








Carboxymethyl cellulose and starch as a vehicle for microbial inoculants

Carboximetilcelulose e amido como veículo para inoculantes microbianos

SILVA, Tathiane Mendonça da ⁽¹⁾; ATAÍDE, Clara Beatriz ⁽²⁾; PEREIRA, Thiago de Araújo ⁽³⁾; COSTA, Maria Eduarda Lino da ⁽⁴⁾; LINS, Camille de Carvalho Silva ⁽⁵⁾; MACENA, Brenda Geovana de Souza ⁽⁶⁾; SANTOS, Tania Marta de Carvalho ⁽⁷⁾

- ⁽¹⁾  0009-0001-1563-7317; Universidade federal de alagoas. Maceió, Alagoas (AL), Brasil. tathiane.silva@ceca.ufal.br.
⁽²⁾  0009-0009-1263-0843; Universidade federal de alagoas. Maceió, Alagoas (AL), Brasil. Beatrizclara937@gmail.com.
⁽³⁾  0009-0006-7217-0174; Universidade federal de alagoas. Maceió, Alagoas (AL), Brasil. Tiago.pereira1@ceca.ufal.br.
⁽⁴⁾  0000-0001-5359-0639; Universidade federal de alagoas. Maceió, Alagoas (AL), Brasil. mariaeduardacosta54@hotmail.com
⁽⁵⁾  0009-0007-9508-7362; Universidade federal de alagoas. Maceió, Alagoas (AL), Brasil. Camilledecarvalho205@gmail.com.
⁽⁶⁾  0009-0009-8277-6798; Universidade federal de alagoas. Maceió, Alagoas (AL), Brasil. Brenda.macena@ceca.ufal.br.
⁽⁷⁾  0000-0002-1816-7840; Universidade federal de alagoas. Maceió, Alagoas (AL), Brasil. tmcs@ceca.ufal.br.

ABSTRACT

Inoculants are formulations that require a high-quality carrier capable of ensuring an active cell concentration, as well as tolerating variations in temperature, humidity, aeration, and storage time. Accordingly, this study aimed to evaluate the efficiency of a carboxymethyl cellulose-starch polymer mixture as a carrier for inoculants of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* strains. The preparations were stored at room temperature, and the survival of the microorganisms was evaluated at 15, 30, 45, and 60 days after inoculation. The tests were conducted in triplicate on nutrient agar, with colony counts performed after 24 hours of incubation. Significant differences in cell viability were detected over the storage period. For both strains, viability was maintained up to 60 days. Differences were observed between the two strains regarding the increase in colony-forming units (CFU); for *B. pumilus*, cell concentration remained stable up to 30 days of storage, while for *B. subtilis*, a significant difference was already observed at 15 days compared to the initial time. The polymer mixture maintained a cell viability of 10^9 CFU·mL⁻¹ for 60 days at room temperature, demonstrating its potential as a sustainable tool to increase agricultural productivity with reduced environmental impact.

RESUMO

Os inoculantes são formulações que necessitam de um transportador de qualidade que garanta a concentração de células ativas, além de tolerar variações de temperatura, umidade, aeração e tempo de armazenamento. Diante disso, objetivou-se avaliar a eficiência da mistura polimérica carboximetilcelulose-amido como veículo para inoculante das estirpes de *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus*. As preparações foram conservadas em temperatura ambiente, a sobrevivência dos microorganismos foi avaliada aos 15, 30, 45, 60, dias após a inoculação, e a avaliação do teste foi realizado em triplicata no meio agar nutriente e contagem depois de 24h de incubação. Foram detectadas diferenças significativas na viabilidade celular com relação ao tempo de armazenamento. Para ambas as estirpes a viabilidade se manteve até 60 dias. Observou-se diferenças entre as duas estirpes com relação ao aumento do número de UFC, para *B. pumilus* foi observado a manutenção da concentração de células até 30 dias de armazenamento, para *B. subtilis* aos 15 dias já se verificou diferença significativa em relação ao tempo inicial. A mistura polimérica manteve a viabilidade celular de 10^9 UFCmL⁻¹ por 60 dias a temperatura ambiente demonstrando seu potencial como ferramenta sustentável para aumentar a produtividade agrícola com menor impacto ambiental.

INFORMAÇÕES DO ARTIGO

Histórico do Artigo:

Submetido: 29/11/2025

Aprovado: 06/03/2026

Publicação: 30/04/2026



Keywords:

Phosphate-solubilizing
bacteria, polymer mixture,
Bacillus.

Palavras-Chave:

Bactéria solubilizadora de
fosfato, mistura polimérica,
Bacillus

Introdução

O fósforo é essencial para o crescimento das plantas, atuando na formação de membranas celulares, no metabolismo energético e na síntese de ácidos nucleicos. No entanto, sua baixa disponibilidade em solos tropicais exige estratégias que aumentem a absorção pelas plantas e reduzam impactos ambientais.

O fósforo representa cerca de 0,2% do peso seco. Esse elemento participa da constituição de componentes vitais da célula como as membranas fosfolipídicas, as moléculas de transferência energética intracelular (ATP) e os ácidos nucleicos (DNA e RNA), que possuem ligações fosfodiéster entre nucleotídeos (Moura, 2007).

Na natureza, o fósforo não é encontrado em sua forma elementar livre, pois é altamente reativo e instável como gás, embora seja indispensável à vida. Na atmosfera, está presente apenas adsorvido em partículas de matéria, sendo rapidamente removido por processos de precipitação, o que torna sua presença nesse meio pouco relevante como via de transporte (Sasabuchi et al., 2023). Diferentemente do carbono e do nitrogênio, cuja circulação é intensamente mediada pela biota, a transferência física do fósforo entre ecossistemas é bastante reduzida.

O P orgânico, menos biodisponível nos solos, é identificado por grupos de ortofosfato ligados a moléculas orgânicas, muitos oriundos da matéria orgânica, podendo ser parcialmente solubilizado por micro-organismos no decorrer do processo de mineralização (Pantano et al., 2016). Ao passo que, na forma adsorvida possui os íons de ortofosfato fixados em partículas como os oxi-hidroxidos de ferro. Quanto ao fósforo mineral, a maior parte é encontrada em rochas sedimentares (Daneshgar et al., 2018).

