



MATRIZ BIOPOLIMÉRICA DE ALGINATO E MUCILAGEM DE QUIABO PARA ENCAPUSLAÇÃO DE *BACILLUS VELEZENSIS* P1 COMO AGENTE DE BIOCONTROLE

Daiane K. Lanferdini¹; Vanessa T. da Rosa¹; Flávio F. Veras¹; Adriano Brandelli¹; Juliane E. Welke¹

1 Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
daiane.kraemer.lanferdini@gmail.com; juliane.welke@ufrgs.br

Palavras-Chave: controle biológico, antifúngico, fungicida.

Introdução

O uso de agrotóxicos é uma prática amplamente disseminada no controle de doenças fúngicas. Embora esses produtos sejam eficazes, seu uso intensivo pode causar impactos à saúde humana e ao meio ambiente. Por essa razão, a adoção de práticas mais sustentáveis para o manejo de fungos tem recebido crescente atenção (Ong-Artborirak *et al.*, 2022; Mora *et al.*, 2022). Entre as alternativas estão os métodos de controle biológico, baseados no uso de organismos antagonistas para reduzir a incidência ou a severidade de doenças.

As bactérias do gênero *Bacillus* spp. se destacam como um método de biocontrole para fungos, devido suas propriedades antagonistas, são encontradas principalmente no solo, e podem estabelecer uma relação simbiose com planta (Torres *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2022). Devido seu papel crucial, produtos comerciais à base de *Bacillus* spp. estão disponíveis no mercado para o controle fúngico, além de ser uma forma segura e aprovada por agências reguladoras nacionais e internacionais (Saxena *et al.*, 2019). A ação antagonista dessas bactérias acontece por diferentes mecanismos, tais como: competindo pelo espaço e nutrientes (carboidratos, compostos nitrogenados, Fe, Zn, Cu, entre outros), parasitismo e produção de metabólitos secundários (Wu *et al.*, 2021; Khadiri *et al.*, 2023; Nanjini *et al.*, 2022).

Apesar dos resultados promissores, o uso desses microrganismos no campo ainda é desafiadora. A exposição à radiação ultravioleta e as variações de temperatura e umidade podem reduzir a sobrevivência e a atividade metabólica das células. A encapsulação em matrizes biopoliméricas pode contribuir para a proteção do microrganismo, a manutenção de sua viabilidade e a obtenção de formulações mais adequadas à aplicação agrícola (Campos *et al.*, 2023).

O alginato de sódio é um polissacarídeo obtido de algas marrons e capaz de formar géis por reticulação iônica com cálcio (Colin *et al.*, 2024). Embora seja amplamente utilizado na imobilização microbiana, sua elevada porosidade pode favorecer a difusão precoce de células e metabólitos. A mucilagem de quiabo (*Abelmoschus esculentus*) é um biopolímero com elevada hidrofilicidade, viscosidade e capacidade de retenção de água. Sua incorporação



a sistemas de alginato pode modificar a estrutura da matriz e ampliar a proteção conferida ao microrganismo (Dantas *et al.*, 2021).

Neste contexto, este estudo teve como objetivo encapsular a cepa P1 de *B. velezensis* em uma matriz de alginato de sódio e mucilagem de quiabo e avaliar o impacto da encapsulação na sua atividade antifúngica contra sete fungos fitopatogênicos.

