

UNIVERSIDADE VILA VELHA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE BIOFERTILIZANTES À
BASE DE ALGINATO DE CÁLCIO: UMA ABORDAGEM
SUSTENTÁVEL PARA O CULTIVO DE PLANTAS**

FERNANDA SENNA FERREIRA COSTA

VILA VELHA

DEZEMBRO/2023

UNIVERSIDADE VILA VELHA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE BIOFERTILIZANTES À
BASE DE ALGINATO DE CÁLCIO: UMA ABORDAGEM
SUSTENTÁVEL PARA O CULTIVO DE PLANTAS**

Tese apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, para obtenção do grau de Doutora em Biotecnologia Vegetal.

FERNANDA SENNA FERREIRA COSTA

VILA VELHA

DEZEMBRO/2023

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

- C837d Costa, Fernanda Senna Ferreira.
Desenvolvimento e avaliação de biofertilizantes à base
de alginato de cálcio : uma abordagem sustentável para o cultivo
de plantas / Fernanda Senna Ferreira Costa - 2023.
110 f.: il.
- Orientador: Alessandro Coutinho Ramos
Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal) –
Universidade Vila Velha, 2023.
Inclui bibliografias.
1. Biotecnologia Vegetal. 2. Adubos e fertilizantes.
3. sustentabilidade. I. Ramos, Alessandro Coutinho.
II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 660.6

FERNANDA SENNA FERREIRA COSTA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE BIOFERTILIZANTES À
BASE DE ALGINATO DE CÁLCIO: UMA ABORDAGEM
SUSTENTÁVEL PARA O CULTIVO DE PLANTAS**

Tese apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, para obtenção do grau de Doutora em Biotecnologia Vegetal.

Aprovada em 15 de dezembro de 2023.

Banca Examinadora:



Dra. Janaína Brandão Seibert
ESALQ/USP



Dr. Sávio Bastos de Souza
Instituto Galzu



Dra. Amanda Azevedo Bertolazi
Universidade Vila Velha – UVV



Dr. Alessandro Coutinho Ramos
Universidade Vila Velha - UVV
Orientador

“Por vezes, sentimos que aquilo que fazemos não é, senão, uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse essa gota.”

(Madre Teresa de Calcutá)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de iniciar meus agradecimentos expressando minha gratidão à Deus, cuja orientação, força e inspiração estiveram presentes em todos os momentos desta jornada acadêmica.

Aos meus pais Fernando e Tereza e ao meu irmão Renato, cujo amor incondicional, apoio incansável e incentivo foram fundamentais em minha vida.

Ao meu marido Luiz Flávio e ao meu querido filho Luiz Felipe, agradeço por serem minha âncora, por compreenderem os desafios deste caminho e por serem luz nos momentos mais difíceis. O apoio e compreensão foram essenciais para a minha realização.

Ao meu estimado orientador, Alessandro Coutinho Ramos, por ter me aceito em seu grupo de pesquisa, pelos ensinamentos, amizade e paciência demonstrados ao longo deste percurso.

A todos do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia, pela receptividade, amizade e excelente convívio. Agradeço em especial à Amanda Bertolazi pelos ensinamentos e idéias compartilhadas, aos alunos de iniciação científica, Alana Ramos e Flávio Alves, que tiveram diretamente envolvidos na realização deste trabalho e pelas inúmeras ajudas nos experimentos, e à Clarisse Arpini, que além de termos iniciado juntas essa etapa acadêmica, vivenciamos a maternidade e compartilhamos experiências além da vida acadêmica. Ao Arthur Ribeiro, Bianca do Carmo, Brena de Souza, Elaine Cruz, Felipe Barros, Kamila Pais e Maria Eduarda Luppi, pelos auxílios, idéias compartilhadas, momentos de descontração e de entusiasmo, facilitando minha jornada. Cada um de vocês desempenhou um papel crucial e é parte integrante desta conquista.

Ao Programa de pós-graduação em Biotecnologia Vegetal, e aos ilustres professores que integram esse programa, agradeço pelas orientações valiosas e sabedoria compartilhada.

Aos funcionários da Universidade Vila Velha, cujo comprometimento e dedicação mantêm a estrutura necessária para o progresso das atividades acadêmicas.

À FAPES, pela bolsa de pesquisa.

Por fim, aos meus amigos pessoais, cuja presença, apoio e momentos de descontração foram fundamentais para manter o equilíbrio e a motivação durante essa jornada.

A todos aqueles que porventura não tenha mencionado, mas que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento científico e profissional, o meu mais profundo agradecimento por fazerem parte deste capítulo importante da minha vida e por terem sido pilares fundamentais ao longo desta caminhada! Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO.....	5
2. REFERÊNCIAS	7
CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
1. Biofertilizante	8
2. Tipo de biofertilizantes e seus princípios	10
2.1. Biofertilizantes fixadores de nitrogênio.....	10
2.2. Biofertilizantes solubilizadores de fósforo	11
2.3. Biofertilizantes solubilizadores de potássio	13
2.4. Biofertilizantes solubilizadores de zinco	14
2.5. Biofertilizantes oxidantes de enxofre.....	14
2.6. Biofertilizantes que promovem o crescimento vegetal	15
3. <i>Serendipita indica</i>	17
4. <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	18
5. Consórcios microbianos para produção de bioinoculantes.....	19
6. Tipos de formulações utilizadas para produção de bioinoculantes.....	21
7. Novas tecnologias para produção de bioinoculantes.....	23
7.1. Bioencapsulação	23
7.1.1. Gelificação iônica.....	24
7.1.2. Emulsificação.....	25
7.1.3. <i>Spray-drying</i>	25
7.2. Nanobiofertilizantes.....	26
7.3. Combinação de microrganismos promotores do crescimento vegetal com metabólitos microbianos	28
8. Como os bioinoculantes podem afetar as comunidades microbianas dos solos	30
9. Conclusões	33

10. Referências	34
CAPÍTULO II	47
RESUMO.....	47
ABSTRACT	49
1. INTRODUÇÃO.....	51
2. MATERIAL E MÉTODOS	53
2.1. Obtenção do inóculo – <i>Serendipita indica</i>	53
2.2. Determinação do tempo de fragmentação dos micélios e ensaios de viabilidade	53
2.3. Avaliação da concentração de alginato de sódio para elaboração das esferas	54
2.5. Material vegetal e inoculação das esferas em plantas de milho	55
2.6. Análises dos parâmetros de crescimento vegetal	55
2.7. Determinação da taxa de colonização fúngica	56
2.8. Determinação do conteúdo de macro e micronutriente	56
2.9. Delineamento experimental e análise estatística	56
3. RESULTADOS	58
3.1. Determinação do tempo de fragmentação	58
3.2. Teste de concentração do alginato de sódio	58
3.3. Ensaio de viabilidade com diferentes proporções de micélios	59
3.4. Análise dos parâmetros de crescimento vegetal	63
3.5. Determinação da taxa de colonização fúngica	65
3.6. Conteúdo de macro e micronutrientes	66
4. DISCUSSÃO.....	68
5. CONCLUSÕES.....	74
6. REFERÊNCIAS	74
CAPÍTULO III	80
RESUMO.....	80
ABSTRACT	82

1. INTRODUÇÃO.....	84
2. MATERIAL E MÉTODOS	87
2.1. Obtenção do inóculo de <i>S. indica</i> e encapsulamento em alginato de cálcio	87
2.2. Obtenção do inóculo de <i>H. seropedicae</i> e encapsulamento em alginato de cálcio	88
2.3. Interação sinérgica entre <i>S. indica</i> e <i>H. seropedicae</i>	88
2.4. Obtenção das esferas de alginato de cálcio contendo consórcio microbiano	89
2.5. Eficiência de encapsulamento das esferas de alginato contendo <i>H. seropedicae</i> e consórcio microbiano.....	89
2.6. Material vegetal e inoculação das esferas em sementes de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.).....	90
2.7. Avaliação dos parâmetros de crescimento vegetal	90
2.8. Determinação da taxa de colonização fúngica.....	91
2.9. Determinação do conteúdo de macronutrientes.....	91
2.10. Delineamento experimental e análise estatística	91
3. RESULTADOS	92
3.1. Interação sinérgica entre <i>S. indica</i> + <i>H. seropedicae</i>	92
3.2. Eficiência do encapsulamento das esferas de alginato de cálcio contendo <i>H. seropedicae</i> e o consórcio microbiano (<i>S. indica</i> + <i>H. seropedicae</i>).....	93
3.3. Avaliação dos parâmetros de crescimento vegetal	93
3.4. Determinação da taxa de colonização fúngica.....	95
3.5. Conteúdo de macronutrientes	95
4. DISCUSSÃO.....	96
5. CONCLUSÕES.....	103
6. REFERÊNCIAS	104

RESUMO

COSTA, FERNANDA SENNA FERREIRA, D.Sc, Universidade Vila Velha – ES, dezembro de 2023. **Desenvolvimento e avaliação de biofertilizantes à base de alginato de cálcio: uma abordagem sustentável para o cultivo de plantas.** Orientador: Alessandro Coutinho Ramos.

Nos últimos anos o setor agrícola tem enfrentado grandes desafios, principalmente devido à intensificação da atividade humana e a prática de utilização excessiva e indiscriminada de fertilizantes químicos. Esses produtos, apesar de aumentarem a produção agrícola, podem estar associados a diversos problemas ambientais, como poluição das águas e dos solos, degradação do ecossistema e perda da biodiversidade. Como alternativa, a agricultura moderna tem buscado soluções mais sustentáveis, como o uso de biofertilizantes. Os biofertilizantes podem ser compostos por microrganismos (bactérias, fungos e/ou algas) na forma isolada ou em consórcio, capazes de colonizar a rizosfera, tornando o ecossistema do solo mais dinâmico e oferecendo uma abordagem promissora para promover o crescimento e desenvolvimento de espécies vegetais de maneira sustentável. O alginato de cálcio é um polímero natural, mais comumente utilizado como agente de encapsulamento em formulações bioinoculantes, por ser capaz de fornecer proteção aos microrganismos contra condições adversas e proporcionar uma liberação controlada ao longo do tempo, otimizando a eficiência da fertilização. Apesar de apresentarem grande potencial, há desafios que ainda precisam ser superados na elaboração dos biofertilizantes, tais como o aumento na viabilidade durante armazenamento e transporte, além de suas propriedades funcionais após aplicação em campo. A avaliação do impacto desses produtos após aplicação em culturas de importância econômica é essencial para fornecer subsídios para adoção de estratégias que garantem o fornecimento de alimentos em um ambiente cada vez mais afetado pela atividade humana, mantendo a sustentabilidade dos sistemas agrícolas. Assim, esse estudo teve como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia para encapsulamento do fungo endofítico *Serendipita indica* e da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*, na forma isolada e em consórcio, a fim de avaliar as características morfológicas e nutricionais após inoculação em plantas de interesse comercial, como o milho (*Zea mays* L.) e tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Os resultados obtidos nesse estudo sugerem que os microrganismos, tanto

na forma isolada quanto em consórcio, são capazes de proporcionar um aumento nos parâmetros analisados. No entanto, mais estudos são necessários, a fim de aperfeiçoar a técnica utilizada para encapsulamento, buscando principalmente aumento na viabilidade do bioinoculante, além de novas estratégias para inoculação.

Palavras-chave: biofertilizantes; alginato de cálcio; fertilizantes químicos; sustentabilidade; *Serendipita indica*; *Herbaspirillum seropedicae*.

ABSTRACT

COSTA, FERNANDA SENNA FERREIRA, D.Sc, University of Vila Velha – ES, december, 2023. **Development and evaluation of calcium alginate-based biofertilizers: a sustainable approach for plant cultivation.** Advisor: Alessandro Coutinho Ramos.

In recent years, the agricultural sector has faced major challenges, mainly due to the intensification of human activity and the practice of excessive and indiscriminate use of chemical fertilizers. These products, despite increasing agricultural production, can be associated with several environmental problems, such as water and soil pollution, ecosystem degradation and loss of biodiversity. As an alternative, modern agriculture has sought more sustainable solutions, such as the use of biofertilizers. Biofertilizers can be composed of microorganisms (bacteria, fungi and/or algae) in isolation or in consortium, capable of colonizing the rhizosphere, making the soil ecosystem more dynamic and offering a promising approach to promote the growth and development of plant species in a sustainable way. Calcium alginate is a natural polymer, most commonly used as an encapsulation agent in bioinoculant formulations, as it is capable of providing protection to microorganisms against adverse conditions and providing a controlled release over time, optimizing fertilization efficiency. Despite presenting great potential, there are challenges that still need to be overcome in the development of biofertilizers, such as the increase in viability during storage and transport, in addition to their functional properties after application in the field. Evaluating the impact of these products after application to economically important crops is essential to provide support for the adoption of strategies that guarantee the supply of food in an environment increasingly affected by human activity, maintaining the sustainability of agricultural systems. Thus, this study aimed to develop a methodology for encapsulating the endophytic fungus *Serendipita indica* and the diazotrophic bacterium *Herbaspirillum seropedicae*, in isolated form and in consortium, in order to evaluate the morphological and nutritional characteristics after inoculation in plants of commercial interest, such as corn (*Zea mays* L.) and tomato (*Solanum lycopersicum* L.). The results obtained in this study suggest that microorganisms both isolated and in consortium, are capable of providing an increase in the analyzed parameters. However, more studies are necessary in order

to improve the technique used for encapsulation, mainly seeking to increase the viability of the bioinoculant, as well as new strategies for inoculation.

Keywords: biofertilizers; calcium alginate; chemical fertilizers; sustainability; *Serendipita indica*; *Herbaspirillum seropedicae*.

1. INTRODUÇÃO

Apesar de o setor agrícola ocupar sempre o topo das progressões tecnológicas, os desafios para manter o fornecimento de alimentos em um ambiente fortemente afetado pela atividade humana ainda são grandes e a adoção de estratégias se torna necessárias (Vejan et al., 2019; Szopa et al., 2022). A estagnação no rendimento das plantações, mudanças climáticas, baixa eficiência no uso de nutrientes pelas espécies vegetais, diminuição da matéria orgânica do solo e redução de terras aráveis, são as principais consequências da intensificação da atividade agrícola nos últimos anos (Vejan et al., 2019).

Embora sejam importantes para o fornecimento de nutrientes e levem a aumentos significativos na produção agrícola, o uso intensivo de fertilizantes químicos também está associado a uma série de desafios ambientais, incluindo a poluição dos solos e água, degradação dos ecossistemas e a perda da biodiversidade (Zang et al., 2017). Nesse contexto, fica evidente a necessidade de adoção de alternativas mais sustentáveis para equilibrar a busca por altos rendimentos e a preservação do meio ambiente e saúde dos solos. A agricultura moderna, buscando resolver ou minimizar esses impactos, vem buscando alternativas, como a utilização de inoculantes microbianos ou biofertilizantes (Szopa et al., 2022).

Os biofertilizantes são produtos orgânicos, que podem conter diferentes grupos de microrganismos, tais como fungos, bactérias, algas e/ou protozoários. Esses microrganismos são capazes de colonizar a rizosfera, proporcionando uma série de benefícios para o crescimento e desenvolvimento das espécies vegetais (Vassilev et al., 2020). Esses microrganismos são capazes de colonizar a rizosfera e/ou o interior das plantas, desempenhando um papel fundamental na promoção de atividades bióticas nos ecossistemas dos solos, tornando-os mais dinâmicos e sustentáveis para o crescimento de culturas (Daniel et al., 2022).

Muitos estudos relatam o isolamento e a caracterização de microrganismos potenciais para uso agrícola, no entanto, poucos inoculantes chegam ao mercado, uma vez que existem fatores limitantes que podem determinar sua eficiência em condições de campo (Vassilev et al., 2020).

A eficácia dos bioinoculantes comerciais, muitas vezes é comprometida, devido à falta de viabilidade dos microrganismos durante armazenamento e

transporte, bem como suas propriedades funcionais após a aplicação em campo (Perez et al., 2018). Para superar esses desafios, diferentes tipos de formulações, empregando aditivos e agentes carreadores, estão sendo estudadas atualmente. O alginato de cálcio é um dos agentes carreadores mais utilizados para veicular microrganismo em bioformulações, principalmente por ser biocompatível, não tóxico, biodegradável e capaz de oferecer proteção aos microrganismos em condições de estresse ambiental (Lobo et al., 2019).

