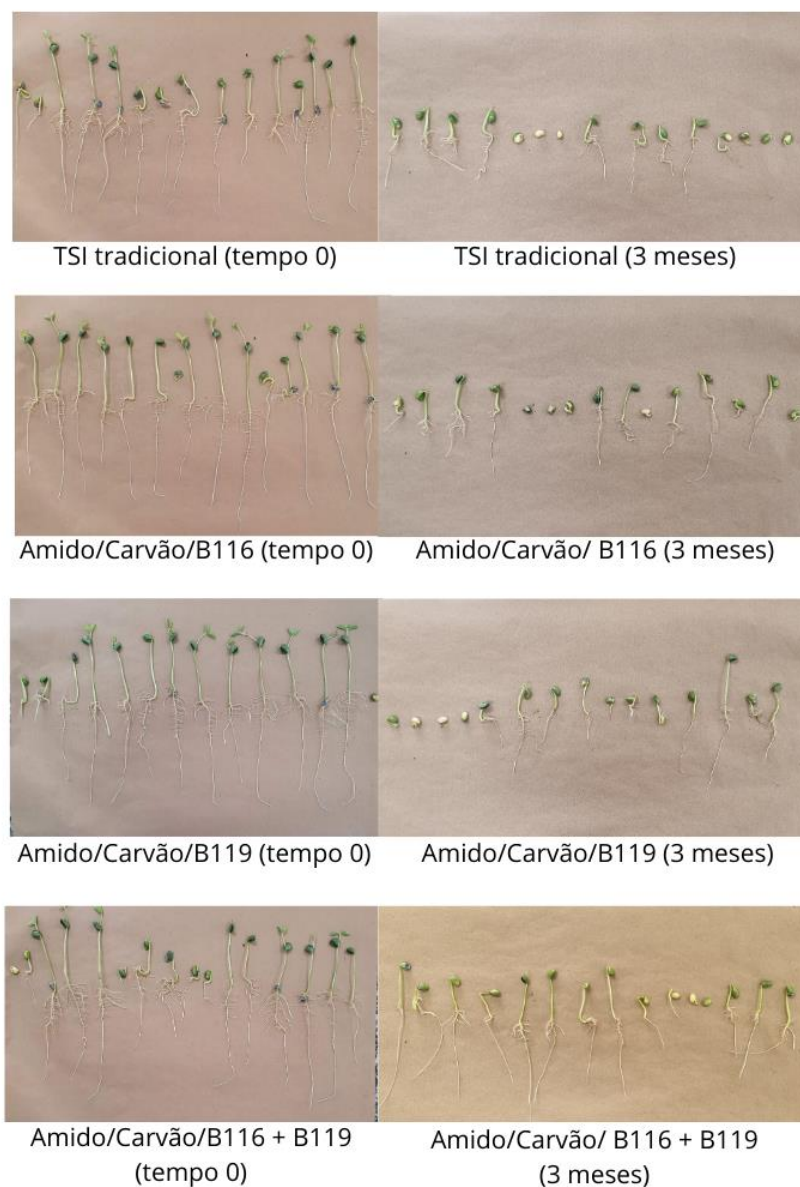


Figura 8 - Germinação das sementes revestidas no tempo "zero" e após três meses de armazenamento.

6. Conclusão

Os resultados apresentados destacam a eficácia no desenvolvimento de um inoculante microbiano à base de amido e carvão para o encapsulamento dos *Bacillus*. Os filmes produzidos apresentaram capacidade de liberar grande concentração de células durante o ensaio de liberação, em comparação com a concentração de esporos inicialmente adicionada. No que se refere às análises físico-químicas, as micrografias de MEV em ampliação de 10.000 vezes revelaram a presença de esporos

de *Bacillus* nas matrizes de encapsulamento. Adicionalmente, os resultados obtidos por DRX sugerem que o processo de gelatinização do amido nos inoculantes produzidos foi eficaz, visto que os picos de cristalinidade característicos da amilopectina do amido de milho desapareceram nas amostras dos inoculantes.

Ao longo dos seis meses de armazenamento dos biocompósitos em pó, a formulação que continha a mistura das duas cepas de *Bacillus* demonstrou o maior número de células viáveis. No entanto, todas as amostras alcançaram, pelo menos, a concentração de 10^8 UFC/g, indicando que a formulação foi eficaz em manter a viabilidade dos microrganismos ao longo do tempo. A aplicação do filme para o tratamento de sementes também não influenciou negativamente a germinação da soja. Além disso, a formulação aplicada no revestimento das sementes manteve concentrações superiores de células viáveis em comparação com as sementes revestidas apenas com esporos livres, ao longo dos seis meses avaliados. Esses resultados ressaltam a aplicabilidade da formulação como uma estratégia eficiente para o tratamento de sementes.