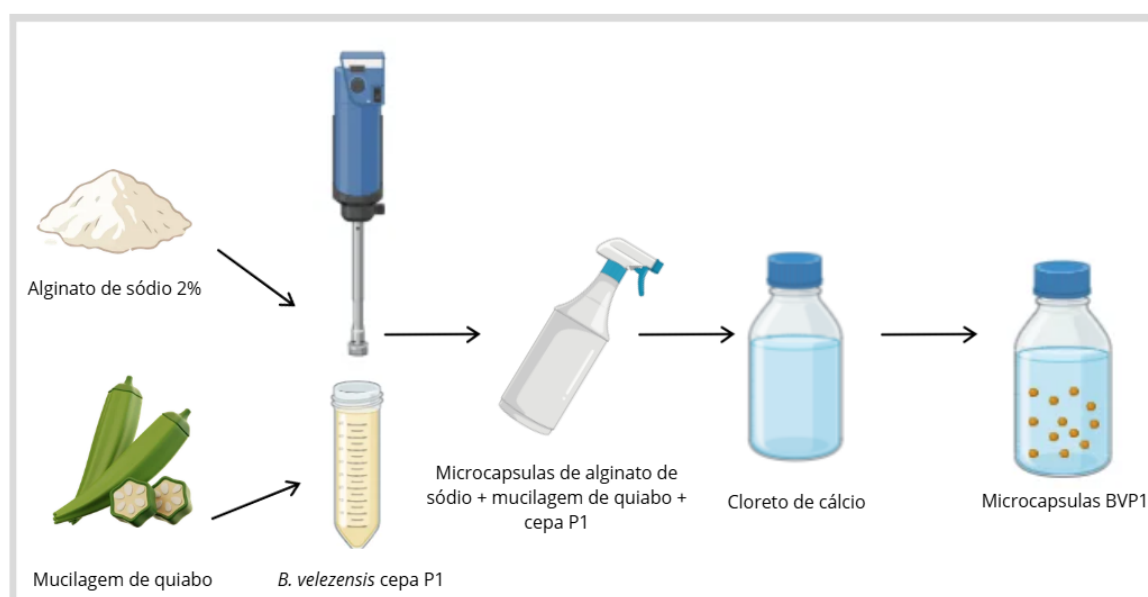
Material e Métodos

Neste estudo, foi utilizada a cepa *B. velezensis* P1, isolada do trato intestinal do peixe *Potamorhina latior*, proveniente da região Amazônica, Brasil (3°06'S, 60°01'W). A cepa P1 foi cultivada em caldo infusão cérebro-coração (BHI) a 37 °C por 24 h. Trinta mililitros do cultivo foram transferidos para tubos Falcon e centrifugados por 15 min a 4 °C e 10.000 rpm. A suspensão celular foi ajustada para 10⁹ UFC mL⁻¹.

Os isolados fúngicos *B. cinerea* B2PL11H, *C. acutatum* 44-17, *A. carbonarius* ITAL293, *A. niger* UD22, *A. flavus* M19, *A. westerdijkiae* SM22, e *P. expansum* LTQA01 utilizados neste estudo são da coleção do Laboratório de Toxicologia e Qualidade de Alimentos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os cultivos fúngicos foram feitos da seguinte maneira: em ágar batata-dextrose (BDA) por 7 dias à 25 °C, exceto para *B. cinerea*, que foi 14 dias à 20°C.

Para a encapsulação da cepa P1 (Figura 1), a suspensão celular contendo 10⁹ UFC mL⁻¹ foi homogeneizada em Ultra-Turrax (Ultra-Turrax® T25 Digital, elemento dispersor S25N-25G, IKA, Staufen, Alemanha) com alginato de sódio a 2% (m/v) e mucilagem de quiabo. A mistura foi extrudada em solução de cloreto de cálcio a 0,1 mol L⁻¹, utilizada como agente de reticulação para a formação das cápsulas contendo *B. velezensis* P1, denominadas BVP1.

Figura 1. Esquema de encapsulação das cepa P1 de *B. velezensis* em alginato de sódio e mucilagem de quiabo.





A condução dos ensaios para a avaliação do potencial de inibição do crescimento micelial da cepa P1 se deu da seguinte maneira: 200 μL das microcápsulas BVP1 e cepa P1 não encapsulada foram espalhadas em uma placa de petri contendo ágar BHI (base 1). A partir de um cultivo fúngico previamente cultivado um disco fúngico (5 mm) foi assepticamente recortado e posicionado em uma placa de petri contendo ágar BDA (base 2). As placas foram seladas com parafilme e incubadas por 5 dias à 25°C, exceto para *B. cinerea*, que foi 14 dias à 20°C.

A condução dos ensaios para a avaliação do potencial de inibição germinação de esporos da cepa P1 se deu da seguinte maneira: 200 μL das microcápsulas BVP1 e cepa P1 não encapsulada foram espalhadas em uma placa de petri contendo ágar BHI (base 1). A partir de um cultivo fúngico previamente cultivado uma suspensão de esporos (1×10^3 conídios/mL) foi preparada, 1ml da suspensão de esporos foi inoculada em uma placa de petri contendo ágar água (15 g/L de ágar) (base 2). As placas foram seladas com parafilme e incubadas por 24 horas à 25°C, exceto para *B. cinerea*, que foi 24 horas à 20°C. Após foi realizada a leitura em microscópio para verificar a germinação dos conídios e o comprimento do tubo germinativo dos fungos.