Diante desses fatos, é essencial a avaliação do impacto desses bioinoculantes em culturas de importância econômica, a fim de fornecer subsídios para a promoção de práticas agrícolas mais sustentáveis, que equilibram a produtividade e preservação do meio ambiente.

Assim, o objetivo desse estudo foi o desenvolvimento de uma metodologia para elaboração de um inoculante biológico, baseado na utilização do fungo *Serendipita indica* e da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*, encapsulados em esferas de alginato de cálcio, na forma isolada e em consórcio, bem como sua caracterização físico-química e a influência da sua utilização sobre os parâmetros de crescimento e nutrição de plantas de milho (*Zea mays* L.) e tomate (*Solanum lycopersicum* L.).

Com isto, este trabalho está dividido em capítulos, e tem como revisão bibliográfica, o Capítulo I. No Capítulo II, “Avaliação dos efeitos do encapsulamento do fungo *Serendipita indica* nos parâmetros morfológicos e nutricionais de plantas de milho (*Zea mays* L.)”, encontram-se os resultados obtidos a partir do desenvolvimento da metodologia para elaboração das esferas contendo micélios fragmentados do fungo *Serendipita indica*, em relação à viabilidade, e caracterização físico-química; e os resultados da avaliação dos parâmetros morfológicos e nutricionais em plantas de milho (*Zea mays* L.), após a inoculação direta dos micélios fúngicos fragmentados e das esferas de alginato de cálcio contendo os micélios. E o Capítulo III, “Potencial utilização de biofertilizantes à base de alginato de cálcio para o cultivo sustentável de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*)”, encontram-se os resultados obtidos a partir do consórcio entre o fungo *S. indica* e a bactéria *H. seropedicae*, e a avaliação, após a inoculação dos microrganismos encapsulados em esferas de alginato de cálcio, na forma livre e em consórcio, sobre o perfil nutricional e morfológico de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.).

1. REFERÊNCIAS

- Daniel AI, Fadaka AO, Gokul A, Bakare OO, Aina O, Fisher S, Burt AF, Mavumengwana V, Keyster M, Klein A (2022) Biofertilizer: The Future of Food Security and Food Safety. *Microorganisms* 10(6). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061220>
- Lobo CB, Tomás MSJ, Viruel E, Ferrero MA, Lucca ME (2019) Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural Technologies. *Microbiological Research* 219: 12-25. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.10.012>
- Perez J, Francois NJ, Maroniche GA, Borrajo MP, Pereyra MA, Creus CM (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>
- Szopa D, Mielczarek M, Skrzypczak D, Izydorczyk G, Mikula K, Chojnacka K, Witek-Krowiak A (2022) Encapsulation efficiency and survival of plant growth-promoting microorganisms in an alginate-based matrix – A systematic review and protocol for a practical approach. *Industrial Crops and Products* 181. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114846>
- Vassilev N, Martos V, Moral LFG, Kowalska J, Tylkowski B, Malusá E (2020) Formulation of Microbial Inoculants by Encapsulation in Natural Polysaccharides: Focus on Beneficial Properties of Carrier Additives and Derivatives. *Frontiers in Plant Science* 11(270). <https://doi.gov/10.3389/fpls.2020.00270>
- Vejan P, khadiran T, Abdullah R, Ismail S, Dadrasnia A (2019) Encapsulation of plant growth promoting Rhizobacteria—prospects and potential in agricultural sector: a review. *Journal of Plant Nutrition* 42(19):2600-2623. <https://doi.gov/10.1080/01904167.2019.1659330>
- Zhang Y, Yin C, Cao S, Cheng I, Wu G, Guo J (2017) Heavy metal accumulation and health risk assessment in soil-wheat system under different nitrogen levels. *Science of the Total Environment* 622-623:1499-1508. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.317>

CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Biofertilizante

Embora ocorram naturalmente na rizosfera e nos tecidos vegetais, as populações de microrganismos promotores do crescimento vegetal são muitas vezes insuficientes para produzirem o efeito desejado. Assim, é recomendável o isolamento do ambiente natural e multiplicação da sua população antes da adição nos solos (Naamala e Smith, 2020).

Os inoculantes microbianos, ou biofertilizantes, são produtos compostos por cepas de microrganismos vivos ou latentes (bactérias, fungos, algas e/ou protozoários), (Seenivasagan e Babalola, 2021). Através da associação simbiótica com as raízes das espécies vegetais, esses microrganismos podem desempenhar um papel significativo no crescimento, atuando em mecanismos diretos, como a fixação de nitrogênio, produção de fitohormônios, solubilização de fosfato e potássio e indiretos, conferindo proteção à planta dos efeitos deletérios de fitopatógenos, através da produção de HCN, antibiótico, sideróforos e enzimas líticas (quitinases, celulasas, proteases, lipases, entre outras) que atuam na lise de paredes celulares de muitos fungos patogênicos (Kour et al., 2020; Mahmud et al., 2021).

Nas últimas décadas grande progresso foi feito em relação às pesquisas para produção de biofertilizantes, com o isolamento, identificação e caracterização de inúmeros microrganismos com potencial para serem empregados como substitutos totais ou parciais dos fertilizantes sintéticos (Kour et al., 2020; Fasusi et al., 2020). Fungos (endofíticos e micorrízicos) e rizobactérias promotoras do crescimento vegetal são, atualmente, os microrganismos mais estudados para composição de inoculantes microbianos, por desempenharem papéis vitais na garantia da disponibilidade de nutrientes no solo e por melhorarem o crescimento e rendimento das plantas (Fasusi et al., 2020).

A tecnologia envolvida na produção de biofertilizantes é relativamente simples e o custo de produção é baixo. No entanto, alguns critérios devem ser considerados na elaboração, como: seleção e isolamento de uma cultura adequada, determinação das propriedades dos microrganismos selecionados em meio adequado com condições de crescimento apropriadas, promoção do aumento da biomassa

microbiana, seleção de um transportador, formulação do bioinoculante, estudos de campo e produção em nível industrial, estabelecimento de um sistema de controle de qualidade, armazenamento e transporte (Tabacchioni et al., 2021; Kadmiri et al., 2021).

A seleção de cepas para composição de uma formulação bioinoculante é uma etapa desafiadora. Os microrganismos não devem ser seletivos ou altamente direcionados para uma espécie hospedeira. Além disso, devem ser capazes de sobreviver nos solos competindo com a microbiota nativa e com as condições abióticas adversas e não devem ter efeito antagônico com outros microrganismos benéficos da rizosfera (Meena et al., 2020).

Os bioinoculantes podem ser aplicados diretamente nos solos, sementes, raízes ou folhas (menos comum) das espécies vegetais (Lopes et al., 2021). Cada método apresenta vantagens e desvantagens, sendo que a decisão da escolha está diretamente relacionada ao conhecimento das propriedades dos inoculantes, tipo de cultivo, condições ambientais e possíveis restrições por parte dos agricultores (Mahmood et al., 2016).

A pureza, juntamente com a técnica e o local de inoculação, desempenha um papel fundamental no estabelecimento dos bioinoculantes em condições de campo. A eficácia pode ser reduzida devido aos efeitos residuais nocivos de produtos químicos sintéticos e pelas condições abióticas desfavoráveis, tais como seca, salinidade, acidez ou alcalinidade, entre outros. A utilização em locais onde há rotação de culturas também pode influenciar a dinâmica dos microrganismos da rizosfera, e assim, comprometer a eficácia dos bioinoculantes (Basu et al., 2021).

Em condições controladas, como experimentos em casa de vegetação, os bioinoculantes são mais propensos a terem um maior estabelecimento, uma vez que há poucos fatores que podem influenciar sobre o seu desempenho. No entanto, os mesmos resultados podem não ser obtidos em condições de campo, onde existem inúmeras variáveis que podem influenciar o desempenho (Cornell et al., 2021). Além disso, os solos utilizados em condições experimentais controladas geralmente são estéreis, permitindo fácil acesso dos microrganismos (Martínez-Viveros et al., 2010).

2. Tipo de biofertilizantes e seus princípios

Os biofertilizantes utilizados na agricultura são categorizados de acordo com a função exercida pelos microrganismos utilizados em sua composição, sendo os mais comuns: fixadores de nitrogênio, solubilizadores de fósforo, potássio e zinco, oxidantes de enxofre e promotores do crescimento vegetal (Itelima et al., 2018; Fasusi et al., 2020; Seenivasagan e Babalola, 2021).

2.1. Biofertilizantes fixadores de nitrogênio

O nitrogênio (N) é um dos principais macronutrientes encontrado nas espécies vegetais e corresponde a aproximadamente 2% da matéria seca total, sendo sua deficiência responsável pela redução no crescimento, amarelamento de folhas e ramificação reduzida em leguminosas (Hakim et al., 2021).

As plantas podem receber o nitrogênio através da degradação da matéria orgânica nos solos, aplicação direta de fertilizantes sintéticos ou através da fixação biológica de nitrogênio, sendo essa a maior fonte para as plantas e a principal forma de distribuição do nutriente no ecossistema (Soumare et al., 2020).

A fixação biológica de nitrogênio ocorre exclusivamente pela atuação de microrganismos específicos, também chamados de diazotróficos, pertencentes a diversos gêneros, tais como: *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Enterobacter*, *Mesorhizobium*, *Mitsuaria*, *Nostoc*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (Fasusi et al., 2020; Mahmud et al., 2021).

Apesar de abundante na atmosfera, a maior parte do nitrogênio se encontra em sua forma inerte (N_2) e não é diretamente utilizado pelas espécies vegetais. Assim, por meio de um complexo sistema enzimático, esses microrganismos convertem o nitrogênio atmosférico em uma forma não tóxica (principalmente NH_4^+) e assimilável pelas espécies vegetais para a síntese de biomoléculas, tais como vitaminas, proteínas e ácidos nucleicos (Kour et al. 2020; Soumare et al., 2020; Hakim et al., 2021).

Os microrganismos fixadores de nitrogênio são divididos em dois grandes grupos: os simbióticos e os de vida livre (Kour et al., 2020; Hakim et al., 2021).

Os fixadores de nitrogênio simbióticos compreendem bactérias de diferentes gêneros, tais como, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium* e *Mesorhizobium*, que se encontram na rizosfera de plantas leguminosas e também bactérias do gênero *Frankia*, que se associam a espécies não leguminosas. Esses microrganismos vivem em mutualismo com a planta hospedeira, formando nódulos radiculares (Hakim et al., 2021; Daniel et al., 2022).

Já os fixadores de nitrogênio de vida livre estão presentes na rizosfera de plantas não-leguminosas e não formam qualquer relação simbiótica e também não precisam de um hospedeiro específico, sendo os mais comuns, bactérias dos gêneros *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Mitsuaria* e *Pseudomonas* (Soumare et al., 2020).

O impacto positivo do uso de microrganismos fixadores de nitrogênio na agricultura impulsionou a produção mundial e atualmente domina o mercado de biofertilizantes. Nesse cenário, a América do Norte (Estados Unidos, Canadá e México) ocupa o primeiro lugar, seguido por países da Europa (Alemanha, Reino Unido, Espanha, Itália e França), Ásia e Pacífico (China, Japão, Índia e Nova Zelândia) (Soumare et al., 2020).

2.2. Biofertilizantes solubilizadores de fósforo

O fósforo (P) é um macronutriente que, assim como o nitrogênio, é essencial para o desenvolvimento e crescimento das espécies vegetais e está envolvido em processos fisiológicos e bioquímicos, incluindo fotossíntese, respiração, divisão celular, biossíntese de macromoléculas e desenvolvimento radicular (Billah et al., 2019; Hakim et al., 2021). Corresponde de 0,2 a 0,8 % do peso seco de uma espécie vegetal, sendo que sua deficiência pode resultar em crescimento atrofiado das plantas e baixa produtividade (Kalayu, 2019; Hakim et al., 2021).

Nos solos, o P pode ser encontrado tanto na forma orgânica quanto inorgânica, e, na maioria das vezes, em maiores proporções que outros importantes nutrientes, como nitrogênio (N) e potássio (K) (Billah et al., 2019; Kalayu, 2019). No entanto, apesar de abundante, apenas uma fração de 0,1% se encontra na forma solúvel (HPO_4^{2-} ou HPO_4^{4-}) e disponível para ser utilizado diretamente pelas espécies vegetais (Kour et al., 2020; Hakim et al., 2021).

O fósforo orgânico é originário principalmente da decomposição da matéria orgânica, mas também pode ser resultado de adições freqüentes de produtos, como pesticidas, detergentes, antibióticos (Kour et al., 2020; Kalayu, 2019). A maior parte do fósforo orgânico se encontra na forma de fosfato de inositol (10-50%), fosfatos de açúcar, fosfolipídeos (1-5%), nucleotídeos (0,2-2,5%), fosfoproteínas e fosfonatos. A maioria desses compostos é de alto peso molecular e não são facilmente absorvidos pelas espécies vegetais (Hakim et al., 2021).

Já o fósforo inorgânico, é encontrado nos solos devido à decomposição de rochas e também após a aplicação de fertilizantes químicos, e é seqüestrado por absorção ou precipitação. Em solos ácidos, o fósforo é fixado em Fe^{3+} ou Al^{3+} , formando AlPO_4 e/ou FePO_4 e em solos mais alcalinos, é fixado em Ca^{2+} , formando $(\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2)$ (Kalayu, 2019; Kour et al., 2020; Hakim et al., 2021).

Os microrganismos dos solos desempenham um papel importante na absorção de fósforo pelas espécies vegetais, através da mineralização do fósforo orgânico, pela ação de enzimas fosfatases e fitases, que irão promover a solubilização do fósforo e degradação do restante da molécula (Hakim et al. 2021), e a solubilização do fósforo inorgânico, que irá convertê-lo em formas solúveis (HPO_4^{2-} e HPO_4^{4-}), através de processos de produção de ácidos orgânicos, quelação e reações de troca iônica, tornando-os disponíveis para serem usados pelas espécies vegetais (Alori et al., 2017; Kour et al., 2020).

Alguns microrganismos podem também imobilizar quantidades significativas de fosfato em suas estruturas celulares (como por exemplo, em ácidos nucleicos, ésteres de fósforo orgânico, fosfato inorgânico livre e coenzimas), liberando-o gradativamente nos solos, para ser utilizado pelas espécies vegetais em longo prazo (Hallama et al, 2019). A degradação e liberação do fósforo armazenado são catalisadas por enzimas, lipases e várias quinases específicas de polifosfatos, sendo a taxa de liberação diretamente proporcional à quantidade de fósforo disponível, disponibilidade de carbono, textura do solo e composição da comunidade microbiana (Timofeeva et al., 2022).

Grupos específicos de microrganismos solubilizadores de fosfato, pertencentes a diversos gêneros, incluindo bactérias (*Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevundimonas*, *Burkholderia*, *Delftia*, *Enterobacter*, *Gordonia*, *Klebsiella*, *Phyllobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Xanthomonas*) (Kalayu, 2019; Hakim et al.,

2021), fungos (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Saccharomyces*, *Trichoderma* e *Yarrowia*) (Alori et al., 2017; Kalayu, 2019; Kour et al., 2020), actinomicetos (*Actinomyces*, *Micromonospora* e *Streptomyces*) (Alori et al., 2017; Kalayu, 2019) e micorrizas arbusculares (*Gigaspora* e *Glomus*) (Alori et al., 2017; Kour et al., 2020), estão sendo utilizados em formulações biofertilizantes e vem ganhando atenção devido às suas vantagens, como segurança, baixo custo e alta eficiência (Timofeeva et al., 2022).

2.3. Biofertilizantes solubilizadores de potássio

O potássio (K) é um macronutriente essencial para o desenvolvimento das espécies vegetais, e desempenha papel vital nos processos fisiológicos e metabólicos, incluindo fotossíntese, crescimento, assimilação e acúmulo de açúcares, regulação do equilíbrio hídrico e turgor das células, controle de crescimento das raízes e melhoria da resistência a estresses bióticos e abióticos (Kour et al., 2020).

Nos solos, apenas 1–2% do K pode ser utilizado diretamente pelas plantas, sendo o restante, fixado em minerais e não disponível para absorção direta (Sun et al., 2020). Em alguns solos, o K está disponível abaixo da quantidade requerida pelas espécies vegetais, devido, principalmente ao rápido esgotamento por cultivares de alto rendimento em sistemas de cultivo intensivo, juntamente com a falta de protocolos eficazes de reposição do nutriente (Sattar et al., 2019).