7. Referências Bibliográficas

- ACCINELLI, C. et al. A liquid bioplastic formulation for film coating of agronomic seeds. **Crop Protection**, v. 89, p. 123–128, nov. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.07.010>
- ALORI, E T; GLICK, B R; BABALOLA, O O. Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture. **Frontiers in Microbiology** |, Suíça, v. 8, n. 971, p. 1-8, jun./2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971>
- BASHAN, Y. et al. Advances in Plant Growth-promoting Bacterial Inoculant Technology: Formulations and Practical Perspectives (1998–2013). **Plant Soil**, México, v. 378, p. 1-33, nov./2013. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>
- BERNINGER, T. et al. Maintenance and assessment of cell viability in formulation of non-sporulating bacterial inoculants. **Microbial Biotechnology**, Áustria, v. 11, n. 2, p. 277-301, mar./2018. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12880>
- BET, M. R.; GOISSIS, G.; LACERDA, C. A. Characterization of Polyanionic Collagen Prepared by Selective Hydrolysis of Asparagine and Glutamine Carboxamide Side Chains. **Biomacromolecules**, v. 2, n. 4, p. 1074–1079, 1 dez. 2001. <https://doi.org/10.1021/bm0001188>
- BRASIL, 2009. Ministério da agricultura e reforma agrária. Análise de sementes revestidas, in: regras para análise de sementes. Mapa/acs, Brasília, pp. 325–334.

- CAMARGO, F. R. T. et al. Viability and vigor of soybean seeds as a result of industrial seed treatment and stored in different environments. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 43, n. 6, p. 2607–2628, 16 dez. 2022. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2022v43n6p2607>
- CARDARELLI, M. et al. Seed Treatments with Microorganisms Can Have a Biostimulant Effect by Influencing Germination and Seedling Growth of Crops. **Plants**, v. 11, n. 3, p. 259. <https://doi.org/10.3390/plants11030259>
- EGAMBERDIEVA, D. et al. Potential Effects of Biochar-Based Microbial inoculants in Agriculture. **Environmental Sustainability**, Alemanha, v. 1, n. 2, p. 19-24, jun./2018. <https://doi.org/10.1007/s42398-018-0010-6>
- ERRINGTON, J.; AART, L. T. V. D. Microbe Profile: Bacillus subtilis: model organism for cellular development, and industrial workhorse: This article is part of the Microbe Profiles collection. **Microbiology**, v. 166, n. 5, p. 425–427, 1 maio 2020. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000922>
- FASUSI, O. A.; CRUZ, C.; BABALOLA, O. O. Agricultural Sustainability: Microbial Biofertilizers in Rhizosphere Management. **Agriculture**, Suíça, v. 11, n. 163, p. 1-19, fev./2021. <https://doi.org/10.3390/agriculture11020163>
- FEDORENKO, G. M. et al. Method of preparation, visualization and ultrastructural analysis of a formulation of probiotic Bacillus subtilis KATMIRA1933 produced by solid-phase fermentation. **MethodsX**, v. 6, p. 2515–2520, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.10.030>
- FITCH-VARGAS, P. R. et al. Physicochemical and Microstructural Characterization of Corn Starch Edible Films Obtained by a Combination of Extrusion Technology and Casting Technique. **Journal of Food Science**, México, v. 81, n. 9, p. 2224-2232, ago/2016. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13416>
- GOVINDARAJU, I. et al. Microscopic and spectroscopic characterization of rice and corn starch. **Microscopy Research and Technique**, v. 83, n. 5, p. 490–498, maio 2020. <https://doi.org/10.1002/jemt.23437>
- GUO, Y. et al. Starch-based Materials Encapsulating Food Ingredients: Recent Advances in Fabrication Methods and Applications. **Carbohydrate Polymers**, China, v. 270, n. 118358, p. 1-24, ago/2021. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118358>
- HOYOS-LEYVA, J. D. et al. Microencapsulation using starch as wall material: A review. **Food Reviews International**, v. 34, n. 2, p. 148–161, 17 fev. 2018. <https://doi.org/10.1080/87559129.2016.1261298>
- JOHN, R. P. et al. Bio-encapsulation of Microbial Cells for Targeted Agricultural Delivery. **Critical Reviews in Biotechnology**, Canadá, v. 31, n. 3, p. 211-226, jan./2011. <https://doi.org/10.3109/07388551.2010.513327>
- JOUBERT, L.-M. et al. Visualization of Aspergillus fumigatus biofilms with Scanning Electron Microscopy and Variable Pressure-Scanning Electron Microscopy: A