Os solos tropicais, geralmente apresentam baixa disponibilidade do elemento devido à alta reatividade de formas solúveis com ferro e alumínio, formando compostos de baixa solubilidade (Klaic et al., 2018) sendo necessário, portanto, a fertilização periódica com fontes fosfatadas para garantir altas produtividades agrícolas.

No entanto, os fertilizantes convencionais utilizados, geralmente de elevada solubilidade, como o monoamônio fosfato (MAP), apresentam sérios impactos ambientais, pois sua produção exige o tratamento químico da rocha fosfática com altas concentrações de ácido sulfúrico e ácido fosfórico (Alori; Babalola, Glick; 2017; Klaic et al., 2018). A alta solubilidade dos fertilizantes frequentemente leva a impactos ambientais, resultando na eutrofização de massas de água nas áreas próximas de zonas agrícolas (Klaic et al., 2018).

O uso direto de rocha fosfática moída (RF) é uma alternativa atrativa para fertilização, uma vez que a ausência de tratamento químico prévio resulta em impactos ambientais reduzidos e custos mais baixos, com a vantagem adicional de que a menor solubilidade da (RF) permite maior controle da liberação de fosfato (Klaic et al., 2018). Entretanto, a alta estabilidade química das rochas fosfáticas, relacionada a presença da fase apatita e os

processos de cristalização relacionados, resulta em solubilidade bastante inferior ao necessário em aplicações práticas. Mesmo em solos ácidos, essa baixa solubilidade limita o uso da RF como fertilizante, sobretudo em culturas de ciclo curto (Fayiga; Nwoke, 2016; Pavinato et al., 2017; Klaic et al., 2021).

Para aumentar a eficiência da fertilização fosfatada, melhorar a produtividade agrícola e reduzir a poluição ambiental, é necessário identificar e aplicar estratégias que otimizem a absorção pelas plantas e minimizem as perdas para o ambiente. Nesse aspecto, vários micro-organismos quando associados às plantas podem atuar como promotores de crescimento vegetal, proporcionando uma série de outros benefícios no seu desenvolvimento sendo denominados micro-organismos promotores do crescimento de plantas (MPCP) (Abhilash et al., 2016). Esses micro-organismos têm sido utilizados para formulação de biofertilizantes e inoculantes microbianos (Brigido; Glick; Oliveira, 2016; Bilal et al., 2019; Cely et al., 2016; Fukami et al., 2017; Florencio et al., 2022; Lubna et al., 2018; Nascimento et al., 2019; Pastor-Bueis et al., 2020; Rizvi; Khan, 2018; Velez et al., 2016; Wang; Li; Li, 2018;).

A agricultura sustentável, que busca conciliar produção de alimentos e preservação ambiental, ganha destaque, especialmente devido ao uso massivo de insumos químicos na agricultura convencional. Práticas agrícolas convencionais resultam em redução da produtividade, queda na fertilidade do solo, resistência de pragas e contaminação dos agroecossistemas (Singh; Singh; Prabha, 2016).

A utilização de micro-organismos para promover o crescimento das plantas, através da inoculação, é uma biotecnologia em ascensão. A inoculação de diversas cepas microbianas na agricultura, como tratamento de solo ou sementes, tem demonstrado benefícios comprovados para as plantas cultivadas, bem como para os solos, tornando-os mais saudáveis, seguros e sustentáveis. Os micro-organismos promotores de crescimento de plantas, podem ser uma ferramenta importante para solucionar problemas ambientais e promover a sustentabilidade em agroecossistemas (Lopes et al., 2021). Ao atuarem como bioinoculantes, eles modificam o metabolismo vegetal, resultando em melhorias na morfologia, anatomia, bioquímica e fisiologia das plantas, o que leva a um aumento na produção e qualidade dos alimentos com menor impacto ambiental (Suyal et al., 2016).

Estima-se que em 2024 o mercado global de biofertilizantes movimentou 1,38 bilhões de dólares e está projetado para atingir US\$ 2,83 bilhões até 2030, crescendo a uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 12,8% de 2025 a 2030 (Grand View Research, 2024). Inoculantes de micro-organismos promotores de crescimento de plantas podem ser definidos como formulações contendo uma ou mais cepas (ou espécies) de micro-organismos benéficos preparadas com um material carreador econômico e de fácil utilização (Malusa; Sas-Paszt; Ciesielska, 2012) que, quando aplicados ao solo, sementes ou folhas, conseguem aumentar o

crescimento e o desenvolvimento de plantas (Florencio et al., 2022; Santos; Nogueira; Hungria, 2019).

Sua aplicação na agricultura tem se mostrado efetiva para o aumento da produtividade agrícola e redução dos impactos ambientais causados pela aplicação exacerbada de herbicidas, pesticidas e fertilizantes químicos. Os inoculantes microbianos possuem diversas formas de ação, tais como: liberação de compostos químicos que podem estimular o crescimento de plantas ou aumentar sua resistência em situações de estresse (Egamberdieva et al., 2017; Santos; Nogueira; Hungria, 2019); agentes de biocontrole, reduzindo a incidência de doenças causadas por fitopatógenos nas plantas (Ramirez-Carino et al., 2020); biofertilizantes, por meio da solubilização e aumentando a disponibilidade de nutrientes vitais para as plantas, como nitrogênio, fósforo, potássio e enxofre, entre outros (Seenivasagan; Babalola, 2021).

Os inoculantes devem apresentar características desejáveis a fim de garantir que o produto promova o crescimento microbiano, e ainda permitir que as células continuem viáveis durante todo o período de armazenamento, garantindo que a população de micro-organismos presentes no produto esteja disponível para serem associados às plantas e desempenhem sua função (Bashan et al., 2014). Além disso, não apresentam impactos negativos no ambiente, sendo compatíveis com fertilizantes ou defensivos agrícolas (Cardoso; Estrada-Bonilla, 2019). Esses micro-organismos podem viver livres no solo ou em relação simbiótica com as plantas, além de poderem ser aplicados separadamente ou co-inoculados (quando mais de um microrganismo está presente na formulação) (Emmanuel; Babalola, 2020).