A fim de superar essas restrições e manter os níveis suficientes de K disponível nos solos para sustentar a produção agrícola, é necessária a adoção de técnicas alternativas. Nesse sentido, a utilização de microrganismos solubilizadores de potássio é uma estratégia viável para aumentar a disponibilidade desse nutriente (Kour et al., 2020). Grupos específicos de microrganismos envolvendo bactérias (*Aminobacter*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Bacillus circulans*, *Burkholderia*, *Enterobacter hormaechei*, *Paenibacillus* sp., *Pseudomonas*, *Paenibacillus glucanolyticus* e *Sphingomonas*) e fungos (*Aspergillus terreus*, *Glomus mosseae*, *G. intraradices*, *A. niger* e *Penicillium* sp.) possuem a capacidade comprovada de solubilização de potássio (Satar et al., 2019; Kour et al., 2020; Yadav, 2017).

Esses microrganismos podem utilizar diversos mecanismos, como a produção de sideróforos, compostos fenólicos, ácidos orgânicos (como por exemplo, ácidos láctico, cítrico e acético), além de outros metabólitos, para reduzir o pH da rizosfera, e favorecer a solubilidade de cátions como Fe, K e Mg (Kour et al., 2020; Sattar et al., 2019). Além disso, os microrganismos solubilizadores de K podem formar complexos com íons metálicos nas superfícies dos minerais, tornando-os disponíveis para serem utilizados pelas espécies vegetais (Badr et al., 2006).

2.4. Biofertilizantes solubilizadores de zinco

O Zn é um dos micronutrientes dominantes, requerido em pequenas quantidades pelas espécies vegetais ($> 0,2$ mg/g de matéria seca), e está envolvido no metabolismo dos carboidratos e auxinas, atuando também como antioxidante (Kamran et al., 2017). Depois do Fe, é o mineral mais importante e abundante nos organismos vivos, e aparece em todas as classes de enzimas (Kumar et al., 2011).

As plantas absorvem o Zn na sua forma catiônica (Zn^{2+}). No entanto, a maior parte do Zn encontrado nos solos está presente em frações insolúveis e não disponíveis para ser utilizado diretamente pelas espécies vegetais. A solubilização do Zn é indispensável na ciclagem de nutrientes para um melhor crescimento e desenvolvimento das espécies vegetais (Bhatt e Maheshwari, 2020).

Os microrganismos são capazes de converter a forma insolúvel do Zn na forma solúvel, através da produção de ácidos orgânicos, com conseqüente acidificação do meio, extrusão de prótons ou pela produção de sideróforos (Kamran et al., 2017; Khanghahi et al., 2018).

Entre os microrganismos solubilizadores de Zn, bactérias dos gêneros *Acinetobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Gluconacetobacter* e *Pseudomonas* são os mais importantes (Khoshru et al., 2023).

2.5. Biofertilizantes oxidantes de enxofre

O enxofre (S) desempenha um papel essencial na biossíntese dos aminoácidos metionina, cistina e cisteína, que são cruciais para a vida animal e

vegetal, além de estar diretamente envolvido na biossíntese de biomoléculas, ou indiretamente, afetando a síntese de compostos e outros nutrientes. O teor de enxofre pode variar de 0,05% a 0,5% em relação à matéria seca, a depender da espécie vegetal (Ranadev et al., 2023).

Apesar de ser um micronutriente essencial para o desenvolvimento e crescimento das espécies vegetais, a nutrição com o enxofre (S) veio recebendo pouca atenção por décadas, uma vez que a própria atmosfera era capaz de fornecer quantidades suficientes e adequadas às espécies vegetais (Anandham et al., 2014). No entanto, com o aumento no uso de fertilizantes químicos (NPK), especialmente os que não contêm S, uso reduzido de pesticidas contendo S, cultivo intensivo de variedades de alto rendimento, combinado com o balanço negativo entre as grandes quantidades de S emitida para a atmosfera e a baixa capacidade de absorção dos solos, observa-se uma baixa disponibilidade do nutriente nos solos (Joshi et al., 2021; Ranadev et al., 2023).

Formas orgânicas e inorgânicas do S podem ser encontradas nos solos. Apesar de ser facilmente absorvida pelas raízes vegetais, a forma inorgânica (SO_4^{2-}), representa apenas 5% do S total, sendo o restante, encontrado sob a forma orgânica, provenientes do intemperismo dos minerais do solo, da atmosfera e do enxofre originalmente ligado (Joshi et al., 2021).

A transformação do enxofre elementar em sulfato, que é a forma que a planta consegue absorver o nutriente, ocorre devido à ação de microrganismos (Dixit et al., 2015). Os microrganismos oxidantes de S são principalmente bactérias gram-negativas, e de acordo com sua atividade metabólica, são divididas em dois grupos: os quimiotróficos obrigatórios, que só podem crescer quando fornecidos compostos de enxofre oxidáveis e CO_2 (fonte de carbono metabólico), incluindo espécies dos gêneros *Thiobacillus*, *Thiomicrospira* e *Thiosphaera*, e heterótrofos, que também podem usar o modo de crescimento quimiotrófico, e incluem espécies dos gêneros *Paracoccus*, *Xanthobacter*, *Alcaligenes* e *Pseudomonas* (Vidyalakshmi et al., 2009).

2.6. Biofertilizantes que promovem o crescimento vegetal

Os microrganismos promotores do crescimento vegetal (MPCV) incluem uma variedade de espécies, que interagem positivamente com as plantas, podendo

habitar regiões rizosféricas e/ou endofíticas. Esses microrganismos atuam na mobilização e transporte de nutrientes, aumento da área de absorção das raízes, produção de fitohormônios e de compostos voláteis que estimulam o desenvolvimento vegetal, conferem proteção contra patógenos e auxiliam na tolerância à salinidade e a seca, contribuindo, assim para o crescimento e desenvolvimento da espécie vegetal (Naamala e Smith, 2020).

Esses microrganismos são divididos em grupos, cada um com suas características e funções específicas, sendo os mais estudados, as rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (RPCV) e os fungos promotores do crescimento vegetal (FPCM) (Cantabella et al., 2022).

Em geral, as RPCV compreendem bactérias de diferentes gêneros, incluindo, *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Axoarcus* spp., *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, entre outros. É importante ressaltar, que alguns desses microrganismos podem ter mais de uma função, atuando, por exemplo, como promotores de crescimento e agente de biocontrole. Estudos mostram que *Burkholderia cepacia*, além de produzir toxinas para o biocontrole de *Fusarium* sp., também produz sideróforos, estimulando o crescimento de plantas de milho em condições deficientes de ferro (Bhattacharyya e Jha, 2012).

Os fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) incluem diferentes espécies dos gêneros *Arpergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Piriformospora*, *Phoma* e *Rhizoctonia*, que assim como as BPCV, têm a capacidade natural de estimular várias características relacionadas ao crescimento das espécies vegetais (Naziya et al., 2020).

Esses microrganismos podem promover o crescimento vegetal de forma direta ou indireta. Os mecanismos diretos consistem no fornecimento de compostos às plantas, como ácido indol acético (AIA), ácido giberélico (AG), sideróforos, entre outros, além de facilitar a absorção de nutrientes. Por outro lado, a via indireta, está relacionada à limitação ou remoção completa de efeitos prejudiciais dos fitopatógenos, através da excreção de antibióticos, enzimas líticas, aumentando a resistência sistêmica das espécies vegetais (Beneduzi et al., 2012; Bhattacharyya e Jha, 2012).

3. *Serendipita indica*

Nos ecossistemas naturais, as plantas muitas vezes são colonizadas por fungos endofíticos. Esses microrganismos estão presentes no interior das plantas, podendo ser encontrados em diferentes órgãos e tecidos, em parte, ou durante todo seu ciclo de vida (Zuccaro et al., 2011). Os fungos endofíticos freqüentemente estabelecem relações mutualísticas com seus hospedeiros, onde ambos são beneficiados. Por um lado, os endófitos beneficiam-se da proteção, nutrição e abrigo enquanto ajudam o seu hospedeiro, estimulando seu crescimento, desenvolvimento, adaptação e tolerância ao estresse (Fontana et al., 2021).

Serendipita indica (anteriormente conhecido por *Piriformospora indica*), é um fungo endofítico, isolado pela primeira vez em raízes das espécies *Prosopis juliflora* e *Zizyphus mummularia*, no deserto de Thar, na Índia (Verma et al., 1998a).

O fungo é conhecido por sua interação mutualística e benéfica com uma ampla gama de hospedeiros, capaz de promover o crescimento, aumentar a disponibilidade de nutrientes, conferir maior tolerância a estresses bióticos e abióticos (Gill et al., 2016), conferir resistência sistêmica a insetos, microrganismos patogênicos, toxinas e íons de metais pesados, estimular a floração precoce, produção de sementes e aumento de biomassa (Das et al., 2012).

Apesar de possuir ação micorrízica, *S. indica* difere dos fungos micorrízicos arbusculares (FMA) por ser facilmente cultivado em culturas axênicas, formando, de maneira assexuada, clamidósporos em formato de pêra, de 8 a 25 núcleos (Verma et al., 1998b), no córtex das raízes colonizadas e na zona da rizosfera, não atingindo a endoderme e as partes aéreas das plantas (Varma et al., 2012). Além disso, o fungo apresenta um estilo de vida bifásico, começando com seu crescimento biotrófico, resultado da colonização nas células vivas, seguido da morte das células hospedeiras (Zuccaro et al., 2011).

A colonização bem sucedida do fungo *S. indica* depende da supressão do sistema imunológico da raiz, mediada pela elevação do cálcio intracelular e alterações na produção de fitohormônios, funcionando como sinalizadores durante o reconhecimento microrganismo-planta (Jacobs et al., 2011).

Estudos realizados por Saddique et al., (2018), mostraram um aumento na biomassa e maior comprimento de raízes e altura da parte aérea de plantas de arroz, submetidas ao estresse osmótico, após inoculação com *S. indica*. Su et al.,

(2017), avaliaram os efeitos do fungo *S. indica* em plantas de canola (*Brassica napus* L.), e observaram que as plantas tratadas com o microrganismo apresentaram um aumento significativo na biomassa vegetal e rendimento e qualidade do óleo.

Hui et al., (2015) verificaram maior tolerância ao cádmio em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) inoculadas com *S. indica*, através da avaliação da maior interação de Cd nas raízes, de forma que menor concentração é transportado para as folhas.

4. *Herbaspirillum seropedicae*

O gênero *Herbaspirillum* é composto por 12 espécies de microrganismos, sendo apenas *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *H. frisingense*, *H. lusitanum*, *H. hiltneri* com potencial para a interação com plantas, as quais têm sido encontradas em associação com uma grande variedade de vegetais, mais particularmente com os membros da família Poaceae (Monteiro et al., 2012).

H. seropedicae foi isolada da rizosfera de raízes de milho, sorgo e arroz pela primeira vez em 1984, e devido à semelhança com bactérias do gênero *Azospirillum*, esse microrganismos foi descrito pela primeira vez como *Azospirillum seropedicae* (Baldani et al., 1986). Em 1986, estudos de homologia de DNA:DNA identificaram o gênero *Herbaspirillum*, sendo assim renomeada de *H. seropedicae* (Baldani et al., 1986; Baldani e Baldani, 2005).

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria diazotrófica, Gram-negativa, pertencente à subclasse das β -proteobactérias, isolada de espécies vegetais economicamente importantes, como cana-de-açúcar, milho, trigo e arroz (Baldani et al., 1986; Baldani et al., 1992). O diâmetro da célula é de 0,6 a 0,7 μm , com o comprimento variando de 1,5 a 5 μm ; apresenta de um a três flagelos em um ou ambos pólos, sendo uma bactéria capaz de fixar nitrogênio em condições microaeróbicas, em uma ampla faixa de pH (5,3 a 8,0) (Baldani e Baldani, 2005).

H. seropedicae possui metabolismo flexível, sendo capaz de degradar compostos orgânicos e inorgânicos, na maioria das vezes, através da produção de enzimas como as desalogenases, que são capazes de catalisar a quebra da ligação

carbono-halogênio em compostos halogenados como o monofluoroacetato, tornando-o não tóxico (Pedrosa et al., 2011).

Chi et al. (2005) demonstram que as bactérias endofíticas são principalmente recrutadas pelas raízes e posteriormente translocam para o restante da planta. A associação tem início com a quimiotaxia, atraindo as bactérias para a rizosfera. Após esse processo, ocorre a adesão à superfície das raízes, preferencialmente nos pontos de emergência em raízes laterais. A penetração ocorre pelas fissuras radiculares laterais e zonas de alongamento, atingindo os vasos do xilema juntamente com espaços intercelulares, ocorrendo à colonização endofítica na planta, podendo ser encontrada em folhas, brotos e cavidades subestomatais (Olivares et al., 1996; Irineu et al., 2023). De acordo com Pedrosa et al. (2011), *H. seropedicae* não possui genes para degradar as paredes celulares das plantas, no entanto, é um endófito de sucesso, confirmando a existência de outras estratégias para penetrar nos tecidos vegetais.

Quando associadas às espécies vegetais, esse microrganismo pode promover a fixação biológica de nitrogênio (FBN), ajudando a suprir a demanda de N das plantas (Schmidt et al., 2011), produzir reguladores de crescimento, como auxinas e giberelinas (Radwan et al., 2004) e solubilizar fósforo inorgânico (Estrada et al., 2013).

5. Consórcios microbianos para produção de bioinoculantes

A utilização de consórcios microbianos para desenvolvimento de bioinoculantes é uma alternativa estratégica e promissora para a agricultura sustentável. Esses produtos são compostos por duas ou mais cepas de microrganismos, incluindo bactérias, fungos e algas, com funções sinérgicas ou aditivas, que trabalham para fornecer nutrientes e conferir proteção às plantas (Santoyo et al. 2021).

O desenvolvimento de consórcios microbianos é um processo complexo, que envolve a fonte de isolamento dos microrganismos, a combinação de diferentes espécies, a densidade e as estratégias de inoculação (Behera et al.; 2021; Aguilar-Paredes et al., 2020; Liu et al., 2023). Na agricultura, os membros do consórcio

microbiano devem interagir de forma positiva, baseado em relações de cooperação, como o mutualismo, onde os microrganismos presentes necessitam do outro para sobreviver, ou por comensalismo, onde há uma interação positiva unilateral, no qual um membro se beneficia, enquanto o outro não é afetado (Che e Men, 2019).

A comunicação entre os microrganismos que compõem um consórcio microbiano é altamente dependente da troca de metabólitos ou sinais, sendo a sobrevivência facilitada pela diversidade de vias metabólicas, que permite melhor divisão do trabalho, aumentando a capacidade de desempenhar funções mais complexas, além de permitir processos paralelos ou seqüenciais para a utilização de recursos (Che e Men, 2019). A presença de microrganismos capazes de resistirem às flutuações ambientais, como alteração de pH, temperatura, níveis de nutrientes e compostos tóxicos, são exemplos clássicos das vantagens da utilização de consórcios microbianos.

Trabalhos recentes trazem resultados satisfatórios, que sustentam a utilização de consórcios microbianos para melhora nutricional de espécies vegetais. Devi et al., (2022), ao avaliarem os efeitos da inoculação de cepas de microrganismos solubilizadores de P (*E. persicina* EU-A3SK3), K (*H. aquamarina* B2RNL2) e fixadores de N (*P. extremorientalis* EU-B1RTR1) em plantas de pimenta (*Capsicum annum* L.), verificaram que a combinação entre as três cepas melhorou o crescimento e rendimento das plantas, quando comparado aos microrganismos de forma isolada. Outros estudos mostram que a associação de bactérias a fungos micorrízicos pode resultar em melhor estabelecimento de micélios e colonização de raízes de plantas, se a bactéria produzir substâncias que melhorem indiretamente o estabelecimento de micorrizas, como por exemplo, através da produção de antimicrobianos para reduzir a competição de outros microrganismos ou patógenos (Bender et al., 2016).