A eficiência de encapsulamento (EE) foi determinada através da contagem das células viáveis antes e após a encapsulação utilizando o método de plaqueamento conforme descrito por Zhang et al. (2023), com algumas modificações: a solução da cepa P1 foi submetida a diluições seriadas com plaqueamento em ágar BHI e incubadas a 37 °C por 24 h. Onde o número de células bacterianas viáveis na suspensão pré-encapsulamento (N_0) e o número de células viáveis não encapsuladas recuperadas da solução de cloreto de cálcio (N_1). Para determinar a EE foi aplicado a seguinte equação: $EE (\%) = [(N_0 - N_1) / N_0] \times 100$.

Os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas independentes e os dados foram avaliados pelo teste t de Student ($p < 0,05$).

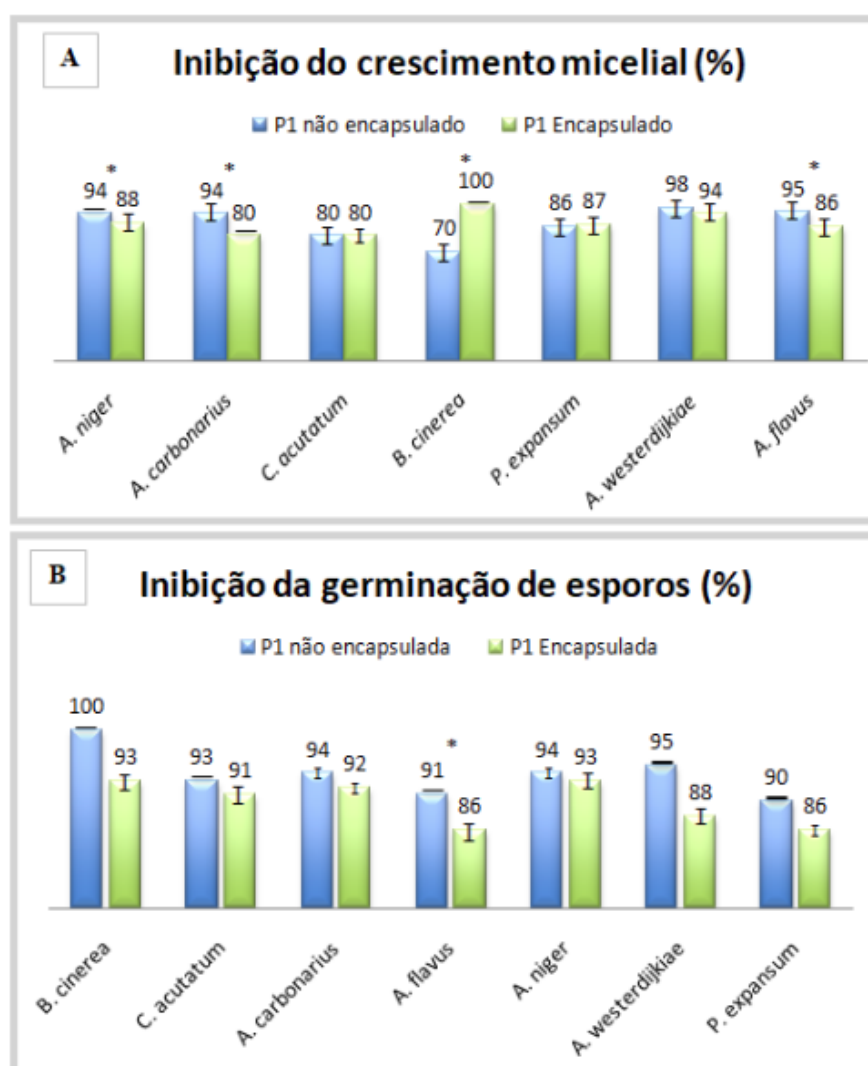
Resultados e Discussão

A atividade antagonista das cepa P1 se manteve após a encapsulação em alginato de sódio e mucilagem de quiabo. A supressão do crescimento micelial (**Figura 2A**) dos fungos avaliados variou entre 80 e 100%. Em destaque para *B. cinerea* que obteve seu do crescimento micelial totalmente inibido. Para os fungos *C. acutatum*, *P. expansum* e *A. westerdijkiae* o potencial de inibição de crescimento micelial se manteve para as duas formas. Em comparação a cepa P1 não encapsulada houve um sutil declínio no potencial de inibição de crescimento micelial em *A. flavus*, *A. niger* e *A. carbonarius*, esses resultados evidenciam as características estruturais desses fungos e a presença da matriz encapsulante que retarda o potencial inibitório. Já para *B. cinerea* podemos observar um aumento no potencial de inibição do crescimento micelial, o que pode estar relacionado com as características fúngicas, visto que seu crescimento se dá de forma mais lenta e prolonga o contato com compostos antagonista da cepa P1 encapsulada o que corrobora com achados em outros estudos (Angelis et al., 2022).

O potencial de inibição da germinação de esporos (**Figura 2B**) obteve níveis entre 90 à 100% e níveis entre 86 à 93% para a cepa P1 não encapsulada e a encapsulada,

respectivamente. Esses resultados demonstram a capacidade antagonista da cepa P1, que mesmo após a encapsulação manteve níveis aceitáveis de antagonismo. Níveis similares foram obtidos para *A. carbonarius* (94% para não encapsulado e 92% para encapsulado), *A. niger* (94% para não encapsulado e 93% para encapsulado) e *C. acutatum* (93% para não encapsulado e 91% para encapsulado), salientando o potencial da microencapsulação da cepa P1 em uma matriz biopolimérica como uso como agente de biocontrole. Para os demais fungos todos os resultados obtidos foram superiores a 86% para inibição da germinação de esporos, resultados positivos que evidenciam as células de *B. velezensis* cepa P1 permanece com sua atividade antagonista mesmo após encapsulada em alginato de sódio e mucilagem de quiabo.