No Brasil, os inoculantes são formulações a base de estirpes selecionadas que são posteriormente aprovadas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Mapa), cuja legislação é abrangente e envolve diversas leis, decretos e instruções normativas que regulamentam a produção, fiscalização e comercialização desses produtos (Brasil, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2024) (Tabela 1).

O desenvolvimento de inoculantes em larga escala depende da produção de inóculos puros, com alto potencial de infectividade, e da utilização de formulações e veículos adequados, além de métodos eficientes de aplicação (Malusa; Sas-Paszt; Ciesielska, 2012). Os veículos podem ser orgânicos, inorgânicos ou sintéticos, devendo apresentar propriedades como disponibilidade, baixo custo, fácil manuseio, boa capacidade de empacotamento e miscibilidade. Além disso, devem permitir trocas gasosas, especialmente de oxigênio, e apresentar alta retenção de água e matéria orgânica (Rebah; Tyagi; Prevost, 2002).

Algumas substâncias bastante utilizadas como veículos nos inoculantes são: turfa, óleo mineral, alginatos, carboximetilceluloses 0,15%, glicerina 1%, colágeno 1% e extrato de solo 1:1 (Cardoso; Estrada-Bonilla, 2019).

Tabela 1.

Normas e regulamentações do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) sobre inoculantes e biofertilizantes

Legislação	Disposição
Lei nº 6.894/1980	Dispõe sobre a inspeção e fiscalização da produção e comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes e biofertilizantes destinados a agricultura.
Instrução Normativa nº 08, de 02/07/2003	Dispensa de registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA os fertilizantes, corretivos e inoculantes importados diretamente pelo consumidor final, para seu uso próprio.
Instrução Normativa nº 14, de 16/10/2003	Estabelece as normas para registro no Sistema Integrado de Comércio Exterior - SISCOMEX para as importações de fertilizantes, corretivos, inoculantes e biofertilizantes, e suas respectivas matérias-primas.
Decreto nº 4.954/2004	Detalha as normas e procedimentos relacionados a inspeção e fiscalização.
Instrução Normativa nº 27, de 05/06/2006, alterada pela IN SDA 07 de 12/04/2016	Estabelece os limites de concentrações máximas admitidas para agentes fitotóxicos, patogênicos ao homem, animais e plantas, metais pesados tóxicos, pragas e ervas daninhas para produzir, importar ou comercializar fertilizantes, corretivos, inoculantes e biofertilizantes.
Instrução Normativa nº 30, de 12/11/2010	Estabelece os métodos oficiais para análise de inoculantes, sua contagem, identificação e análise de pureza.
Instrução Normativa nº 13/2011	Dispõe sobre o registro de produtos contendo micro-organismos resultantes de modificações por engenharia genética e a inclusão desses organismos nos anexos da IN.
Instrução Normativa nº 13, de 24/03/2011	Aprova as normas sobre especificações, garantias, registro, embalagem e rotulagem dos inoculantes destinados a agricultura, bem como as relações dos micro-organismos autorizados e recomendados para produção de inoculantes no Brasil.
Decreto nº 8.384/2014	Dispõe sobre a inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes, ou biofertilizantes, remineralizadores e substratos para plantas destinados a agricultura.
Instrução Normativa nº 53/2013 alterada pela IN nº 3 de 15/01/2020	Define os requisitos para o registro de estabelecimentos produtores e importadores de inoculantes, bem como os procedimentos para a análise e controle de qualidade.
Instrução Normativa nº 61, de 08/07/2020	Estabelece as regras sobre definições, exigências, especificações, garantias, tolerâncias, registro, embalagem e rotulagem dos fertilizantes orgânicos e dos biofertilizantes, destinados à agricultura.
Portaria SDA/MAPA nº 1.110, de 13/05/2024	Aprova os métodos oficiais para realização de ensaios dos programas e controles oficiais do Ministério da Agricultura e Pecuária.
Lei nº 15.070/2024 (Lei de Bioinsumos)	Cria um marco regulatório específico para bioinsumos — incluindo inoculantes — concedendo-lhes categoria própria e procedimentos simplificados de registro, produção e fiscalização.

Nota: autores, 2025

As formulações podem ser líquidas, nas quais os micro-organismos são incorporados em meios de cultura, água ou óleo com aditivos, ou sólidas, utilizando transportadores em pó, como turfa, argilas, solos inorgânicos ou substratos inertes (perlita, vermiculita). Outra alternativa é o encapsulamento, que imobiliza os micro-organismos em matrizes poliméricas (Bashan et al., 2014; Ferreira, 2024). Estudos tem realizados utilizando polímeros biodegradáveis como possíveis veículos de inoculação, uma vez que são ecologicamente seguros, degradáveis por micro-organismos e não causam danos ambientais (Almeida et al., 2025; Bashan et al., 2014; Brondi et al., 2022; Bisutti, 2016; Gomes et al., 2021; Lopes et al., 2021; Macarena Fernandez et al., 2022; Macarena Fernandez et al., 2024; Oliveira et al., 2014; Perez et al., 2018; Reis et al., 2021; Silva Junior et al., 2016; Stephan; Silva; Souza et al., 2022; Velloso et al., 2024;).

A carboximetilcelulose (CMC), derivada do polissacarídeo celulose, destaca-se na produção de filmes biodegradáveis e comestíveis, reconhecida por suas propriedades não tóxicas, biocompatibilidade, solubilidade em água, origem renovável e baixo custo (Ferreira, 2024). A CMC é um éter de celulose cuja estrutura é baseada no polímero $\beta(1\rightarrow4)$ -D-glucopiranosose da celulose. Suas propriedades, incluindo a formação de filmes, géis e hidrogéis (por reticulação com cátions bi e trivalentes), conferem relevância em diversas aplicações, como a liberação controlada de pesticidas e nutrientes na agricultura (Lopez et al., 2015; Santos et al., 2021).