No entanto, os microrganismos de um consórcio podem interagir de forma negativa, levando à supressão de membros da comunidade microbiana, incluindo o amensalismo, onde o crescimento dos membros pode ser afetado pela produção de compostos tóxicos por outros (Roel et al., 2019); predação e parasitismo, onde o crescimento de uma espécie depende do consumo de outra espécie, fazendo com que a dinâmica populacional sofra oscilações contínuas; e a competição, que é quando os membros do consórcio necessitam de um mesmo recurso (nutriente,

água, entre outros), sendo que as espécies de crescimento mais rápido exercem um domínio ao longo do tempo (Moënné-Loccoz et al., 2015).

Por fim, também podem ocorrer interações neutras, onde os membros do consórcio não influenciam uns aos outros. Nesse caso, as espécies têm divergências nutricionais e nenhuma delas produz compostos inibitórios para outros membros (Roel et al., 2019).

Apesar de inúmeros estudos relatarem efeitos positivos oriundos da utilização de consórcios microbianos, outros mostram que algumas espécies isoladas podem ter desempenho semelhante ao consórcio de microrganismos (Bradáčová et al., 2019). Assim, devido às complexas interações e dinâmicas das espécies dentro de um consórcio microbiano, o melhor entendimento do papel de todos os microrganismos se torna importante para encontrar combinações compatíveis e eficazes para a manutenção e sucesso da inoculação.

6. Tipos de formulações utilizadas para produção de bioinoculantes

A principal função da formulação é melhorar a eficiência e vida útil dos bioinoculantes, através do fornecimento de um microambiente adequado, combinado com uma proteção físico-química, a fim de manter uma maior viabilidade durante armazenamento, transporte e após a inoculação dos microrganismos em campo (Chaudhary et al., 2020).

A formulação de um bioinoculante é composta por uma mistura de uma ou mais cepas, previamente selecionadas, e um veículo carreador, que pode ser de característica orgânica (turfa, carvão, resíduos vegetais), inorgânica (argila, taco) ou polimérica (polissacarídeos, proteínas, polímeros sintéticos) (Szopa et al., 2022). Algumas formulações podem conter também aditivos minerais (bentonita, caulim), materiais orgânicos (turfa, proteínas), outros polímeros (quitosana, gelatina, amido) ou agentes osmoprotetores (açúcares, aminoácidos), que servirão para melhorar o processo de formulação e conferir maior proteção aos microrganismos (Chaudhary et al., 2020; Szopa et al., 2022).

A seleção do agente carreador é uma etapa importante na elaboração de uma formulação bioinoculante e normalmente é feita com base na maior viabilidade dos

microrganismos e conforme o tipo de aplicação desejada (forma líquida ou sólida) (García-Fraile et al., 2015). Além disso, outras características são desejáveis para um bom carreador, como baixo custo, facilidade de utilização, alta capacidade de retenção de água e tamponamento de pH, fácil esterilização, ser biodegradável e de fácil aplicação e manuseio em condições de campo (García-Fraile et al., 2015; Seenivasagan e Babalola, 2021; Itelima et al. 2018).

As formulações líquidas são desenvolvidas a partir de culturas de microrganismos e suas secreções biológicas, adicionados de carreadores líquidos, como óleos orgânicos, água ou emulsões (Vassilev et al., 2020; Raimi et al., 2021).

A principal desvantagem desse tipo de formulação é que atividade metabólica dos microrganismos pode reduzir drasticamente quando as suspensões celulares são adicionadas aos solos, principalmente na ausência ou presença de aditivos inadequados (Vassilev et al., 2020). Além disso, os inoculantes líquidos necessitam temperaturas mais baixas para armazenamento e são mais sensíveis a estresses ambientais (John et al., 2011).

Por outro lado, são facilmente produzidas, possuem baixo custo de produção e permite a adição de nutrientes e agentes protetores, que são capazes de conferir, por exemplo, maior proteção térmica, proporcionando assim, maior vida útil e melhor eficácia em condições de campo (García-Fraile et al., 2015; Raimi et al., 2021). Estudos realizados por Gopal e Baby (2016) mostraram que a suplementação de trealose (15 mM) e do polímero polivinilpirrolidona (PVP – 2,5%), em formulações contendo *Azospirillum* e bactérias solubilizadoras de fosfato resultaram em maior população microbiana (10^8 UFC/mL), e maior vida útil do inoculante, quando comparadas às formulações isentas dos agentes protetores.

Os bioinoculantes sólidos são elaborados a partir da mistura do microrganismo com um agente carreador orgânico ou inorgânico, na forma de grânulos ou pó (Lobo et al., 2019). Nesse tipo de formulação, o agente carreador têm um papel fundamental na manutenção da viabilidade dos microrganismos e deve ser capaz de conferir proteção, criando uma barreira temporária e fornecendo substratos para manutenção do crescimento (Balasubramanian e Karthickumar, 2017).

As formulações sólidas incluem grânulos (100–1000µm), microgrânulos (60–100µm), pós molháveis, pós e pellets molháveis/dispersíveis em água. São

facilmente produzidas e não requerem grandes investimentos financeiros (Mishra e Arora, 2016).

Ambos os tipos de formulações, sólidas e líquidas, apresentam vantagens e desvantagens em relação à sua elaboração e utilização, e a existência de carreadores que atendam todos os requisitos para uma formulação nos parâmetros adequados ainda é um desafio para a ciência. No entanto, as novas tecnologias estão sendo desenvolvidas através da ampliação de carreadores com as melhores características, como é o caso dos polímeros naturais, utilizados nas técnicas de encapsulamento de microrganismos (García-Fraile et al., 2015).

7. Novas tecnologias para produção de bioinoculantes

Apesar das formulações convencionais para desenvolvimento de bioinoculantes apresentarem resultados satisfatórios para a melhoria agrícola, estudos mostram que ainda existem limitações de sua aplicabilidade (Bhattacharjee et al., 2023).

A utilização excessiva de fertilizantes químicos, condições de estresse, tipo de cultura e a competição com a microflora residente do solo são fatores que limitam à eficácia dos biofertilizantes. Além disso, mudanças climáticas flutuantes podem impactar significativamente na dinâmica de interações microbianas e o meio ambiente (Pirttila et al., 2021; Balla et al., 2022).

A fim de minimizar os impactos e aumentar a eficácia das bioformulações, a ciência tem caminhado para o desenvolvimento de novas tecnologias, garantindo maior viabilidade, maior estabilidade durante armazenamento e transporte, facilidade de uso e melhor desempenho em campo (Perez et al., 2018).

7.1. Bioencapsulação

A bioencapsulação é uma técnica bastante utilizada nas indústrias farmacêuticas, alimentícias e agrícolas, para diversas finalidades, quando o objetivo é a obtenção de uma estrutura protetora (Szopa et al., 2022; Chaudhary et al., 2020).

A produção de biofertilizantes pela técnica de bioencapsulação é relativamente fácil, rápida e não requer muitas etapas (Rojas-Sánchez et al., 2022) e tem como objetivo o revestimento dos microrganismos com uma matriz polimérica, que servirá como um microambiente de proteção para as células e seus metabólitos, em condições extremas e adversas (Balla et al., 2022).

As vantagens da bioencapsulação sobre outras bioformulações são cruciais no sistema agrícola. Além do número de células aprisionadas, o processo de encapsulação estabiliza células microbianas e mantém a eficácia durante longos períodos de armazenamento ou mesmo após a aplicação, mantendo as propriedades relacionadas à promoção do crescimento e garantindo uma liberação lenta, uniforme e gradual próximo ao local alvo, para uma colonização mais eficaz (Chaudhary et al., 2020).

Várias são as técnicas descritas na literatura para encapsulamento, sendo as mais utilizadas a gelificação iônica (extrusão ou reticulação), emulsificação e secagem por pulverização (Rojas-Sánchez et al., 2022; Balla et al., 2022). A seleção entre os métodos deve levar em consideração o tamanho das partículas desejadas, que pode variar de macro, micro e nanoencapsulação, e também o material de revestimento e o microrganismo que será utilizado (Szopa et al., 2022).

7.1.1. Gelificação iônica

A gelificação iônica é a técnica mais estudada atualmente, principalmente pelo baixo custo de produção e por condições metodológicas acessíveis (Szopa et al., 2022; Bhattacharjee et al., 2023). O princípio dessa técnica consiste na dispersão de uma solução de um biopolímero contendo o agente microbiano desejado, sobre uma solução aquosa contendo cátions divalentes. Como resultado, tem-se a solidificação das gotículas, após a interação entre as cadeias poliméricas, e a formação de esferas (Szopa et al., 2022). O diâmetro das esferas formadas pode variar conforme equipamento, resultando em macroesferas, microesferas ou até mesmo nanoesferas, com a utilização de equipamentos especiais (Balla et al., 2022).

O alginato de sódio é o biopolímero mais comumente utilizado para encapsulação de microrganismos pelo método de gelificação iônica (Bhattacharjee et al., 2023). É um polímero aniônico, de alto peso molecular, cujas propriedades dependem da composição das cadeias lineares dos ácidos α -L-glucurônico e β -D-manurônico. Ele ocorre naturalmente na parede celular de algas marrons e nas cápsulas bacterianas de *Azotobacter sp.* e *Pseudomonas sp.* (Raus et al., 2021).

7.1.2. Emulsificação

A emulsificação é outra técnica que pode ser utilizada para encapsulamento de microrganismos que consiste na mistura de uma fase dispersa, composta por microrganismos e pelo polímero encapsulante, em uma fase contínua, que geralmente é um óleo ou solvente orgânico (Rojas-Sánchez et al., 2022).

A emulsão é então adicionada a um agente surfactante, como o tween, e então, homogeneizada constantemente, para garantir a estabilidade das esferas. Em seguida, um agente solidificante, como o CaCl_2 , é adicionado à solução para formar as esferas que posteriormente serão filtradas. O diâmetro das esferas formadas vai depender da velocidade de agitação, podendo variar de 25 μm e 2 mm. Polímeros como alginato de sódio, gelatina ou goma e óleos, como óleo de soja e de parafina são os materiais mais utilizados na técnica de emulsificação (Rojas-Sánchez et al., 2022; Balla et al., 2022).

7.1.3. *Spray-drying*

Spray-drying é uma técnica de desidratação que consiste na pulverização de um fluido, onde as células dispersas dos microrganismos são direcionadas para uma câmara de secagem para sofrer atomização, envolvendo ar ou gás quente. A ventilação gerada pelo exaustor resulta na evaporação do solvente, deixando apenas o pó, que na verdade, são micropartículas secas (Sosni e Seremet, 2015; Balla et al., 2022).

Apesar da secagem por pulverização ser uma técnica eficiente para produção de bioinoculantes, se o controle do processo não for totalmente otimizado, pode

impactar negativamente à integridade dos microrganismos, com conseqüente redução na sobrevivência, uma vez que as membranas celulares podem sofrer alterações quando submetidas ao calor (Behboudi-Jobbehdar et al., 2013; Campos et al., 2014). Assim, além do material de imobilização, a biologia das espécies imobilizadas (tipo de cepa, adaptação ao calor ou condições de estresse osmótico, entre outros) e o controle da temperatura de entrada e saída, vazão e o tempo de permanência na câmara de secagem, devem ser criteriosamente monitorados para a produção desse tipo de bioinoculante (Schutyser et al. 2012).

7.2. Nanobiofertilizantes

A nanotecnologia é a integração de diferentes áreas da ciência aplicada, como engenharia, medicina, química, física e biologia, que estudam a estrutura da matéria em escala nanométrica para produzir materiais com propriedades únicas, com maior área superficial, local alvo de ação e liberação lenta (Joshi et al., 2019). Por ser uma área emergente e promissora, vem ganhando espaço no sistema agrícola moderno, como ferramenta versátil para aumentar a produtividade de espécies vegetais (Patel et al., 2023).

Os nanobiofertilizantes são uma classe de fertilizantes que apresentam uma tecnologia conjugada de nanofertilizantes e bioinoculantes, incluindo a utilização de microrganismos benéficos, garantindo a entrega direcionada de nutrientes, a fim de aumentar a produtividade sustentável das culturas (Elnahal et al., 2022).

Esta técnica baseia-se no emprego de nanopartículas, com tamanho igual ou inferior a 100 nm, constituídas de materiais orgânicos ou inorgânicos, onde as células dos microrganismos são integradas em sua estrutura (Veronica et al., 2015). As características do ambiente, como temperatura, umidade, acidez ou alcalinidade dos solos, irá influenciar fortemente na forma como os constituintes da formulação serão liberados para os solos, podendo ser de forma gradual ou rápida (El-Ghamry et al., 2018).

A produção de um nanobiofertilizante envolve três etapas principais: cultivo do microrganismo, adsorção em nanopartículas (silício, ferro, prata, ouro, zinco, cobre, etc) e monitoramento da qualidade, eficácia e armazenamento (Panichikkal et al., 2021). Esses produtos podem ser aplicados nas folhas, sementes ou solos, e devido

ao tamanho reduzido, as nanopartículas atravessam os tecidos vegetais, atingindo rapidamente seu objetivo (Abdelghany et al., 2022).

As nanopartículas podem afetar as interações planta-microrganismo de forma direta, alterando a acessibilidade de nutrientes na rizosfera e indireta, através da estimulação dos microrganismos (Garg et al., 2023). Estudos mostram que a adição de nanopartículas de sílicas em formulação contendo micélios do fungo *Lagenidium giganteum* foi capaz de manter a viabilidade e atividade após 12 semanas de armazenamento em temperatura ambiente (Vandergheynst et al., 2007).

Além de melhorar a fertilidade dos solos, o uso de nanobiofertilizantes pode também melhorar significativamente o desenvolvimento de espécies vegetais. A liberação sustentada e controlada pelos nanomateriais reduz as chances de lixiviação de nutrientes, aumentam a síntese de metabólitos secundários, atenuam os efeitos adversos de produtos químicos tóxicos, reduzem e/ou inibem o crescimento de patógenos, auxiliam na biorremediação, regulam genes responsáveis pela produção de antioxidantes, osmólitos e proteínas relacionadas ao estresse, aumentam os níveis de hormônios de crescimento (AIA e citocinina) e reduzem a produção de hormônios do estresse (ácido abscísico) (Aktar et al., 2022).

Estudos realizados por Hafez et al. (2021), utilizando *Azospirillum lipoferum* e *Bacillus circulance* combinados com nanopartículas de sílica, observaram uma maior taxa fotossintética, conteúdo relativo de água e enzimas antioxidantes, e um aumento na produtividade e absorção de nutrientes em plantas de milho cultivadas sob restrição hídrica. A inoculação de *Bacillus fortis* combinado com nanopartículas de Zn em plantas de *Cucumis melo* L. sob estresse por Cd, reduziu a absorção e translocação do metal na planta e resultou em aumento nos pigmentos fotossintéticos, biomassa, conteúdo de metabólitos secundários (flavonóides, compostos fenólicos) e aumento na transpiração e condutância estomática (Shah et al., 2020).

Apesar de ser uma área promissora, a utilização de nanobiofertilizantes para promoção do crescimento vegetal é uma área que ainda precisa ser bastante estudada, uma vez que faltam dados amplamente comprovados sobre as interações entre os biofertilizantes, nanopartículas e plantas e os efeitos após aplicação na rizosfera e os possíveis impactos na saúde humana. Além disso, é necessário o estabelecimento de protocolos avançados para elaboração de formulações de boa

qualidade, baixo custo, maior vida útil, fácil manuseio e que sejam compatíveis com os mais diversos tipos de culturas e solos (Aktar et al., 2022). A otimização dessas interações visa aprimorar a regulação adicional da entrega e liberação das formulações no local e momento desejados, contribuindo assim para uma aplicação mais eficaz desses produtos.

7.3. Combinação de microrganismos promotores do crescimento vegetal com metabólitos microbianos

O panorama do futuro da indústria agrícola enfrenta desafios decorrentes de pressões regulatórias e preocupações públicas, principalmente relacionadas às questões ambientais. Estes desafios têm estimulado a busca por métodos alternativos aos produtos químicos convencionais, especialmente para aplicações como fertilizantes e pesticidas (Marra et al., 2022).

Dentro desse contexto, a utilização de corretivos orgânicos e microrganismos surgem como uma estratégia promissora para contribuir para o aumento da produção agrícola e saúde das plantas e solos (Marra et al., 2022). No entanto, devido às limitações de aplicabilidade (manutenção da viabilidade, desempenho em condições de campo, entre outros), esse tipo de produto ainda não é capaz de dominar o mercado agrícola, motivando a busca por métodos alternativos (Arora e Mishra, 2016).