Figura 2. Avaliação do potencial inibição do crescimento micelial (A) e germinação de esporos (B) de *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. westerdijkiae*, *P. expansum*, *C. acutatum* e *B. cinerea* causados pela cepa P1 de *B. velezensis* encapsulado e não encapsulado. Os resultados foram avaliados pelo teste t de Student e um asterisco (*) foi utilizado para indicar a diferença significativa ($p < 0,05$).





A eficiência de encapsulação foi de 90,1% o que reforça que a matriz de alginato é eficaz no aprisionamento da cepa P1 de *B. velezensis*. O encapsulamento com matrizes a base de alginato combinado com polissacarídeos tem sido evidências em diferentes estudos, demonstrando a capacidade de polímeros combinados de imobilizar células microbiana em uma estrutura polimérica tridimensional (Pour *et al.*, 2022; Lotfipour *et al.*, 2012; Haghshenas *et al.*, 2015). Pour *et al.* (2022) obtiveram eficiência de 94,3% utilizando alginato, proteína do soro do leite e goma de zedo para encapsular *B. velezensis*.

No estudo de Zabot *et al.* (2022) destaca-se que a encapsulação de agentes de biocontrole pode restringir a liberação de compostos bioativos e reduzir a capacidade antagonista. Por outro lado, a capacidade de liberação lenta pode promover maior interação entre os compostos antagonistas e os patógenos e ativação de rotas ainda desconhecidas. Portanto a encapsulação de microrganismos se torna uma alternativa para proteção contra condições adversas ambientais e aumento da viabilidade celular.

Conclusões

A cepa *B. velezensis* P1 apresentou elevada capacidade de inibir o crescimento micelial e a germinação de conídios dos sete fungos fitopatogênicos avaliados, tanto na forma não encapsulada quanto após a encapsulação em alginato de sódio e mucilagem de quiabo. A matriz biopolimérica preservou a atividade antagonista da cepa P1, embora tenham sido observadas pequenas variações conforme o fungo-alvo.

Os resultados demonstram que a combinação de alginato de sódio e mucilagem de quiabo constitui uma matriz promissora para a encapsulação e veiculação de *B. velezensis* P1 como agente de biocontrole. Entretanto, a confirmação de sua capacidade protetora e de sua aplicabilidade agrícola requer a avaliação da viabilidade celular durante o armazenamento e após a exposição a estresses ambientais, além de ensaios *in situ* em plantas ou frutos.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro concedido pela FAPERGS, pela CAPES e pelo CNPq.