Entre os biopolímeros naturais, o amido é conhecido por sua capacidade de formar filmes e pela biocompatibilidade, sendo altamente versátil devido às suas propriedades físico-químicas, permitindo uso em ampla gama de produtos. O amido consiste em dois polímeros de glucana: amilopectina, altamente ramificada, e amilose, predominantemente linear (Visakh et al., 2014). Esses polímeros organizam-se dentro do grânulo de amido em camadas semicristalinas e amorfas (Moreira et al., 2013). A amilopectina, por meio de ligações de hidrogênio, facilita a absorção de água, aumentando a viscosidade e aprimorando a gelatinização, enquanto a amilose contribui para a hidrofobicidade. As proporções relativas desses componentes definem propriedades únicas para diferentes tipos de amido, adaptando-os a aplicações específicas (Cornejo-Ramirez et al., 2018).

Carreadores à base de amido combinados com outros polímeros têm ganhado destaque em formulações microbianas. Por exemplo, esferas de alginato-amido mantêm concentração estável de células de *Bacillus pumilus* superior a 10^9 UFC mL⁻¹ e retêm cerca de 37% de água (Riseh et al., 2021). A co-imobilização de *Azospirillum argentinense* e *Pseudomonas rhodesiae* em esferas de quitosana/amido mostrou-se eficaz para aplicação em sementes de milho (Macarena Fernandez et al., 2024), proporcionando maior estabilidade e produtividade em comparação a inoculantes líquidos. A liberação controlada de microrganismos benéficos é uma vantagem essencial do encapsulamento em matrizes biopoliméricas. Sistemas à base de amido

modificado foram projetados para proteger e liberar *Priestia megaterium*, sendo necessária modulação cuidadosa da microestrutura e composição do filme para garantir eficácia (Velloso et al., 2024).

As misturas poliméricas atuam como suportes de inoculação e permitem combinar propriedades de diferentes polímeros a baixo custo (Almeida et al., 2025). Misturas de CMC-amido selecionadas como carreadores para formulações líquidas e em gel foram capazes de manter a viabilidade de uma mistura de cinco cepas de bactérias diazotróficas (*Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica*) (Fernandes Junior et al., 2009). Um experimento de curta duração em casa de vegetação mostrou que a cana-de-açúcar inoculada respondeu positivamente a colonização pelas cepas diazotróficas (Silva et al., 2009).

Misturas de CMC-amido preparados na proporção de 60/40 em base seca (compatibilizado com óxido de magnésio (MgO)), proporcionaram viabilidade celular de *Bradyrhizobium pachyrhizi* BR 3262, por até quatro meses em temperatura ambiente (Almeida et al., 2025). Segundo os autores, essa característica as torna ideais para produção em biofábricas que atendem unidades agrícolas localizadas próximas ao local de produção do inoculante, reduzindo assim a necessidade de armazenamento refrigerado e os custos de transporte. Essas formulações também são adequadas para áreas de agricultura familiar que requerem pequenas quantidades de uma ampla variedade de inoculantes para atender as diversas necessidades de práticas agrícolas baseadas em calendário. A mistura de CMC-amido fornece uma solução conveniente para armazenamento de curto prazo.

Deste modo, o uso de carboximetilcelulose e amido como matrizes para inoculantes combina biocompatibilidade, solubilidade, baixo custo e liberação controlada de microrganismos. Essas formulações garantem estabilidade e eficiência, facilitando armazenamento e aplicação. Assim, representam uma estratégia promissora para aumentar a produtividade vegetal de forma sustentável, especialmente em pequenas propriedades e na agricultura familiar, com menor dependência de fertilizantes químicos.

Objetivou-se com este estudo avaliar a viabilidade de uma mistura polimérica a base de carboximetilcelulose e amido, como veículo de inoculação para bactérias solubilizadoras de fosfato.

Procedimentos Metodológicos

Foram utilizados nesse estudo duas estirpes de Bactérias Solubilizadoras de Fosfato (BSF), do gênero *Bacillus*, pertencentes ao repositório do Laboratório de Microbiologia do Campus de Engenharias e Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas e depositados no Gen Bank: *B. subtilis* (Gen Bank KT998655.1) e *B. pumilus* (Gen Bank KT998656.1) isolados da rizosfera de cana-de-açúcar, inicialmente identificadas testadas e selecionadas.

A suspensão de células das estirpes BSF foi preparada em meio líquido de extrato de levedura-glicerol (glicerol 10,0 mL, K₂ HPO₄ (solução a 5%) 10,0 mL, MgSO₄.7H₂O (solução a 2%) 10,0 mL, NaCl (solução a 1%) 10,0 mL, CaCl₂ (solução a 2%) 10,0 mL, FeCl₂ (solução a 0,1%) 10,0 mL, extrato de levedura 0,40 g, água destilada ou 960 mL, pH 6,8) sob agitação a 120RPM em temperatura ambiente. As suspensões celulares foram ajustadas para turbidez equivalente ao padrão 0,5 da Escala de McFarland, correspondente a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹.

A mistura de CMC e amido foi preparada na proporção de 60/40 em base seca (64 gL⁻¹) em água destilada, compatibilizado óxido com de magnésio (MgO) 2%, transferidas para frascos tipo Babbyfood e esterilizada por autoclavagem a 1atm por 20 minutos. A compatibilização de misturas poliméricas é necessária para obter sinergismo de propriedades, pois a maioria das misturas de polímeros são imiscíveis. Agentes compatibilizantes atuam como ponte, promovendo maior interação entre os polímeros, melhorando as propriedades finais do material resultante.

Após esterilização, a cada frasco foi adicionado uma alíquota de 5,0 mL de suspensão bacteriana ajustada pela da Escala de McFarland, correspondente a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹. Após a inoculação os frascos foram fechados e o conteúdo agitado, manual e vigorosamente, para homogeneizar as formulações. Os frascos foram conservados em temperatura ambiente e no escuro, no laboratório. A sobrevivência dos micro-organismos foi avaliada aos 15, 30, 45, 60, dias após a inoculação, e determinada por diluições em série de plaqueadas em triplicata no meio ágar nutriente e contagem depois de 24 h de incubação (UFC.mL⁻¹).