Os metabólitos microbianos são produtos naturais de alto valor, que apresentam propriedades farmacológicas significativas, (Ren et al., 2020) e têm sido propostos como alternativas para elaboração de novas bioformulações, de forma isolada ou em combinação com microrganismos vivos (Arora e Mishra, 2016; Berini et al., 2019).

Os flavonóides são uma classe especial de metabólitos de ocorrência natural, sintetizados por plantas e fungos, com importantes funções na planta, como fixação simbiótica de nitrogênio, produção de pigmentos, proteção contra radiação UV, entre outros (Sheng et al., 2020). Essas moléculas são liberadas na forma de exudados radiculares, fornecendo sinais para os microrganismos fixadores de nitrogênio, que por vez produzem fatores de nodulação (Nod), ativando a via de sinalização de

simbiose, aumentando assim a nodulação, fixação de nitrogênio e capacidade de resistência a estresses abióticos (Oldroyd, 2013).

Os polissacarídeos extracelulares (PEC) são importantes moléculas, sintetizadas por bactérias, fungos, leveduras e algas (Angelin e Kavitha, 2020), que auxiliam na nodulação, colonização de raízes, estabelecimento de biofilmes e conferem proteção às células introduzidas sob condições de estresse, neutralizando toxinas e atuando como fonte de carbono (Tewari e Arora, 2015). Essas moléculas podem ser facilmente produzidas em grande escala, principalmente pelo seu baixo custo, podendo, portanto ser usadas como aditivos em bioformulações ou como bioprotetor contra radiações, condições extremas de pH, choque osmótico, dessecação, substâncias tóxicas presentes nos solos e até mesmo de predadores (Arora e Mishra, 2016).

Microrganismos que exibem ação fungicida, inseticida e/ou nematicida são comumente utilizados como agentes de controle biológico. Eles produzem compostos com ação antibiótica e secretam inúmeras enzimas hidrolíticas (quitinases, proteases, lipases e glucanases), que contribuem para a ruptura de estruturas essenciais de patógenos. Uma alternativa atraente é a elaboração de formulações contendo antibióticos e enzimas, que mimetizem agentes de biocontrole vivos (Arora e Mishra, 2016).

A utilização de precursores, como triptofano (para AIA), L-metionina (precursor do etileno), ácido giberlico e citocinina, são também exemplos de biomoléculas que podem ser adicionadas junto aos microrganismos com resultados promissores para as bioformulações. Zahir et al., (2010), verificaram um aumento no rendimento de plantas de feijão submetidas ao estresse salino, após a inoculação com cepas de *Rhizobium phaseoli* na presença de triptofano.

Outros estudos estão direcionados para produção de formulações isentas de microrganismos. Nesse caso, seria uma alternativa à utilização de agentes potencialmente patogênicos, como é o caso de *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus* sp. ou fungos, como o *Purpureocillium lilacinum*, que são grandes produtores de compostos bioativos, no entanto, a utilização direta como bioinoculante não seria viável devido à patogenicidade (Cavello et al., 2015).

No entanto, apesar de parecer vantajoso, a elaboração de formulações contendo apenas metabólitos ainda é restrita, principalmente pela dificuldade em

declarar a composição, devido à diversidade de metabólitos, e também em relação à concentração das substâncias e os processos para purificação (Zacky e Ting, 2013).

8. Como os bioinoculantes podem afetar as comunidades microbianas dos solos

O microbioma vegetal, definido pela diversidade de microorganismos que podem se encontrar associados às plantas é determinante para o desenvolvimento, saúde e produtividade das espécies vegetais (Suman et al., 2022). Estudos mostram que a complexa rede de interações genéticas, bioquímicas, físicas e metabólicas entre a planta hospedeira e a comunidade microbiana associada é capaz de moldar um microbioma e conferir vantagens de aptidão ao hospedeiro, incluindo promoção no crescimento, maior absorção de nutrientes, tolerância ao estresse e resistência a patógenos (Trivedi et al., 2020).

Com o crescimento do mercado de biofertilizantes, impulsionado pela preocupação e maior conscientização dos impactos negativos causados pelos fertilizantes químicos, torna-se necessária maiores investigações sobre a utilização recorrente desses produtos, principalmente, se em longo prazo o microbioma do solo é capaz de manter sua função e estrutura, independente da quantidade de inóculo adicionado; se apresenta capacidade de reorganização após adição do bioinoculante, retornando ao seu estado original; ou se é capaz de construir e melhorar a sua capacidade de adaptação, alcançando um estado alternativo mais estável (Mawarda et al., 2020).

Embora já tenha sido constado que a inoculação microbiana possa afetar freqüentemente as comunidades microbianas residentes nos solos, os mecanismos subjacentes ainda são pouco compreendidos. Fatores ambientais diretos, como disponibilidade de recursos, antagonismo ou sinergismo e indiretos, envolvendo a liberação de exudados pelas raízes das espécies vegetais são estudados (Mawarda et al., 2020).

Em relação à disponibilidade de recursos, estudos mostram que a baixa taxa de sobreposição, entre os nichos dos microrganismos do solo e os nichos dos microrganismos inoculados, aumenta a probabilidade do inoculante se estabelecer com sucesso em seu novo habitat (Ma et al., 2015). Através da acidificação dos

solos ou maior produção de sideróforos, os microrganismos adicionados podem competir com os microrganismos residentes e suprimir, por exemplo, microrganismos que competem por recursos semelhantes, se tornando superiores (Zhang et al., 2009). Estudos recentes revelaram que o aumento das concentrações de biofertilizantes inoculado levou a um maior impacto na diversidade microbiana residente no solo (Dong et al., 2021).

Por outro lado, quando há uma alta taxa de sobreposição, a adição de microrganismos nos solos pode resultar em um impacto transitório, com redução do número de células microbianas (Yin et al., 2013). No entanto, alguns autores relataram que a redução do número de células não implica em necessariamente falta de efetividade no inóculo, e que as alterações provocadas na composição dos microrganismos podem ser persistentes (Florio et al., 2019). Mallon et al., (2018), verificaram que a introdução de *Escherichia coli* não patogênica no solo resultou em mudanças relativas de gêneros bacterianos importantes como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* e *Bradyrhizobium*. Os autores observaram que apesar da comunidade adicionada ter apresentado uma drástica redução após 30 dias de inoculação, a competição por recursos desempenhou papel importante para seleção dos microrganismos. Por outro lado, Fu et al., (2017) avaliaram os efeitos temporais do biofertilizante composto por *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 em rizosfera de banana para combater o fungo *Fusarium oxysporum*. No geral, houve uma diminuição da abundância fúngica e os microrganismos adicionados de se mantiveram estáveis durante 3 anos de experimento.

Quando adicionados no solo, os microrganismos podem atuar de maneira sinérgica, recrutando microrganismos com características semelhantes, seja através da produção de metabólitos sinalizadores, tais como vitaminas e aminoácidos ou por transferências horizontais de genes, impactando a diversidade genética da comunidade residente (Mawarda et al., 2020). Além disso, alguns microrganismos podem ser extremamente dependentes dos seus parceiros, de tal forma que uma espécie possa não atuar de maneira satisfatória na ausência de outra (Kato et al., 2012). Ansari et al. (2014), relataram um aumento na diversidade genética de rizóbios, em áreas de cultivo de soja, após inoculação massiva de cepas comerciais de *Bradyrhizobium*.

Por outro lado, a adição de microrganismos nos solos pode afetar a estrutura do microbioma produzindo efeitos antagônicos, segregando compostos químicos que matam ou inibem os microrganismos residentes. Inoculantes microbianos que atuam no controle de patógenos são exemplos de produtos com atividade antagônica. Xiong et al., (2017) avaliaram alterações na abundância bacteriana e estrutura da comunidade após aplicação de biofertilizantes, compostos por microrganismos dos gêneros *Bacillus* e *Trichoderma spp.*, no combate ao *Fusarium oxysporum*. Os autores verificaram que não houve uma inibição direta dos patógenos, mas sim, uma alteração do microbioma do solo, aumentando microrganismos com efeitos antifúngicos, como *Lysobacter spp.*

Outro mecanismo que explica a alteração provocada no microbioma é o efeito indireto, envolvendo os exsudados das raízes das plantas. Os microrganismos introduzidos no ambiente atuam promovendo o crescimento e desenvolvimento no sistema radicular das espécies vegetais, através da produção de fitohormônios e outras moléculas. Assim, com um sistema radicular mais desenvolvido, além de aumentar a produção de exsudados, pode resultar também em alteração da sua composição, alterando totalmente o microbioma (Vacheron et al., 2013; Mawarda et al., 2020). Dardaneili et al (2010), verificaram alterações nas concentrações de flavonóides nos exsudados das raízes de soja, após inoculação de *Chryseobacterium balustinum* Aur9.

Assim, se a utilização do bioinoculante resultar em uma alteração na biodiversidade dos solos, é necessário avaliar se o desempenho das espécies vegetais também será afetados. Por outro lado, os efeitos diretos nas espécies vegetais também devem ser observados, como por exemplo, a especificidade do agente inoculante, que pode variar conforme espécie vegetal.

9. CONCLUSÕES

Os biofertilizantes constituem uma ferramenta promissora e sustentável para os sistemas agrícolas, como fonte suplementar, renovável e ecologicamente correta de nutrientes.

Além de ajudar a mitigar os impactos negativos causados ao ambiente, os biofertilizantes também podem ser considerados elementos-chave na manutenção da fertilidade dos solos, da produtividade das culturas em nível suficientemente elevado e capaz de reduzir a dependência de fertilizantes químicos, indispensável para alcançar a sustentabilidade.

As mudanças na abordagem das práticas agrícolas tornam os biofertilizantes uma parte vital das práticas modernas para produção de culturas, e enfatiza a sua importância nos próximos anos. No entanto, para maior disseminação, é crucial o direcionamento de esforços para pesquisas que abordem aspectos específicos, como a seleção de microrganismos mais eficientes para diferentes culturas e condições ambientais, otimização de formulações e métodos de aplicação, a fim de garantir maior eficácia e viabilidade dos bioinoculantes em campo, bem como estudos que avaliem os efeitos em longo prazo da aplicação desses produtos no ecossistema como um todo.

Além dos investimentos em pesquisas, o desenvolvimento de políticas de incentivo também é uma etapa fundamental para impulsionar a adoção dessas novas tecnologias, visando não apenas a produtividade agrícola, mas também a segurança alimentar e a preservação ambiental em longo prazo.

10. REFERÊNCIAS

- Abdelghany AM, El-Banna AAA, Salama EAA, Ali MM, Al-Huqail AA, Ali HM, Paszt LS, El-Sorady GA, Lamtom SF (2022) The Individual and Combined Effect of Nanoparticles and Biofertilizers on Growth, Yield, and Biochemical Attributes of Peanuts (*Arachis hypogaea* L.). *Agronomy* 12, 398. <https://doi.org/10.3390/agronomy12020398>
- Aguilar-Paredes A, Valdés G, Nuti M (2020) Ecosystem Functions of Microbial Consortia in Sustainable Agriculture. *Agronomy* 10(12):1902. <https://doi.org/10.3390/agronomy10121902>
- Akhtar N, Ilyas N, Meraj TA, Pour-Aboughadareh A, Sayyed RZ, Mashwani ZR, Pocza P (2022) Improvement of Plant Responses by Nanobiofertilizer: A Step towards Sustainable Agriculture. *Nanomaterials* 12, 965. <https://doi.org/10.3390/nano12060965>
- Alori ET, Glick BR, Babalola OO (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>
- Anandham R, Janahiraman V, Gandhi PI, Kwon SW, Chung KY, Han GH, Choi JH, Sa TM (2014) Early plant growth promotion of maize by various sulfur oxidizing bacteria that uses different thiosulfate oxidation pathway. *African Journal of Microbiology Research* 8(1):19-27. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.5661>
- Angelin J, Kavitha M (2020) Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential. *International Journal of Biological Macromolecules* 162:853-865. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.190>
- Ansari PG, Rao DLN, Pal KK (2014) Diversity and phylogeny of soybean rhizobia in central India. *Annals of Microbiology* 64:1553–1565. <http://doi.gov/10.1007/s13213-013-0799-2>
- Arora NK, Mishra J (2016) Prospecting the roles of metabolites and additives in future bioformulations for sustainable agriculture. *Applied Soil Ecology* 107:405-407. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.05.020>
- Baldani JI, Baldani VLD, Seldin L, Dobereiner J (1986) Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 36(1):86–93. <https://doi.org/10.1099/00207713-36-1-86>
- Baldani VLD, Baldani JI, Olivares F, Dobereiner J (1992) Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. *Symbiosis* 13:65–73.
- Baldani JI, Baldani VL (2005) D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: Special emphasis on the brazilian experience. *Anais da*

Academia Brasileira de Ciências 77(3), 549–579. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652005000300014>

Badr MA, Shafei AM, El-Deen SHS (2006) The Dissolution of K and P-bearing Minerals by Silicate Dissolving Bacteria and Their Effect on Sorghum Growth. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences 2(1): 5-11.

Balasubramanian P, Karthickumar P (2017) Biofertilizers and biopesticides: a holistic approach for sustainable agriculture. In: Mondal, P., Dalai, A.K. (Eds.), Sustainable Utilization of Natural Resources. CRC Press 255–284. <https://doi.org/10.1201/9781315153292-9>

Balla A, Silini A, Cherif-Silini H, Chenari Bouket A, Alenezi FN, Belbahri L (2022) Recent Advances in Encapsulation Techniques of Plant Growth-Promoting Microorganisms and Their Prospects in the Sustainable Agriculture. Applied Sciences 12, 9020. <https://doi.org/10.3390/app12189020>

Basu A, Prasad P, Das SN, Kalam S, Sayyed RZ, Reddy MS, El Enshasy H (2021) Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) as Green Bioinoculants: Recent Developments, Constraints, and Prospects. Sustainability 13, 1140. <https://doi.org/10.3390/su13031140>

Behboudi-Jobbehdar S, Soukoulisa C, Yonekuraa L, Fiska I (2013) Optimization of spray-drying process conditions for the production of maximally viable microencapsulated *L. acidophilus* NCIMB 701748. Drying Technology 31(11):1274–1283. <https://doi.org/10.1080/07373937.2013.788509>

Behera B, Das TK, Raj R, Ghosh S, Raza MB, Sen S (2021) Microbial Consortia for Sustaining Productivity of Non-legume Crops: Prospects and Challenges. Agricultural Research 10:1-14. <https://doi.org/10.1007/s40003-020-00482-3>

Bender SF, Wagg C, Van der Heijden MGA (2016) An Underground Revolution: Biodiversity and Soil Ecological Engineering for Agricultural Sustainability. Trends in Ecology & Evolution 31(6):440-452. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.02.016>

Beneduzi A, Ambrosini A, Passaglia LMP (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. Genetics and Molecular Biology 35,4 (suppl), 1044-1051. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572012000600020>

Berini F, Casartelli M, Montali A, Reguzzoni M, Tettamanti G and Marinelli F (2019) Metagenome-Sourced Microbial Chitinases as Potential Insecticide Proteins. Frontiers in Microbiology 10:1358. <http://doi.gov/10.3389/fmicb.2019.01358>

Bhatt K, Maheshwari DK (2020) Zinc solubilizing bacteria (*Bacillus megaterium*) with multifarious plant growth promoting activities alleviates growth in *Capsicum annum* L. 3 Biotech 10:36. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-2033-9>

Bhattacharjee A, Dubey S, Sharma S (2023) “Next-Generation Bioformulations” for Plant Growth Promotion and Stress Mitigation: A Promising Approach

for Sustainable Agriculture. *Journal of Plant Growth Regulation* 42:6741-6759. <https://doi.org/10.1007/s00344-023-10996-z>

Bhattacharyya PN, Jha DK (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28, 1327–1350. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>

Billah M, Khan M, Bano A, Hassan TUI, Munir A, Gurmani R (2019) Phosphorus and phosphate solubilizing bacteria: Keys for sustainable agriculture. *Geomicrobiology Journal*, 36:10, 904-916. <https://doi.org/10.1080/01490451.2019.1654043>