- comparison of processing techniques. **Journal of Microbiological Methods**, v. 132, p. 46–55, jan. 2017.
- KHLIBSUWAN, R.; TANSENA, W.; PONGJANYAKUL, T. Modification of alginate beads using gelatinized and ungelatinized arrowroot (*Tacca leontopetaloides* L. Kuntze) starch for drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 683–692, out. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.118>
- LATEEF, A. *et al.* Synthesis and Characterization of Zeolite Based Nanocomposite: An Environment Friendly Slow-Release Fertilizer. **Microporous and Mesoporous Materials**, Paquistão, v. 232, p. 174-183, jun./2016. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2016.06.02>
- LI, S.; CHEN, G. Thermogravimetric, thermochemical, and infrared spectral characterization of feedstocks and biochar derived at different pyrolysis temperatures. **Waste Management**, v. 78, p. 198–207, ago. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.05.048>
- LIMA, B. N. B. *et al.* Estudo do amido de farinhas comerciais comestíveis. **Polímeros**, v. 22, p. 486–490, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282012005000062>.
- LIU, X. *et al.* Thermal degradation and stability of starch under different processing conditions. **Starch - Stärke**, v. 65, n. 1–2, p. 48–60, jan. 2013. <https://doi.org/10.1002/star.201200198>
- LUO, W. *et al.* Embedding *Bacillus Velezensis* NH-1 in Microcapsules for Biocontrol of Cucumber Fusarium Wilt. **Applied and Environmental Microbiology**, China, v. 85, n. 9, p. 1-13, abr./2019. <https://doi.org/10.1128/AEM.03128-18>
- MA, Ying. Seed Coating with Beneficial Microorganisms for Precision Agriculture. **Biotechnology Advances**, China, v. 37, n. 7, p. 1-11, nov./2019. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107423>
- MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 1, p. 137, 30 abr. 2010. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2010v31n1p137>
- MAHANTY, T. *et al.* Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 4, p. 3315–3335, fev. 2017. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8104-0>
- OLIVEIRA, J. L. D. *et al.* Encapsulation Strategies for *Bacillus thuringiensis*: From Now to the Future. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, São Paulo, v. 69, n. 16, p. 4564-4577, abr./2021. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07118>
- PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S. Introduction to spectroscopy: A guide for students of organic chemistry. 3 ed. Australia: Brooks/cole, Thomson Learning, 2001.
- PEREIRA, T. D. S; BINOTTO, V. D. D. N; FAEZ, Roselena. Multilayer Films of CarboxymethylCellulose/Zeolite as Smart Materials for Macro and Micronutrients Delivery. **Microporous and Mesoporous Materials**, Araras, v. 302, n. 110195, p. 1-11, ago./2020. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2020.110195>

- PIRTTILÄ, A. M. *et al.* Biofertilizers and Biocontrol Agents for Agriculture: How to Identify and Develop New Potent Microbial Strains and Traits. **Microorganisms**, [s.l.], v. 9, n. 4, p. 1-17, abr./2021. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040817>
- POZO, C. *et al.* Study of the structural order of native starch granules using combined FTIR and XRD analysis. **Journal of Polymer Research**, v. 25, n. 12, p. 266, dez. 2018. <https://doi.org/10.1007/s10965-018-1651-y>
- RATNAYAKE, W. S.; JACKSON, D. S. Chapter 5 Starch Gelatinization. Em: **Advances in Food and Nutrition Research**. [s.l.] Elsevier, 2008. v. 55p. 221–268.
- ROHMAN, S. *et al.* Encapsulation of *Rhodopseudomonas palustris* KTSSR54 using beads from alginate/starch blends. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 138, n. 12, p. 50084, 20 mar. 2021. <https://doi.org/10.1002/app.50084>
- SIEBENEICHLER, E. *et al.* Influência de temperatura e taxas de aquecimento na resistência mecânica, densidade e rendimento do carvão da madeira de Eucalyptus cloeziana. **Ciência da Madeira (Brazilian Journal of Wood Science)**, v. 8, n. 2, p. 82–94, maio 2017.
- SILVA, I. C. *et al.* Caracterização, tratamento e utilização do carvão ativado para adequação de parâmetros físico-químicos de efluentes oleosos através da adsorção em banho finito. **Revista Principia - Divulgação Científica e Tecnológica do IFPB**, v. 1, n. 45, p. 171, 9 jul. 2019. <https://doi.org/10.18265/1517-03062015v1n45p171-179>
- SOUDEK, P. *et al.* Characteristics of Different Types of Biochar and Effects on the Toxicity of Heavy Metals to Germinating Sorghum Seeds. **Journal of Geochemical Exploration**, [s.l.], v. 182, n. 2, p. 157-165, nov./2017. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2016.12.013>
- SOUZA, R De; AMBROSINI, A; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and Molecular Biology**, Brasil, v. 38, n. 4, p. 401-419, mai./2015. <https://doi.org/10.1590/S1415-475738420150053>
- VASSILEV, N. *et al.* Formulation of Microbial Inoculants by Encapsulation in Natural Polysaccharides: Focus on Beneficial Properties of Carrier Additives and Derivatives. **Frontiers in Plant Science**, Espanha, v. 11, n. 270, p. 1-9, mar./2020. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00270>
- VELLOSO, C. C. V. *et al.* High yield of heat-resistant spores of *Bacillus megaterium* in bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 198, p. 109030, set. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2023.109030>
- VLAJKOV, V. *et al.* Bacillus-Loaded Biochar as Soil Amendment for Improved Germination of Maize Seeds. **Plants**, v. 12, n. 5, p. 1024, 23 fev. 2023. <https://doi.org/10.3390/plants12051024>
- WU, L. *et al.* Novel Routes for Improving Biocontrol Activity of Bacillus Based Bioinoculants. **Frontiers in Microbiology**, China, v. 6, n. 1358, p. 1-13, dez./2015.