Os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com três repetições, em esquema fatorial com dois fatores: bactérias (2) e tempo de armazenamento (5) constituindo dez tratamentos. Os resíduos do delineamento foram submetidos aos testes de Lilliefors, Cochran e Bartlett para verificação da normalidade e homogeneidade das variâncias dos dados. Para análise das variâncias aplicou-se o teste F ($P \leq 0,05$) e as medias comparadas pelo teste Scott Knott ($P \leq 0,05$). Além disso, modelos de regressão foram ajustados aos fatores quantitativos. O coeficiente de correlação de Spearman (ρ) e o valor de p de significância também foram determinados. Foi utilizado o software Sisvar (v5.7) (Ferreira, 2019).

Resultados e Discussões

Foram observadas diferenças significativas na viabilidade celular com relação ao tempo de armazenamento. A viabilidade celular das estirpes *B. subtilis* e *B. pumilus* manteve-se elevada ao longo de 60 dias de armazenamento na formulação polimérica composta por CMC e amido compatibilizada com 2% de MgO. Os dados obtidos estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2.

Viabilidade celular das estirpes (Log UFC mL⁻¹) na mistura composta de CMC e amido compatibilizada com MgO 2% em vários tempos de armazenamento.

Estirpes	Tempo de armazenamento (dias)	Log UFC mL ⁻¹
<i>Bacillus subtilis</i>	0	8,44b
	15	9,07 ^a
	30	9,08 ^a
	45	9,04 ^a
	60	9,03 ^a
<i>Bacillus pumilus</i>	0	8,38b
	15	8,48b
	30	9,43 ^a
	45	9,15 ^a
	60	9,09 ^a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

Nota: Dados da pesquisa, 2025.

Para *B. subtilis*, observou-se um aumento significativo da viabilidade já aos 15 dias, esse período corresponde ao estágio de adaptação da cultura ao veículo, que apresenta características diversas das observadas nos meios de cultura, permanecendo estável até o final do período, sem diferenças estatísticas entre 15, 30, 45 e 60 dias. Isso indica que a formulação favoreceu a manutenção da população microbiana, garantindo estabilidade celular prolongada.

Já *B. pumilus* apresentou comportamento semelhante, com viabilidade significativamente maior a partir de 30 dias, mantendo valores superiores a 9 log UFC mL⁻¹ até os 60 dias. Esse resultado sugere que a espécie respondeu de forma ainda mais favorável à matriz polimérica, apresentando crescimento adicional durante o armazenamento inicial.

Para *B. pumilus* (Figura 1) todos os coeficientes do modelo quadrático foram significativos, enquanto que para *B. subtilis* (Figura 2) o quadrático não foi significativo. O coeficiente linear significativo indica que existe correlação entre a viabilidade celular, expressado pelo número de UFC e o tempo de armazenamento.

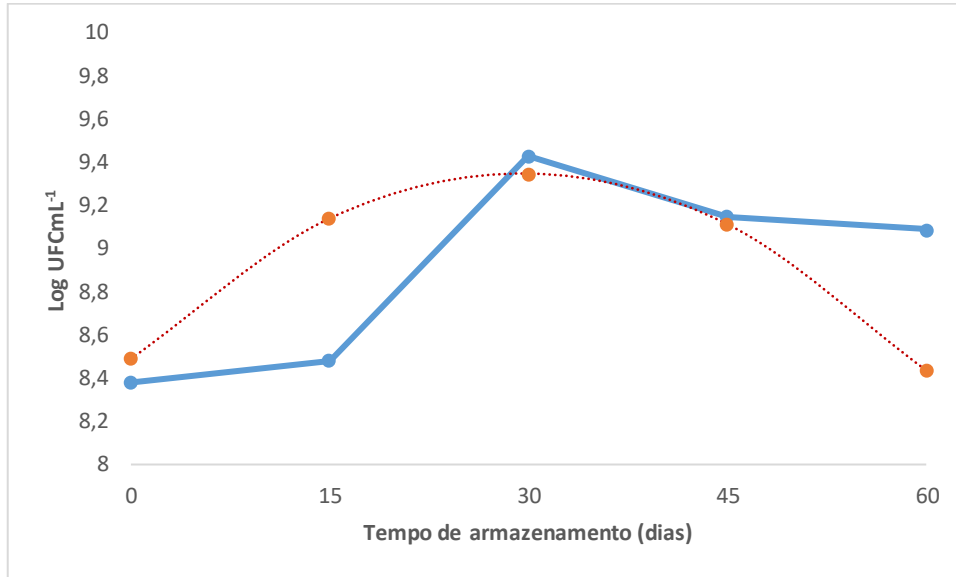
O tempo de prateleira e a qualidade dos inoculantes utilizam a determinação do número de células viáveis. A manutenção de células com as características de interesse deve ser mantida durante mais do que uma estação de crescimento, que para a legislação Brasileira é de seis meses (IN 13, MAPA 2011).

A sobrevivência das bactérias em inoculantes, está relacionada ao veículo utilizado para a produção do inoculante, sendo necessário que o veículo proporcione alta retenção de umidade, ausência de toxidez, boa adesão as sementes e baixo custo. A formulação precisa fornecer um ambiente adequado, proteção físico-química para um período prolongado de armazenamento e um número crítico de células de aproximadamente 10^6 – 10^7 . Formulações de biofertilizantes baseadas em biopolímeros naturais estão atraindo interesse crescente devido

a sua biodegradabilidade e potencial para promover o uso de recursos renováveis e econômicos (Pereira et al., 2023).

Figura 1.

Viabilidade celular significância dos coeficientes do modelo de regressão polinomial quadrática para sobrevivência de células B. pumilus na formulação CMC/amido em função do tempo de armazenamento.