Bradáčová K, Florea AS, Bar-Tal A, Minz D, Yermiyahu U, Shawahna R, Kraut-Cohen J, Zolti A, Erel R, Dietel K, Weinmann M, Zimmermann B, Berger N, Ludewig U, Neumann G, Posta G (2019) Microbial Consortia versus Single-Strain Inoculants: An Advantage in PGPM-Assisted Tomato Production? *Agronomy* 9(2):105. <https://doi.org/10.3390/agronomy9020105>

Campos DC, Acevedo F, Morales E, Aravena J, Amiard V, Jorquera M, Inostroza N, Rubilar M (2014) Microencapsulation by spray drying of nitrogen-fixing bacteria associated with lupin nodules. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30(9):2371–2378. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1662-8>

Cantabella D, Dolcet-Sanjuan R, Teixidó N (2022) Using plant growth-promoting microorganisms (PGPMs) to improve plant development under in vitro culture conditions. *Planta* 255, 117. <https://doi.org/10.1007/s00425-022-03897-0>

Cavello IA, Crespo JM, García SS, Zapiola JM, Luna MF, Cavalitto SF (2015) Plant Growth Promotion Activity of Keratinolytic Fungi Growing on a Recalcitrant Waste Known as “Hair Waste”. *Biotechnology Research International* 2015, 952921. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/952921>

Chaudhary T, Dixit M, Gera R, Shukla AK, Prakash A, Gupta G, Shukla P (2020) Techniques for improving formulations of bioinoculants. *3 Biotech* 10:199. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02182-9>

Che S, Men Y (2019) Synthetic microbial consortia for biosynthesis and biodegradation: promises and challenges. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 46:1343–1358. <https://doi.org/10.1007/s10295-019-02211-4>

Chi F, Shen S-H, Cheng H-P, Jing Y-X, Yanni YG, Dazzo FB (2005) Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. *Applied and Environmental Microbiology* 71(11) 7271–7278. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7271-7278.2005>

Cornell C, Kokkoris V, Richards A, Horst C, Rosa D, Bennett JA and Hart MM (2021) Do Bioinoculants Affect Resident Microbial Communities? A Meta-Analysis. *Frontiers in Agronomy* 3:753474. <http://doi.gov/10.3389/fagro.2021.753474>

Daniel AI, Fadaka AO, Gokul A, Bakare OO, Aina O, Fisher S, Burt AF, Mavumengwana V, Keyster M, Klein A (2022) Biofertilizer: The Future of Food

Security and Food Safety. *Microorganisms* 10(6), 1220.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10061220>

Dardanelli MS, Manyani H, González-Barroso S, Rodríguez-Carvajal MA, Gil-Serrano A, Espuny MR, López-Baena FJ, Bellogín RA, Megías M, Ollero FJ (2010) Effect of the presence of the plant growth promoting rhizobacterium (PGPR) *Chryseobacterium balustinum* Aur9 and salt stress in the pattern of flavonoids exuded by soybean roots. *Plant and Soil* 328:483–493.
<https://doi.org/10.1007/s11104-009-0127-6>

Das A, Kamal S, Shakil Najam A, Sherameti I, Oelmüller R, Dua M, Tuteja N, Johri AK, Varma A (2012) The root endophyte fungus *Piriformospora indica* leads to early flowering, higher biomass and altered secondary metabolites of the medicinal plant, *Coleus forskohlii*. *Plant Signaling Behavior* 7:1-10.
<https://doi.org/10.4161/psb.7.1.18472>

Devi R, Kaur T, Kour D, Yadav AN, Suman A (2022) Potential applications of mineral solubilizing rhizospheric and nitrogen fixing endophytic bacteria as microbial consortium for the growth promotion of chilli (*Capsicum annum* L.). *Biologia* 77:2933–2943. <https://doi.org/10.1007/s11756-022-01127-2>

Dixit S, APPU KKK (2015) A review: role of phosphorous solubilising and sulfur oxidizing bacteria in mine reclamation. *International Journal of Agricultural Science and Research* 5(2):33-40.

Dong Y, Gao M, Qiu W, Song Z (2021) Effect of microplastics and arsenic on nutrients and microorganisms in rice rhizosphere soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 211,111899. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.111899>

El-Ghamry AM, Mosa AA, Alshaal TA, El-Ramady HR (2018) Nanofertilizers vs. biofertilizers: new insights. *Environment Biodiversity and Soil Security* 2(1): 40-50.
<https://doi.org/10.21608/jenvbs.2018.3880.1029>

Elnahal ASM, El-Saadon MT, Saad AM, Desoky E-SM, El-Tahan AM, Rady MM, AbuQamar SF, El-Tarabily KA (2022) The use of microbial inoculants for biological control, plant growth promotion, and sustainable agriculture: A review. *European Journal of Plant Pathology* 162:759–792. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02393-7>

Estrada GA, Baldani VLD, de Oliveira DM, Urquiaga S, Baldani JI (2013) Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. *Plant and Soil* 369:115–129.
<https://doi.org/10.1007/s11104-012-1550-7>

Fasusi OA, Cruz C, Babalola OO (2021) Agricultural Sustainability: Microbial Biofertilizers in Rhizosphere Management. *Agriculture* 11(2):163.
<https://doi.org/10.3390/agriculture11020163>

Florio A, Bréforta C, Gervais J, Bérard A, Roux XL (2019) The responses of NO₂⁻ and N₂O-reducing bacteria to maize inoculation by the PGPR *Azospirillum*

lipoferum CRT1 depend on carbon availability and determine soil gross and net N₂O production. Soil Biology and Biochemistry 136, 107524. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.107524>

Fontana DC, de Paula S, Torres AG, de Souza VHM, Pascholati SF, Schmidt D, Dourado Neto D (2021) Endophytic Fungi: Biological Control and Induced Resistance to Phytopathogens and Abiotic Stresses. Pathogens 10:570. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050570>

Fu L, Penton CR, Ruan Y, Shen Z, Xue C, Li R, Shen Q (2017) Inducing the rhizosphere microbiome by biofertilizer application to suppress banana Fusarium wilt disease. Soil Biology & Biochemistry 104:39-48. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.10.008>

García-Fraile P, Menéndez E, Rivas R (2015) Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. Bioengineering 2(3):183-205. <https://doi.org/10.3934/bioeng.2015.3.183>

Garg D, Sridhar K, Stephen Inbaraj B, Chawla P, Tripathi M, Sharma M (2023) Nano-Biofertilizer Formulations for Agriculture: A Systematic Review on Recent Advances and Prospective Applications. Bioengineering 10, 1010. <https://doi.org/10.3390/bioengineering10091010>

Gill SS, Gill R, Trivedi DK, Anjum NA, Sharma KK, Ansari MW, Ansari AA, Johri AK, Prasad R, Pereira E, Varma A, Tuteja N (2016) *Piriformospora indica*: Potential and Significance in Plant Stress Tolerance. Frontiers in Microbiology 7:332. <http://doi.gov/10.3389/fmicb.2016.00332>

Gopal KS, Akhila Baby A (2016) Enhanced shelf-life of *Azospirillum* and psb through addition of chemical additives in liquid formulations. International Journal of Science, Environment and Technology 5(4): 2023 – 2029.

Gouda S, Kerry RG, Das G, Paramithiotis S, Shin HS, Patra JK (2018) Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. Microbiology Research 206:131–140. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.016>

Hafez EM, Osman HS, Gawayed SM, Okasha SA, Omara AE-D, Sami R, Abd El-Monem AM, Abd El-Razek UA (2021) Minimizing the Adversely Impacts of Water Deficit and Soil Salinity on Maize Growth and Productivity in Response to the Application of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and Silica Nanoparticles. Agronomy 11, 676. <https://doi.org/10.3390/agronomy11040676>

Hakim S, Naqqash T, Nawaz MS, Laraib I, Siddique MJ, Zia R, Mirza MS, Imran A (2021) Rhizosphere Engineering With Plant Growth-Promoting Microorganisms for Agriculture and Ecological Sustainability. Frontiers in Sustainable Food Systems 5, 617157. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.617157>

Hallama M, Pekrun C, Lambers H, Kandeler E. (2019) Hidden miners – the roles of cover crops and soil microorganisms in phosphorus cycling through agroecosystems. *Plant Soil* 434:7–45. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3810-7>

Hui F, Liu J, Gao Q, Lou B (2015) *Piriformospora indica* confers cadmium tolerance in *Nicotiana tabacum*. *Journal of Environmental Sciences* 37(1):184-191. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2015.06.005>

Itelima JU, Bang WJ, Onyimba IA, Sila MD, Egbere OJ (2018) Bio-fertilizers as key player in enhancing soil fertility and crop productivity: A Review. *Direct Research Journal of Agricultural and Food Science* 6(3):73-83. <https://doi.org/10.26765/DRJAFS.2018.4815>

Jacobs S, Zechmann B, Molitor A, Trujillo M, Petutschnig E, Lipka V, Kogel KH, Schäfer P (2011) Broad-spectrum suppression of innate immunity is required for colonization of *Arabidopsis* roots by the fungus *Piriformospora indica*. *Plant Physiology* 157(1):531. <http://doi.org/10.1104/pp.111.176446>

John RP, Tyagi RD, Brar SK, Surampalli RY, Prévost D (2011) Bio-encapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery. *Critical Reviews in Biotechnology* 31(3):211-226. <http://doi.gov/10.3109/07388551.2010.513327>

Joshi H, Somdutt, Choudhary P, Mundra SL (2019) Future prospects of nanotechnology in agriculture. *International Journal of Chemical Studies* 7(2): 957-963.

Joshi N, Gothwal R, Singh M, Dave K (2021) Novel sulphur-oxidizing bacteria consummate sulphur deficiency in oil seed crop. *Archives of Microbiology* 203:1–6. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02009-4>

Kadmiri IM, El Mernissi N, Azaroual SE, Mekhzoum MEM, Qaiss AEK, Bouhfid R (2021) Bioformulation of Microbial Fertilizer Based on Clay and Alginate Encapsulation. *Current Microbiology* 78:86-94. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02262-2>

Kalayu G (2019) Phosphate Solubilizing Microorganisms: Promising Approach as Biofertilizers. *International Journal of Agronomy* 2019: 4917256. <https://doi.org/10.1155/2019/4917256>

Kamran S, Shahid I, Baig DN, Rizwan M, Malik KA, Mehnaz S (2017) Contribution of Zinc Solubilizing Bacteria in Growth Promotion and Zinc Content of Wheat. *Frontiers in Microbiology* 8:2593. <http://doi.gov/10.3389/fmicb.2017.02593>

Kato S, Hashimoto K, Watanabe K (2012) Methanogenesis facilitated by electric syntrophy via (semi)conductive iron-oxide minerals. *Environmental Microbiology* 14(7):1646-1654. <http://doi.gov/10.1111/j.1462-2920.2011.02611.x>

Khanghahi MY, Ricciuti P, Allegretta I, Terzano R, Crecchio C (2018) Solubilization of insoluble zinc compounds by zinc solubilizing bacteria (ZSB) and optimization of their

growth conditions. *Environmental Science and Pollution Research* 25:25862–25868. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2638-2>

Khoshru B, Sarikhani MR, Reyhanitabar A, Oustan S, Malboobi MA (2023) Evaluation of the Potential of Rhizobacteria in Supplying Nutrients of Zea mays L. Plant with a Focus on Zinc. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* (2023) 23:1816–1829 <https://doi.org/10.1007/s42729-023-01139-0>

Kour D, Rana KL, Yadav AN, Yadav N, Kumar M, Kumar V, Vyas P, Dhaliwal H. S, Saxena AK (2020) Microbial biofertilizers: Bioresources and eco-friendly technologies for agricultural and environmental sustainability. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 23, 101487. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101487>

Kumar V, Sahai V, Bisaria VC (2011) High-density spore production of *Piriformospora indica*, a plant growth-promoting endophyte, by optimization of nutritional and cultural parameters. *Bioresource Technology* 102(3):3169-3175. <http://doi.gov/10.1016/j.biortech.2010.10.116>

Liu X, Mei S, Salles JF (2023) Inoculated microbial consortia perform better than single strains in living soil: A meta-analysis. *Applied Soil Ecology* 190, 105011. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2023.105011>

Lobo CB, Tomás MSJ, Viruel E, Ferrero MA, Lucca ME (2019) Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural Technologies. *Microbiological Research* 219: 12-25. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.10.012>

Lopes MJS, Dias-Filho MB, Gurgel ESC (2021) Successful Plant Growth-Promoting Microbes: Inoculation Methods and Abiotic Factors. *Frontiers in Sustainable Food System* 5:606454. <http://doi.gov/10.3389/fsufs.2021.606454>

Ma M, Jiang X, Wang Q, Guan D, Li L, Ongena M, Li J (2018) Isolation and identification of PGPR strain and its effect on soybean growth and soil bacterial community composition. *International Journal of Agriculture & Biology* 20:1289–1297. <http://doi.gov/10.17957/IJAB/15.0627>

Mahmood A, Turgay OC, Farooq M, Hayat R (2016) Seed biopriming with plant growth promoting rhizobacteria: a review. *FEMS Microbiology Ecology* 92(8), fiw112.

Mahmud AA, Upadhyay SK, Srivastava AK, Bhojiya AA (2021) Biofertilizers: A Nexus between soil fertility and crop productivity under abiotic stress. *Current Research in Environmental Sustainability* 3, 100063. <https://doi.org/10.1016/j.crsust.2021.100063>

Majeed A, Kaleem Abbasi M, Hameed S, Imran A, Rahim N (2015) Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on plant growth promotion. *Frontiers in Microbiology* 6(198):1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00198>.

Mallon CA, Le Roux X, van Doorn GS, Dini-Andreote F, Poly F, Salles JF (2018) The impact of failure: unsuccessful bacterial invasions steer the soil microbial community

away from the invader's niche. The ISME Journal 12:728–741.
<https://doi.org/10.1038/s41396-017-0003-y>

Marra R, Gutiérrez S, Woo SL, Bonanomi G, Vinale F (2022) Editorial: Designing Bio-Formulations Based on Organic Amendments, Beneficial Microbes and Their Metabolites. Frontiers in Microbiology 12:832149.
<http://doi.gov/10.3389/fmicb.2021.832149>

Martínez-Viveros O, Jorquera MA, Crowley DE, Gajardo G, Mora ML (2010) Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by Rhizobacteria. Journal of Soil Science and Plant Nutrition 10(3):293-319.
<http://doi.org/10.4067/S0718-95162010000100006>

Mawarda PC, Le Roux X, van Elsas JD, Salles JF (2020) Deliberate introduction of invisible invaders: A critical appraisal of the impact of microbial inoculants on soil microbial communities. Soil Biology and Biochemistry 148: 107874.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107874>

Meena M, Swapnil P, Divyanshu K, Kumar S, Harish, Tripathi YT, Zehra A, Marwal A, Upadhyay RS (2020) PGPR-mediated induction of systemic resistance and physiochemical alterations in plants against the pathogens: Current perspectives. Journal of Basic Microbiology 60(10):828-861.
<http://doi.gov/10.1002/jobm.202000370>

Mishra J, Arora NK (2016) Bioformulations for plant growth promotion and combating phytopathogens: a sustainable approach. In: Arora, N.K., Balestrini, R., Mehnaz, S. (Eds.), Bioformulations: For Sustainable Agriculture. Springer India 3–33.
<https://doi.org/10.1007/978-81-322-2779-3>

Moënné-Loccoz Y, Mavingui P, Combes C, Normand P, Steinberg C (2015) Microorganisms and biotic interactions. In: Bertrand JC et al (eds) Environmental microbiology: fundamentals and applications. Springer, Netherlands 395–444.
http://doi.gov/10.1007/978-94-017-9118-2_11

Naamala J, Smith DL (2020) Relevance of Plant Growth Promoting Microorganisms and Their Derived Compounds, in the Face of Climate Change. Agronomy 10, 1179.
<http://doi.gov/10.3390/agronomy10081179>

Naziya B, Murali M, Amruthesh KN (2020) Plant Growth-Promoting Fungi (PGPF) Instigate Plant Growth and Induce Disease Resistance in *Capsicum annuum* L. upon Infection with *Colletotrichum capsici* (Syd.) Butler & Bisby. Biomolecules 10(1):41.
<https://doi.org/10.3390/biom10010041>

Oldroyd GED (2013) Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. Nature Reviews 1:252-263.