Referências

- BÖCK, F. C., HELFER, G. A., COSTA, A. B. et al. Rapid Determination of Ethanol in Sugarcane Spirit Using Partial Least Squares Regression Embedded in Smartphone. *Food Anal Methods* 11, 1951-1957 (2018).
- CAMPOS, E. V. R., PEREIRA, A., ALEKSIEIENKO, I. et al. Encapsulated plant growth regulators and associative microorganisms: nature-based solutions to mitigate the effects of climate change on plants. *Plant Sci* 331, 111688 (2023).
- COLIN, C., AKPO, E., PERRIN, A., CORNU, D. & CAMBEDOUZOU, J. Encapsulation in Alginates Hydrogels and Controlled Release: An Overview. *Molecules* 29, 2515 (2024).



DANTAS, T. L., BURITI, F. A. C. & FLORENTINO, E. R. Okra (*Abelmoschus esculentus* L.) as a Potential Functional Food Source of Mucilage and Bioactive Compounds with Technological Applications and Health Benefits. *Plants* 10, 1683 (2021).

HAGHSHENAS, B.; ABDULLAH, N.; NAMI, Y.; RADIAH, D.; ROSLI, R.; YARI KHOSROUSHAHI, A. Microencapsulation of probiotic bacteria *Lactobacillus plantarum* 15HN using alginate–psyllium–fenugreek polymeric blends. *Journal of Applied Microbiology*, 118(4), 1048–1057 (2015).

KHADIRI, M., BOUBAKER, H., ASKARNE, L. et al. *Bacillus cereus* B8W8 an effective bacterial antagonist against major postharvest fungal pathogens of fruit. *Postharvest Biol Technol* 200, 112315 (2023).

LOTFIPOUR, F.; MIRZAEI, S.; MAGHSOODI, M. Preparation and characterization of alginate and psyllium beads containing *Lactobacillus acidophilus*. *The Scientific World Journal*, 680108 (2012).

MORA, A. M., BAKER, J. M., HYLAND, C. et al. Pesticide exposure and cortical brain activation among farmworkers in Costa Rica. *Neurotoxicology* 93, 200-210 (2022).

NANJANI, S., SONI, R., PAUL, D. & KEHARIA, H. Genome analysis uncovers the prolific antagonistic and plant growth-promoting potential of endophyte *Bacillus velezensis* K1. *Gene* 836, 146671 (2022).

ONG-ARTBORIRAK, P., BOONCHIENG, W., JUNTARAWIJIT, Y. & JUNTARAWIJIT, C. Potential Effects on Mental Health Status Associated with Occupational Exposure to Pesticides among Thai Farmers. *Int J Environ Res Public Health* 19, 9654 (2022).

POUR, M. M.; RISEH, R. S.; RANJBAR-KARIMI, R.; HASSANISAADI, M.; RAHDAR, A.; BAINO, F. Microencapsulation of *Bacillus velezensis* using alginate-gum polymers enriched with TiO₂ and SiO₂ nanoparticles. *Micromachines*, 13(9), 1423 (2022).

TORRES, M. J., BRANDAN, C. P., PETROSELLI, G., ERRA-BALSELLS, R. & AUDISIO, M. C. Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* and *B. amyloliquefaciens* against *Macrophomina phaseolina*: SEM study of fungal changes and UV-MALDI-TOF MS analysis of their bioactive compounds. *Microbiol Res* 182, 31-39 (2016).

WU, J. J., CHOU, H. P., HUANG, J. W. & DENG, W. L. Genomic and biochemical characterization of antifungal compounds produced by *Bacillus subtilis* PMB102 against *Alternaria brassicicola*. *Microbiol Res* 251, 126815 (2021).

ZABOT, G. L., et al. (2022). Encapsulation of Bioactive Compounds for Food and Agricultural Applications. *Polymers*, 14(19), 4194.

ZHANG, B., XU, L., DING, J. et al. Natural antimicrobial lipopeptides secreted by *Bacillus* spp. and their application in food preservation, a critical review. *Trends Food Sci Technol* 127, 26-37 (2022).

ZHANG, W.; ZHENG, L.; LANG, D.; ZHANG, X.; MA, X.; LI, X.; 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*, [S.L.], v. 225, p. 123-134 (2023).