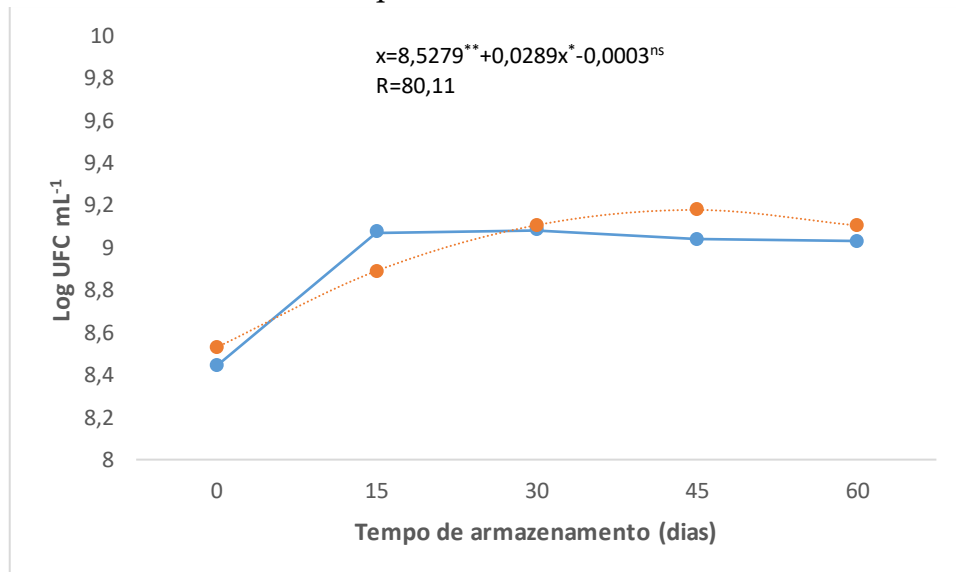


** significativo pelo teste T (<0,01)

Nota: Dados da pesquisa, 2025.

Figura 2.

Viabilidade celular e significância dos coeficientes do modelo de regressão polinomial quadrática para sobrevivência de células B. subtilis na formulação CMC/amido em função do tempo de armazenamento.



** significativo pelo teste T (<0,01)

Nota: Dados da pesquisa, 2025.

Os níveis de viabilidade celular de *B. subtilis* e *B. pumilus* observados na Tabela 2 indicam que essas estirpes podem se manter ativas por períodos prolongados quando encapsuladas na matriz polimérica de CMC e amido. Essa estabilidade é crucial, pois microrganismos viáveis são capazes de solubilizar fosfatos de baixa disponibilidade em solos tropicais, tornando o fósforo acessível às plantas de forma gradual e eficiente.

A CMC tem sido amplamente utilizada como veículo para inoculantes devido as suas propriedades de solubilidade em água fria e quente, retenção de água e capacidade de formar filme. Essas propriedades podem proporcionar um alto índice de sobrevivência as células. Os agentes compatibilizantes podem ser polímeros funcionalizados ou substâncias de baixo peso molecular que proporcionam maior interação entre os polímeros, reduzindo a separação de fases e melhorando as propriedades finais da mistura (Almeida et al., 2025).

Misturas de CMC-amido demonstram potencial como carreadoras de bactérias promotoras de crescimento de plantas, incluindo bactérias, como *Bradyrhizobium*, que podem promover a nodulação de leguminosas e aumentar a fixação biológica de nitrogênio. Essas misturas, particularmente aquelas contendo 50–60% de CMC, mantêm eficazmente a viabilidade celular por aproximadamente um mês em armazenamento em temperatura ambiente (Fernandes Junior et al., 2009).

Almeida et al (2025) realizaram estudo com o objetivo desenvolver uma formulação de mistura de biopolímeros para a cepa BR 3262 de *Bradyrhizobium pachyrhizi*, utilizando quatro amidos comerciais e duas carboximetilceluloses (CMC), e desenvolveram misturas de CMC-amido compatibilizadas ou não com MgO em concentrações de 0,1% a 1,0%. Os inoculantes resultantes foram armazenados por 168 dias. Os autores verificaram que algumas misturas de CMC-amido mantiveram excelente viabilidade celular por até quatro meses em temperatura ambiente.

A biomassa de espirulina, condicionada a CMC como veículo de inoculação, mostrou a capacidade dessa mistura em aumentar em 100 vezes o número de células viáveis de *B. parchirizi* (BR3262) após 30 dias de armazenamento a temperatura ambiente (Freitas, 2015). No trabalho desenvolvido por Souza (2017) usando veículo polimérico a base de CMC e EPS, a estirpe BR 3267 de *B. yuanmingense*, conseguiu alcançar 120 dias com viabilidade celular entre 108 e 109 UFC/mL (SOUSA,2017).

As misturas CMC-EPS e CMC-amido-EPS mantiveram a viabilidade celular durante o período de armazenamento de 4 meses, excetuando a estirpe bacteriana de *G. diazotrophicus* (BR 11281), o que se sugere uma otimização das condições de crescimento dessa estirpe (Chantre, 2018). A utilização de biopolímeros como goma xantana (GX) e carboximetilcelulose (CMC) foi eficiente na conservação e viabilidade de células de *B. elkanii*, *B. diazoefficiens* e *Azospirillum* sp. durante 210 dias de armazenamento a 5 °C (Souza et al., 2022). A mistura

CMC/amido também conservou a viabilidade celular de *B. subtilis* I20 e *B. subtilis* I12 durante 90 dias (Silva et al., 2023).

Embora a legislação brasileira estipule um ciclo de prateleira de seis meses (180 dias) para inoculantes microbianos, os resultados do presente estudo, com monitoramento da viabilidade de *B. subtilis* e *B. pumilus* por 60 dias, demonstram estabilidade significativa das populações celulares ao longo desse período. Os dados de trabalhos progressos sobre o tema sugerem que mesmo análises de curto prazo podem ser indicativas da capacidade do inoculante de manter viabilidade durante o ciclo exigido pela legislação, reforçando que as misturas poliméricas, ao protegerem os microrganismos, garantem estabilidade celular suficiente para promover a solubilização de fósforo e demais benefícios agrônômicos durante o período de prateleira regulamentar.

Conclusão

Os resultados obtidos reforçam a importância de veículos poliméricos, como a matriz composta por CMC e amido, na manutenção da viabilidade celular de Bactérias Solubilizadoras de Fosfato (BSF) ao longo do armazenamento. Ao manter a viabilidade das populações microbianas superiores a 9 log UFC mL⁻¹ por até 60 dias, essas formulações demonstram potencial para garantir a disponibilidade de micro-organismos promotores de crescimento de plantas, essenciais para a solubilização e disponibilização de fósforo em solos tropicais de baixa fertilidade.