Pallavi, Mehta CM, Srivastava R, Arora S, Sharma AK (2016). Impact assessment of silver nanoparticles on plant growth and soil bacterial diversity. 3 Biotech, 6(2):254.
<http://doi.gov/10.1007/s13205-016-0567-7>

Panichikkal J, Puthiyattil N, Raveendran A, Nair RA, Krishnankutty RE (2021) Application of Encapsulated *Bacillus licheniformis* Supplemented with Chitosan Nanoparticles and Rice Starch for the Control of *Sclerotium rolfsii* in *Capsicum annuum* (L.) Seedlings. *Current Microbiology* 78:911–919. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02361-8>

Patel C, Singh J, Karunakaran A, Ramakrishna W (2023) Evolution of Nano-Biofertilizer as a Green Technology for Agriculture. *Agriculture* 13, 1865. <https://doi.org/10.3390/agriculture13101865>

Pedrosa FO, Monteiro RA, Wassem R, Cruz LM, Ayub RA, Colauto NB, Fernandez MA, Fungaro MHP, Grisard EC, Hungria M, Madeira HMF, Nodari RO, Osaku CA, Petzl-Erler ML, Terenzi H, Vieira LGE, Steffens MBR, Weiss VA, Pereira LFP, Almeida MIM, Alves LR, Marin A, Araujo LM, Balsanelli E, Baura VA, Chubatsu LS, Faoro H, Favetti A, Friedermann G, Glienke C, Karp S, Kava-Cordeiro V, Raittz RT, Ramos HJO, Ribeiro EMSF, Rigo LU, Rocha SN, Schwab S, Silva AG, Souza EM, Tadra-Sfeir MZ, Torres RA, Dabul ANG, Soares MAM, Gasques LS, Gimenes CCT, Valle JS, Ciferri RR, Correa LC, Murace NK, Pamphile JA, Patussi EV, Prioli AJ, Prioli SMA, Rocha CLMSC, Arantes OMN, Furlaneto MC, Godoy LP, Oliveira CEC, Satori D, Vilas-Boas LA, Watanabe MAE, Dambros BP, Guerra MP, Mathioni SM, Santos KL, Steindel M, Vernal J, Barcellos FG, Campo RJ, Chueire LMO, Nicolás MF, Pereira-Ferrari L, da Conceição Silva JL, Gioppo NMR, Margarido VP, Menck-Soares MA, Pinto FGS, Simão RCG, Takahashi EK, Yates MG, Souza EM (2011) Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. *PLoS Genetics* 7(5):e1002064. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002064>

Pirttilä AM, Tabas HMPH, Baruah N, Koskimäki JJ (2021) Biofertilizers and Biocontrol Agents for Agriculture: How to Identify and Develop New Potent Microbial Strains and Traits. *Microorganisms* 9:817. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040817>

Radwan TE-SE-D, Mohamed ZK, Reis VM (2004) Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 39(10):987–994. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2004001000006>

Raimi A, Roopnarain A, Adeleke R (2021) Biofertilizer production in Africa: Current status, factors impeding adoption and strategies for success. *Scientific African* 11: e00694. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2021.e00694>

Ranadev P, Ashwin R, Bagyaraj DJ, Shinde AH (2023) Sulfur oxidizing bacteria in agro ecosystem and its role in plant productivity—a review. *Journal of Applied Microbiology* 134(8). <https://doi.org/10.1093/jambio/ixad161>

Raus RA, Nawawi WMFW, Nasaruddin RR (2021) Alginate and alginate composites for biomedical applications. 16(3):280-306. <https://doi.org/10.1016/j.aips.2020.10.001>

Ren X, Zhang Q, Zhang W, Mao J, Li P (2020) Control of Aflatoxigenic Molds by Antagonistic Microorganisms: Inhibitory Behaviors, Bioactive Compounds, Related

Mechanisms, and Influencing Factors. Toxins 12:24.
<http://doi.gov/10.3390/toxins12010024>

Roell GW, Zha J, Carr RR, Kofas MA, Fong SS, Tang YJ (2019) Engineering microbial consortia by division of labor. Microbial Cell Factories 18:35.
<https://doi.org/10.1186/s12934-019-1083-3>

Rojas-Sánchez B, Guzmán-Guzmán P, Morales-Cedeño LR, Orozco-Mosqueda MC, Saucedo-Martínez BC, Sánchez-Yáñez JM, Fadji AE, Babalola OO, Glick BR, Santoyo G (2022) Bioencapsulation of Microbial Inoculants: Mechanisms, Formulation Types and Application Techniques. Applied Biosciences 1:198–220.
<https://doi.org/10.3390/applbiosci1020013>

Saddique M, Ali Z, Khan A, Rana I, Shamsi I (2018) Inoculation with the endophyte *Piriformospora indica* significantly affects mechanisms involved in osmotic stress in rice. Rice 11(34). <https://doi.org/10.1186/s12284-018-0226-1>

Santoyo G, Guzmán-Guzmán P, Parra-Cota FI, Santos-Villalobos SI, Orozco-Mosqueda MC, Glick BR (2021) Plant Growth Stimulation by Microbial Consortia. Agronomy 11:219. <https://doi.org/10.3390/agronomy11020219>

Sattar A, Naveed M, Ali M, Zahir ZA, Nadeem SM, Yaseen M, Meena VS, Farooq M, Singh R, Rahman M, Meena HN (2019) Perspectives of potassium solubilizing microbes in sustainable food production system: A review. Applied Soil Ecology 133:146–159. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.09.012>

Schmidt MA, Souza EM, Baura V, Wassem R, Yates MG, Pedrosa FO, Monteiro RA (2011) Evidence for the endophytic colonization of *Phaseolus vulgaris* (common bean) roots by the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 44(3):182–185.

Schutyser AIM, Perdana J, Boom RM (2012) Single droplet drying for optimal spray drying of enzymes and probiotics. Trends in Food Science and Technology 27(2):73–82. <http://doi.gov.10.1016/j.tifs.2012.05.006>

Seenivasagan R, Babalola OO (2021) Utilization of Microbial Consortia as Biofertilizers and Biopesticides for the Production of Feasible Agricultural Product Biology 10(11). <https://doi.org/10.3390/biology10111111>

Shah AA, Aslam S, Akbar M, Ahmad A, Khan WU, Yasin NA, Ali B, Rizwan M, Ali S (2020) Combined Effect of *Bacillus Fortis* lags 223 and zinc oxide nanoparticles to alleviate cadmium phytotoxicity in *Cucumis melo*. Plant Physiology and Biochemistry 158:1–12. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.11.011>

Sheng H, Sun X, Yan Y, Yuan Q, Wang J and Shen X (2020) Metabolic Engineering of Microorganisms for the Production of Flavonoids. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology 8:589069. <http://doi.gov/10.3389/fbioe.2020.589069>

Simonin M, Richaume A, Guyonnet JP, Dubost A, Martins JM, Pommier T (2016). Titanium dioxide nanoparticles strongly impact soil microbial function by affecting archaeal nitrifiers. *Scientific Reports* 6,33643. <https://doi.org/10.1038/srep33643>

Sosnik A, Seremeta KP (2015) Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. *Advances in Colloid and Interface Science* 223:40-54. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.05.003>

Soumare A, Diedhiou AG, Thuita M, Hafidi M, Ouhdouch Y, Gopalakrishnan S, Kouisni L (2020) Exploiting Biological Nitrogen Fixation: A Route Towards a Sustainable Agriculture. *Plants* 9(8):1011. <https://doi.org/10.3390/plants9081011>

Suman A, Govindasamy V, Ramakrishnan B, Aswini K, SaiPrasad J, Sharma P, Pathak D, Annapurna K (2022) Microbial Community and Function-Based Synthetic Bioinoculants: A Perspective for Sustainable Agriculture. *Frontiers in Microbiology* 12:805498. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.805498>

Sun F, Ou Q, Wang N, Guo ZX, Ou A, Li N, Peng C (2020) Isolation and identification of potassium-solubilizing bacteria from *Mikania micrantha* rhizospheric soil and their effect on *M. micrantha* plants. *Global Ecology and Conservation* 23:e01141. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2020.e01141>

Szopa D, Mielczarek M, Skrzypczak D, Izydorczyk G, Mikula K, Chojnacka K, Witek-Krowiak A (2022) Encapsulation efficiency and survival of plant growth-promoting microorganisms in an alginate-based matrix – A systematic review and protocol for a practical approach. *Industrial Crops and Products* 181. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114846>

Tabacchioni S, Passato S, Ambrosino P, Huang L, Caldara M, Cantale C, Hett J, Del Fiore A, Fiore A, Schluter A, Sczurba A, Maestri E, Marmioli N, Neuhoof D, Nesme J, Sorensen SJ, Aprea G, Nobili C, Presenti O, Giovannetti G, Giovannetti C, Pihlanto A, Brunori A, Bevivino A (2021) Identification of Beneficial Microbial Consortia and Bioactive Compounds with Potential as Plant Biostimulants for a Sustainable Agriculture. *Microorganisms* 9(2):426. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020426>

Tewari S, Arora NK (2015) Multifunctional Exopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa* PF23 Involved in Plant Growth Stimulation, Biocontrol and Stress Amelioration in Sunflower Under Saline Conditions. *Current Microbiology* 69:484–494. <http://doi.gov/10.1007/s00284-014-0612-x>

Timofeeva A, Galyamova M, Sedykh S (2022) Prospects for Using Phosphate-Solubilizing Microorganisms as Natural Fertilizers in Agriculture. *Plants* 11(16):2119. <https://doi.org/10.3390/plants11162119>

Trivedi P, Leach JE, Tringe SG, Sa T, Singh BK (2020) Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nature Reviews Microbiology* 18:607–621. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0412-1>

Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud M-L, Touraine B, Moëgne-Loccoz Y, Daniel Muller D, Legendre L, Wisniewski-Dyé F, Prigent-Combaret C (2013) Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science* 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00356>

Vandergheynst J, Scher H, Guo HY, Schultz D (2007) Water-in-oil emulsions that improve the storage and delivery of the biolarvacide *Lagenidium giganteum*. *BioControl* 52:207–229. <https://doi.org/10.1007/s10526-006-9021-9>

Varma A, Bakshi M, Lou B, Hartmann A, Oelmueller R (2012) *Piriformospora indica*: A Novel Plant Growth-Promoting Mycorrhizal Fungus. *Agricultural Research* 1(2):117-131. <https://doi.org/10.1007/s40003-012-0019-5>

Vassilev N, Martos V, Moral LFG, Kowalska J, Tylkowski B, Malusá E (2020) Formulation of Microbial Inoculants by Encapsulation in Natural Polysaccharides: Focus on Beneficial Properties of Carrier Additives and Derivatives. *Frontiers in Plant Science* 11(270). <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00270>

Verma S, Varma A, Rexer KH, Hassel A, Kost G, Sarbhoy A, Bisen P, Britta Bütehorn B, Franken P (1998a) *Piriformospora indica*, gen. et sp. nov., a new rootcolonizing fungus. *Mycologia* 90(5):896-903. <https://doi.org/10.1080/00275514.1998.12026983>

Verma S, Varma A, Rexer KH, Hassel A, Kost G, Sarabhoy A, Bisen P, Butenhorn B, Franken P (1998b) *Piriformospora indica* Sav. *Mycologia* 90:896-903.

Veronica N, Guru T, Thatikunta R, Narender Reddy S (2015) Role of nano fertilizers in agricultural farming. *International Journal of Environmental Science and Technology* 1:1–3.

Vidyalakshmi R, Paranthaman R, Bhakayaraj R (2009) Sulphur Oxidizing Bacteria and Pulse Nutrition - A Review. *World Journal of Agricultural Sciences* 5(3): 270-278.

Wu Xiong W, Guo S, Jousset A, Zhao Q, Wu H, Li R, Kowalchuk GA, Shen Q (2017) Bio-fertilizer application induces soil suppressiveness against *Fusarium* wilt disease by reshaping the soil microbiome. *Soil Biology & Biochemistry* 114:238-247. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.07.016>

Yadav AN, Kumar R, Kumar S, Kumar V, Sugitha T, Singh B, Chauhan VS, Dhaliwal HS, Saxena AK (2017) Beneficial microbiomes: Biodiversity and potential biotechnological applications for sustainable agriculture and human health. *Journal of Applied Biology and Biotechnology* 5(6):45-57. <http://doi.org/10.7324/JABB.2017.50607>

Zacky FA, Ting ASY (2013) Investigating the bioactivity of cells and cell-free extracts of *Streptomyces griseus* towards *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense race 4. *Biological Control* 66(3):204-208. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.06.001>

Zahir Z., Shah MK, Navee, M, Akhter MJ (2010) Substrate-dependent auxin production by *Rhizobium phaseoli* improves the growth and yield of *Vigna radiata* L. under salt stress conditions. Journal of Microbiology and Biotechnology 20(9):1288–1294. <https://doi.org/10.4014/jmb.1002.02010>

Zhang H, Sun Y, Xie1 X, Kim M-S1 , Dowd SE, Pare PW (2009) A soil bacterium regulates plant acquisition of iron via deficiency-inducible mechanisms. The Plant Journal 58: 568–577. <http://doi.gov/10.1111/j.1365-313X.2009.03803.x>

Zuccaro A, Lahrmann U, Güldener U, Langen G, Pfiffi S, Biedenkopf D, Wong P, Samans B, Grimm C, Basiewicz M, Murat C, Martin F, Kogel K-H (2011) Endophytic Life Strategies Decoded by Genome and Transcriptome Analyses of the Mutualistic Root Symbiont *Piriformospora indica*. PLOS Pathogens 7(10): e1002290. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002290>

CAPÍTULO II

RESUMO

COSTA, FERNANDA SENNA FERREIRA, D.Sc, Universidade Vila Velha – ES, dezembro de 2023. **Avaliação dos efeitos do encapsulamento do fungo *Serendipita indica* nos parâmetros morfológicos e nutricionais de plantas de milho (*Zea mays* L.).** Orientador: Alessandro Coutinho Ramos.

Os inoculantes biológicos contêm microrganismos capazes de desempenhar atividades benéficas para o desenvolvimento das espécies vegetais e atualmente, são alternativas viáveis para substituição aos fertilizantes sintéticos. Assim, o objetivo desse estudo foi desenvolver uma metodologia para encapsulamento do fungo *S. indica* em matriz polimérica de alginato de cálcio e avaliar os efeitos da inoculação em plantas de milho (*Zea mays* L.). Para elaboração das esferas, foram realizados ensaios empregando concentrações iniciais de 2, 4, 6 e 8% de alginato de sódio, a fim de avaliar a características das esferas obtidas. Em seguida, os micélios fúngicos, crescidos por 15 dias em meio líquido, foram fragmentados empregando diferentes tempos (15, 30, 45, 60 e 75 segundos), e a viabilidade das suspensões foram avaliadas nos tempos, 0, 7 e 14 dias de armazenamento, a 4°C. As esferas elaboradas foram submetidas à diferentes condições de armazenamento (água ou secas em estufa, a 30°C), sob diferentes temperaturas (4 e 25°C), e a viabilidade foi acompanhada a cada 30 dias, por um período de 90 dias, por meio da avaliação dos halos de crescimento. Os inóculos foram adicionados às raízes de plântulas de milho, em vasos contendo terra vegetal:areia (2:1), onde foram realizados 3 tratamentos: plantas não inoculadas (1), plantas inoculadas com esferas de alginato de cálcio contendo micélios fragmentados de *S. indica* (2) e plantas inoculadas com 1 mL da suspensão de micélios fragmentados de *S. indica* (3). As plantas foram mantidas em casa de vegetação e ao final de 90 dias foram feitas as avaliações de altura, peso seco e fresco da parte aérea e das raízes, diâmetro do caule, taxa de colonização das raízes e conteúdo de macro e micronutrientes da parte aérea e das raízes. Em relação às esferas, os resultados indicaram que o tempo de 75 segundos para fragmentação dos micélios resultou em maior viabilidade e que as esferas elaboradas com as diferentes proporções de micélios fragmentados, com a concentração inicial de 4% de alginato de sódio,

apresentaram maior uniformidade e se mantiveram viáveis por 60 dias, quando armazenadas a 4°C. Apesar de não ter sido observada diferença significativa nos parâmetros de crescimento, as raízes apresentaram taxa de colonização fúngica superior a 70%. Maior absorção de macro e micronutrientes foi observada nas raízes do tratamento com os micélios encapsulados. Os resultados indicam que a técnica de encapsulamento é uma alternativa promissora para maior preservação do microrganismo e para melhorar a produtividade das plantas de milho.