REFERÊNCIAS

- Abhilash, P. C., Dubey, R. K., Tripathi, V., Gupta, V. K., & Singh, H. B. (2016). Plant growth-promoting microorganisms for environmental sustainability. *Trends in Biotechnology*, 34, 847–850. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.05.005>
- Almeida, J. C., Silva, M. F., Xavier, G. R., Oliveira, P. J., Rumjanek, N. G., & Reis, V. M. (2025). Inoculant formulation for *Bradyrhizobium* spp.: Optimizing CMC/starch blends for improved performance. *Agriculture*, 15, 1010. <https://doi.org/10.3390/agriculture15091010>
- Alori, E. T., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in Microbiology*, 8, 971. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971>
- Bashan, Y., de-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., & Hernandez, J. P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and Soil*, 378, 1–33. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>
- Bilal, S., Shahzad, R., Khan, A. L., Kang, S. M., Imran, Q. M., Al-Harrasi, A., Yun, B. W., & Lee, I. J. (2019). Phytohormones enabled endophytic *Penicillium funiculosum* LHLO6 protects *Glycine max* L. from synergistic toxicity of heavy metals by hormonal and stress-responsive proteins modulation. *Journal of Hazardous Materials*, 379, 120824. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.120824>

- Brasil, Ministério da Agricultura e Pecuária. (2024). *Legislação sobre fertilizantes*.
<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacoes>
- Brígido, C., Glick, B. R., & Oliveira, S. (2016). Survey of plant growth-promoting mechanisms in native Portuguese chickpea *Mesorhizobium* isolates. *Microbial Ecology*, 73, 900–915.
<https://doi.org/10.1007/s00248-016-0891-9>
- Brondi, M., Pereira, R. M., de Carvalho, A. J. F., & Mattoso, L. H. C. (2022). Encapsulation of *Trichoderma harzianum* with nanocellulose/carboxymethyl cellulose nanocomposite. *Carbohydrate Polymers*, 295, 119876. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119876>
- Cardoso, E. J. B. N., & Estrada-Bonilla, G. A. (2019). Inoculantes agrícolas. In U. de A. Lima (Ed.), *Biotecnologia industrial: Processos fermentativos e enzimáticos* (2nd ed., Vol. 3, pp. 305–332). Blucher.
- Cely, M. V. T., Siviero, M. A., Emiliano, J., Spago, F. R., Freitas, V. F., Barazetti, A. R., Goya, E. T., Lamberti, G. S., dos Santos, I. M. O., & de Oliveira, A. G. (2016). Inoculant of arbuscular mycorrhizal fungi (*Rhizophagus clarus*) increase yield of soybean and cotton under field conditions. *Frontiers in Microbiology*, 7, 720. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00720>
- Chantre, N. C. S. (2018). *Veículo de inoculação à base de exopolissacarídeo em formulações bacterianas para cana-de-açúcar* (Dissertação de mestrado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- Cornejo-Ramírez, Y. I., Martínez-Cruz, O., Del Toro-Sánchez, C. L., Wong-Corral, F. J., Borboa-Flores, J., & Cinco-Moroyoqui, F. J. (2018). The structural characteristics of starches and their functional properties. *CyTA – Journal of Food*, 16, 1003–1017.
<https://doi.org/10.1080/19476337.2018.1518343>
- Daneshgar, S., Callegari, A., Capodaglio, A. G., & Vaccari, D. A. (2018). The potential phosphorus crisis: Resource conservation and possible escape technologies. *Resources*, 7(2), 37.
<https://doi.org/10.3390/resources7020037>
- Egamberdieva, D., Wirth, S. J., Alqarawi, A. A., Abd-Allah, E. F., & Hashem, A. (2017). Phytohormones and beneficial microbes: Essential components for plants to balance stress and fitness. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2104. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02104>
- Emmanuel, O. C., & Babalola, O. O. (2020). Productivity and quality of horticultural crops through co-inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting bacteria. *Microbiological Research*, 239, 126569. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126569>
- Fayiga, A. O., & Nwoke, O. C. (2016). Phosphate rock: Origin, importance, environmental impacts, and future roles. *Environmental Reviews*, 24, 403–415. <https://doi.org/10.1139/er-2016-0003>
- Fernandes Junior, P. I., Rohde, M., Hungria, M., & Xavier, G. R. (2009). Polymers as carriers for rhizobial inoculant formulations. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44(9), 1184–1190.
- Ferreira, D. F. (2019). Sisvar: A computer analysis system to fixed effects split plot type designs. *Revista Brasileira de Biometria*, 37(4), 529–535.
- Fukami, J., Ollero, F. J., Megías, M., & Hungria, M. (2017). Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense*

- cells and metabolites promote maize growth. *AMB Express*, 7, 153.
<https://doi.org/10.1186/s13568-017-0453-7>
- Klaic, R., Plotegher, F., Segatelli, M. G., Lopes, E. S., & de Andrade, J. B. (2018). Nanocomposite of starch-phosphate rock bioactivated for environmentally friendly fertilization. *Minerals Engineering*, 128, 230–237.
- Klaic, R., Segatelli, M. G., Lopes, E. S., & de Andrade, J. B. (2021). Synergy of *Aspergillus niger* and components in biofertilizer composites increases the availability of nutrients to plants. *Current Microbiology*, 78, 1529–1542. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02406-y>
- Malusa, E., Sas-Paszt, L., & Ciesielska, J. (2012). Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers. *The Scientific World Journal*, 2012, 491206.
<https://doi.org/10.1100/2012/49120>
- Moreira, F. K. V., Pedro, D. C. A., Glenn, G. M., Marconcini, J. M., & Mattoso, L. H. C. (2013). Brucite nanoplates reinforced starch bionanocomposites. *Carbohydrate Polymers*, 92, 1743–1751.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.11.019>
- Moura, L. de A. (2007). Nota sobre o gênero *Chlamophora* Chevrolat, com a descrição de uma nova espécie do sul do Brasil (Coleoptera, Chrysomelidae, Galerucinae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 24, 552–558.
- Nascimento, F. X., Hernández, A. G., Glick, B. R., & Rossi, M. J. (2019). Plant growth-promoting activities and genomic analysis of stress-resistant bacteria. *Biotechnology Reports*, 25, e00406. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e0040>
- Oliveira, A. L. M., Costa, K. R., Ferreira, D. C., Milani, K. M. L., Santos, O. J. A. P., Silva, M. B., & Zuluaga, M. Y. A. (2014). Aplicações da biodiversidade bacteriana do solo para a sustentabilidade da agricultura. *BBR – Biochemistry and Biotechnology Reports*, 3, 56–77.
<https://doi.org/10.5433/2316-5200.2014v3n1p56>
- Pantano, G., Grosseli, G. M., Mozeto, A. A., & Fadini, P. S. (2016). Sustentabilidade no uso do fósforo: Uma questão de segurança hídrica e alimentar. *Química Nova*, 39(6), 732–740.
- Pastor-Bueis, R., Sánchez-Cañizares, C., James, E. K., & González-Andrés, F. (2020). Formulation of a highly effective inoculant for common bean based on an autochthonous elite strain. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2724. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02724>
- Pavinato, P. S., Rodrigues, M., Soltangheisi, A., Sartor, L. R., & Withers, P. J. A. (2017). Effects of cover crops and phosphorus sources on maize yield, phosphorus uptake, and phosphorus use efficiency. *Agronomy Journal*, 109, 1039–1047. <https://doi.org/10.2134/agronj2016.06.0323>
- Pereira, J. F., Oliveira, A. L. M., Sartori, D., Yamashita, F., & Mali, S. (2023). Perspectives on the use of biopolymeric matrices as carriers for plant-growth promoting bacteria in agricultural systems. *Microorganisms*, 11, 467. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020467>
- Perez, J. J., Francois, N. J., Maroniche, G. A., Borrajo, D., Pereyra, M. A., & Creus, C. M. (2018). A novel, green, low-cost chitosan-starch hydrogel as potential delivery system for plant growth-promoting bacteria. *Carbohydrate Polymers*, 202, 409–417.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.084>
- Ramírez-Cariño, H. F., Guadarrama-Mendoza, P. C., Sánchez-López, V., Cuervo-Parra, J. A., Ramírez-Reyes, T., Dunlap, C. A., & Valadez-Blanco, R. (2020). Biocontrol of *Alternaria alternata* and

- Fusarium oxysporum* by *Trichoderma asperelloides* and *Bacillus paralicheniformis* in tomato plants. *Antonie van Leeuwenhoek*, 113, 1247–1261. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01433-2>
- Rebah, F. B., Tyagi, R. D., & Prévost, D. (2002). Wastewater sludge as a substrate for growth and carrier for rhizobia: The effect of storage conditions on survival of *Sinorhizobium meliloti*. *Bioresource Technology*, 83, 145–151. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00202-4](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00202-4)
- Riseh, R. S., Ebrahimi-Zarandi, M., Vazvani, M. G., & Skorik, Y. A. (2021). Reducing drought stress in plants by encapsulating plant growth-promoting bacteria with polysaccharides. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 12979. <https://doi.org/10.3390/ijms222312979>
- Rizvi, A., & Khan, M. S. (2018). Heavy metal-induced oxidative damage and root morphology alterations of maize (*Zea mays* L.) plants and stress mitigation by metal tolerant nitrogen-fixing *Azotobacter chroococcum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 157, 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.063>
- Santos, M. S., Nogueira, M. A., & Hungria, M. (2019). Microbial inoculants: Reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. *AMB Express*, 9, 205. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0932-0>
- Santos, V. S., Fernandes, R. S., Ferreira Junior, C. R., Aouada, F. A., Américo-Pinheiro, J. H. P., & Moura, M. R. (2021). Avaliação e caracterização de biofilme comestível de carboximetilcelulose contendo nanopartículas de quitosana e *Curcuma longa*. *Revista Matéria*, 26, e12926. <https://doi.org/10.1590/S1517-707620210001.1226>
- Sasabuchi, I. T. M., Krieger, K. S., Nunes, R. S., Ferreira, A. C., Xavier, G. T. M., Urzedo, A. L., Carvalho, W. A., & Fadini, P. S. (2023). Sustentabilidade no uso de fósforo: Uma revisão bibliográfica com foco na situação atual do estado de São Paulo, Brasil. *Química Nova*, 46(2), 185–198.
- Seenivasagan, R., & Babalola, O. O. (2021). Utilization of microbial consortia as biofertilizers and biopesticides for the production of feasible agricultural products. *Biology*, 10, 1111. <https://doi.org/10.3390/biology10111111>
- Silva, M. F., Oliveira, P. J., Xavier, G. R., Rumjanek, N. G., & Reis, V. M. (2009). Inoculantes formulados com polímeros e bactérias endofíticas para a cultura da cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44(11), 1437–1443.
- Singh, D. P., Singh, H. B., & Prabha, R. (2016). *Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity: Research perspectives*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2647-5>
- Souz, Lima, C. A., Moura, D. M. O., Souza, S. M., Ferreira, A. L. L., & Costa Junior, A. F. (2022). Biopolímeros na conservação de células de rizobactérias em meios de cultura alternativos. *Research, Society and Development*, 11(4), e35911427490.
- Stephan, D., Silva, A. P. M., & Bisutti, I. L. (2016). Optimization of a freeze-drying process for the biocontrol agent *Pseudomonas* spp. and its influence on viability, storability and efficacy. *Biological Control*, 94, 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.12.004>
- Vélez, P. A., Talano, M. A., Paisio, C. E., Agostin, E., & González, P. S. (2016). Synergistic effect of chickpea plants and *Mesorhizobium* as a natural system for chromium phytoremediation.

Environmental Technology, 38, 2164–2172.

<https://doi.org/10.1080/09593330.2016.1247198>

Wang, L., Li, Y., & Li, Y. (2018). Metal ions driven production, characterization and bioactivity of extracellular melanin from *Streptomyces* sp. ZL-24. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, 521–530. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.061>