Palavras-chave: Alginato; *Serendipita indica*; fungo endofítico; nutrição vegetal; *Zea mays* L.

ABSTRACT

COSTA, FERNANDA SENNA FERREIRA, D.Sc, University of Vila Velha – ES, december, 2023. **Evaluation of the effects of encapsulation of the fungus *Serendipita indica* on the morphological and nutritional parameters of corn plants (*Zea mays* L.).** Advisor: Alessandro Coutinho Ramos.

Biological inoculants contain microorganisms capable of performing beneficial activities for the development of plant species and are currently viable alternatives to replace synthetic fertilizers. Thus, the objective of this study was to develop a methodology for encapsulating the fungus *S. indica* in a calcium alginate polymeric matrix and evaluate the effects of inoculation on corn plants (*Zea mays* L.). To prepare the beads, tests were carried out using initial concentrations of 2, 4, 6 and 8% of sodium alginate, in order to evaluate the characteristics of the beads obtained. Then, the fungal mycelia, grown for 15 days in liquid medium, were fragmented using different times (15, 30, 45, 60 and 75 seconds), and the viability of the suspensions were evaluated at times, 0, 7 and 14 days of storage at 4°C. The manufactured beads were subjected to different storage conditions (water or dried in an oven, at 30°C), at different temperatures (4 and 25°C), and viability was monitored every 30 days, for a period of 90 days, through the assessment of growth halos. The inocula were added to the roots of corn seedlings, in pots containing soil:sand (2:1), where 3 treatments were carried out: non-inoculated plants (1), plants inoculated with calcium alginate beads containing fragmented mycelia of *S. indica* (2) and plants inoculated with 1 ml of the suspension of fragmented mycelia of *S. indica* (3). The plants were kept in a greenhouse and at the end of 90 days, height, dry and fresh weight of the aerial part and roots, stem diameter, root colonization rate and macro and micronutrient content of the aerial part and roots. In relation to the beads, the results indicated that the time of 75 seconds for fragmentation of the mycelia resulted in greater viability and that the beads made with different proportions of fragmented mycelia, with the initial concentration of 4% sodium alginate, presented greater uniformity and remained viable for 60 days when stored at 4°C. Although no significant difference was observed in growth parameters, the roots showed a fungal colonization rate greater than 70%. Greater absorption of macro and micronutrients was observed in the roots of the treatment with encapsulated mycelia. The results indicate that the encapsulation technique is a promising alternative for greater preservation of the microorganism and for improving the productivity of corn plants.

Keywords: Alginate; *Serendipita indica*; endophytic fungus; plant nutrition; *Zea mays* L.

1. INTRODUÇÃO

O rápido crescimento populacional, esperado para exceder 9,5 bilhões de pessoas até o ano de 2050, associado às mudanças climáticas e a escassez de terras cultiváveis, impulsionaram o setor agrícola a potencializarem a utilização de fertilizantes, pesticidas e herbicidas, como estratégia para aumentar o rendimento das colheitas e atender a demanda global por alimentos (Hakim et al., 2021; Krasilnikov et al., 2022).

Os fertilizantes químicos são responsáveis por fornecer macro e micronutrientes necessários para o desenvolvimento das espécies vegetais (Krasilnikov et al., 2022). No entanto, o uso excessivo e indiscriminado desses produtos pode resultar em uma série de prejuízos, como o enfraquecimento das raízes das plantas, eutrofização das águas subterrâneas e de corpos d'água, acidificação de solos, além da alta taxa de incidência de doenças (Daniel et al., 2022). Nesse sentido, alternativas mais sustentáveis devem ser adotadas, estabelecendo um equilíbrio entre o alto rendimento e maior manutenção da saúde dos solos e do meio ambiente, sendo a utilização de biofertilizantes uma forma promissora e capaz de promover uma intensificação sustentável do setor agrícola (Bhardwaj et al., 2014; Kour et al., 2020).

Ao contrário dos fertilizantes químicos, os biofertilizantes não oferecem nutrientes diretamente às plantas (Yadav et al., 2019). São compostos por microrganismos vivos ou latentes, tais como bactérias, fungos, algas e/ou protozoários e quando aplicados em sementes, superfícies de plantas ou solos, são capazes de colonizar a rizosfera e/ou o interior de espécies vegetais, além de participar de atividades bióticas no ecossistema do solo, tornando-o mais dinâmico e sustentável para o desenvolvimento de culturas (Vejan et al., 2019; Daniel et al., 2022).

Em geral, os bioinoculantes são compostos por uma ou mais cepa de microrganismo e por um agente carreador (John et al., 2011; Elnahal et al., 2022). As formas mais comumente utilizadas para a produção de inoculantes microbianos são as formulações líquidas ou sólidas, sendo que os critérios para seleção da melhor formulação dependerá do equilíbrio entre estabilidade, eficácia, viabilidade econômica, facilidade de uso, além da geração de um ambiente mais sustentável e ecológico (Lobo et al., 2019).

Muitos bioinoculantes não respondem de maneira eficaz quando adicionados em condições de campo, devido principalmente ao tipo de carreador utilizado (Vassilev et al., 2020), que deve ser capaz de preservar o microrganismo vivo e em condições viáveis durante o armazenamento e transporte, bem como manter suas propriedades funcionais após a aplicação (Jurić et al., 2019).

Levando em consideração os aspectos fisiológicos e tecnológicos, a fim de fornecer um microambiente adequado e com proteção físico-química por um longo período de tempo, a utilização de formulações sólidas baseadas em encapsulamentos está sendo estudadas atualmente (Lobo et al., 2019). Vários são os benefícios advindos da utilização desse tipo de formulação, tais como: aumento da eficácia, devido à maior área superficial; melhora na atividade sistêmica, devido ao menor tamanho da partícula e maior mobilidade; mínima toxicidade, devido à eliminação de solventes orgânicos convencionalmente utilizados em formulações (Vejan et al., 2019).

Os polímeros naturais, como alginato de sódio, têm sido alvo de pesquisas em formulações baseadas em encapsulamento, principalmente por ser altamente compatível, baixo custo, biodegradável, não tóxico e capaz de proteger os microrganismos contra estresses ambientais e liberá-los após degradação do material (Vejan et al., 2019).

Sendo assim, o objetivo desse estudo foi o desenvolvimento de uma metodologia para elaboração de um inoculante biológico, por meio do encapsulamento do fungo *Serendipita indica* em esferas de alginato de cálcio, bem como a caracterização da sua viabilidade e influência, após inoculação, sobre os parâmetros morfológicos e nutricionais de plantas de milho (*Zea mays* L.).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção do inóculo – *Serendipita indica*

Serendipita indica foi previamente obtido da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia, da Universidade de Vila Velha.

Para propagação do fungo em meio líquido, 4 discos de ágar (4 mm de diâmetro) contendo micélios retirados da borda de colônias ativas, foram adicionados em frascos erlenmeyer contendo 125 mL de meio Kaefer modificado, composto por: glicose (20 g L⁻¹), peptona (2 g L⁻¹), extrato de levedura (1 g L⁻¹), 50 mL L⁻¹ de solução de micronutrientes (NaNO₃ (12 g L⁻¹), KCl (10,4 g L⁻¹), MgSO₄·7H₂O (10,4 g L⁻¹) e KH₂PO₄ (30,4 g L⁻¹), 10 mL L⁻¹ de solução de micronutrientes (ZnSO₄·7H₂O (2,2 g L⁻¹), MnCl₂·4H₂O (0,5 g L⁻¹), H₃BO₃ (1,1 g L⁻¹), CoCl₂·5H₂O (0,16 g L⁻¹), CuSO₄·5H₂O (0,16 g L⁻¹), (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O (0,11 g L⁻¹), Fe-EDTA (1 mL L⁻¹), solução de vitamina (1 mL L⁻¹) (Hill e Kafer, 2001).

O pH do meio foi previamente ajustado para 6,5, antes da esterilização a 121 °C durante 20 minutos. O fungo foi incubado a 28 ± 2 °C, 100 rpm, por 15 dias.

2.2. Determinação do tempo de fragmentação dos micélios e ensaios de viabilidade

Para determinar o tempo de fragmentação dos micélios produzidos em meio líquido, 5 diferentes tempos foram testados: 15, 30, 45, 60 e 75 segundos.

Os micélios foram retirados dos meios de cultura e as suspensões foram preparadas pela fragmentação com água destilada estéril, utilizando liquidificador.

Para realização dos testes de viabilidade, 1 mL da solução de micélios fragmentados foram adicionados periodicamente (0, 7 e 14 dias de armazenamento) em placas de Petri, contendo meio sólido Kaefer modificado (Hill e Kafer, 2001), mantidas por 7 dias à 28 °C. As suspensões foram consideradas viáveis quando, após o período de incubação, foi observado o crescimento de hifas (Rossi et al., 2017). A solução foi mantida em temperatura de refrigeração (4 °C) durante todo o tempo de realização das análises.

2.3. Avaliação da concentração de alginato de sódio para elaboração das esferas

A fim de avaliar a melhor concentração de alginato de sódio ($\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_6$), que seria capaz de produzir esferas de formatos e tamanhos uniformes, ensaios preliminares empregando as concentrações iniciais de 2, 4, 6 e 8 % (m/v) do polímero foram realizados.

As soluções de alginato de sódio foram previamente autoclavadas a 121 °C, por 20 minutos. Para cada concentração testada, volumes equivalentes de água destilada foram adicionados. A solução foi gotejada, com auxílio de bomba peristáltica (MS Tecnopon), a uma velocidade de 8 mL/minuto, em solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) 0,7 M (m/v), na proporção 8:10. As esferas foram mantidas por 40 minutos, sob agitação constante, para completa polimerização das esferas (Rodrigues et al., 1999).

Ao final, as esferas foram lavadas e acondicionadas em placas de Petri para avaliação da uniformidade do formato e tamanhos.

2.4. Determinação da massa de micélios de *S. indica* para encapsulamento com alginato de cálcio e ensaios de viabilidade

Para determinar a massa de micélios necessária para elaboração de esferas com maior viabilidade, diferentes proporções de micélios foram testadas (4, 6, 8 e 10 g de micélios/100 mL de água). O inóculo e as suspensões de micélios fragmentados foram obtidos conforme metodologia descrita nos itens 2.1 e 2.2, respectivamente.

A cada solução de micélios fragmentados, foi adicionada uma solução de alginato de sódio ($\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_6$) a 4% (m/v), na proporção 1:1. A mistura foi gotejada, com auxílio de bomba peristáltica (MS Tecnopon), a uma velocidade de 8 mL/minuto, em solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) 0,7 M (m/v), na proporção 8:10. As esferas foram mantidas por 40 minutos, sob agitação constante, para completa polimerização (Rodrigues et al., 1999). Ao final, as esferas foram lavadas, sendo parte delas submetida à secagem em estufa (35 °C, por 24 horas) (Schoebitz et al., 2013) e outra parte armazenada em água destilada estéril (Rossi et al., 2017).

As esferas (secas e úmidas) foram armazenadas em temperatura ambiente (25 °C) e em temperatura de refrigeração (4 °C), e testes de viabilidade foram realizados com a adição das esferas em placas de Petri, contendo meio Kaefer modificado (Hill e Kafer, 2001), a cada 30 dias, por um período de 90 dias. Os ensaios foram realizados em triplicata e as placas foram inspecionadas diariamente. Após sete dias de incubação a 28 °C foi feita a avaliação da viabilidade das esferas através da medição dos diâmetros dos halos de crescimento.

2.5. Material vegetal e inoculação das esferas em plantas de milho

Foram utilizadas sementes de milho (*Zea mays* L.) obtidas da empresa Caiçara Comércio de Semente LTDA, previamente desinfestadas em álcool etílico 70% por 3 minutos, seguida de hipoclorito de sódio 2% por 5 minutos e embebidas em água destilada estéril por 20 minutos (Paixão et al., 2018).

As sementes foram germinadas em bandejas contendo terra vegetal: areia (2:1 v/v), previamente autoclavados a 121 °C durante 60 minutos, por duas vezes, com intervalo de 24 horas entre elas, e mantidas em estantes de germinação com fotoperíodo de luz de 16 horas (intensidade de luz de 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), escuridão de 8 horas, umidade de 80% e temperatura de 25 °C.

Após sete dias, as plântulas foram transplantadas para vasos com capacidade de 2 L, contendo o mesmo substrato. A inoculação das esferas foi realizada no transplântio, em que 11 esferas, correspondente a 1 mL do fungo fragmentado, foram adicionadas a 3 cm abaixo da superfície do vaso, em contato direto com as raízes.

As plantas foram mantidas em casa de vegetação, por 90 dias, e foram irrigadas 3 vezes na semana, com água destilada e solução de Clark modificada (1/4 força), pH 5,5-5,6 (Clark, 1997).

2.6. Análises dos parâmetros de crescimento vegetal

Ao final dos 90 dias após a inoculação, as plantas foram avaliadas em relação à altura (cm), diâmetro do caule (cm), peso fresco e seco (g) da parte aérea e das raízes.

As plantas foram retiradas dos vasos e as raízes lavadas com água corrente para remoção do substrato. A parte aérea e as raízes foram separadas e pesadas, para determinação do peso fresco. Em seguida, foram acondicionados em sacos de papel e submetidos à secagem em estufa, com circulação forçada de ar a 60 °C, até peso constante.

2.7. Determinação da taxa de colonização fúngica

A taxa de colonização fúngica foi determinada de acordo com Phillips e Hayman (1970), com modificações. As raízes foram submetidas a sucessivas lavagens em solução de KOH 10% (m/v), a 60 °C. Em seguida, foram adicionadas à solução de HCl 1% (v/v), por 10 minutos a 60 °C, para completo clareamento.

As raízes foram coradas com azul de tripano 0,02% (m/v), por 25 minutos. Vinte seguimentos, com aproximadamente 1 cm de comprimento, foram escolhidos aleatoriamente e examinadas utilizando microscópio óptico (Zeiss, AIXO). A porcentagem de colonização foi determinada pela seguinte equação:

$$\text{Colonização da raiz (\%)} = [(\text{número de segmentos colonizados/número total de segmentos examinados})/100]$$

2.8. Determinação do conteúdo de macro e micronutriente

Para a determinação dos teores de N, o material vegetal foi submetido à digestão sulfúrica, com determinação titulométrica (Jackson, 1965). Os demais nutrientes (P, K, Ca, Mg, S, Zn, Fe, Cu, Mn e B) foram quantificados por ICP-OES, após digestão com HNO₃ concentrado e H₂O₂ em sistema de digestão aberta, sob as condições: gás plasma 8,0 L.min⁻¹, taxa de fluxo de gás auxiliar 0,70 L.min⁻¹ e taxa de fluxo de gás carreador 0,55 L.min⁻¹ (Peters, 2005).

2.9. Delineamento experimental e análise estatística

Os dados obtidos nos ensaios de viabilidade das esferas foram analisados estatisticamente por two-way ANOVA, sendo a diferença entre os tratamentos

verificada através do teste de Tukey a $p \leq 0.05$, utilizando-se o programa GraphPad Prism 8.0.

Para a montagem do experimento em casa de vegetação, foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), constando de três tratamentos: (1) plantas não inoculadas, (2) plantas inoculadas com micélios fragmentados de *S. indica*, (3) plantas inoculadas com micélios fragmentados de *S. indica* encapsulados em alginato de cálcio, com cinco repetições cada tratamento ($n=15$). Os dados relacionados aos parâmetros morfológicos e nutricionais das plantas de milho foram analisados estatisticamente por one-way ANOVA, sendo a diferença entre os tratamentos verificada através do teste de Tukey a $p \leq 0.05$, utilizando-se o programa GraphPad Prism 8.0.

3. RESULTADOS

3.1. Determinação do tempo de fragmentação

Na Figura 1 estão apresentados os resultados dos testes de fragmentação e viabilidade dos micélios do fungo *S. indica*, empregando os tempos de 15, 30, 45, 60 e 75 segundos, durante 14 dias de armazenamento. Como se pode observar, o maior tempo utilizado (75 segundos) proporcionou maior viabilidade quando comparado com os demais (15, 30, 45 e 60 segundos), mesmo após 14 dias de armazenamento, apresentando um crescimento mais denso e uniforme.

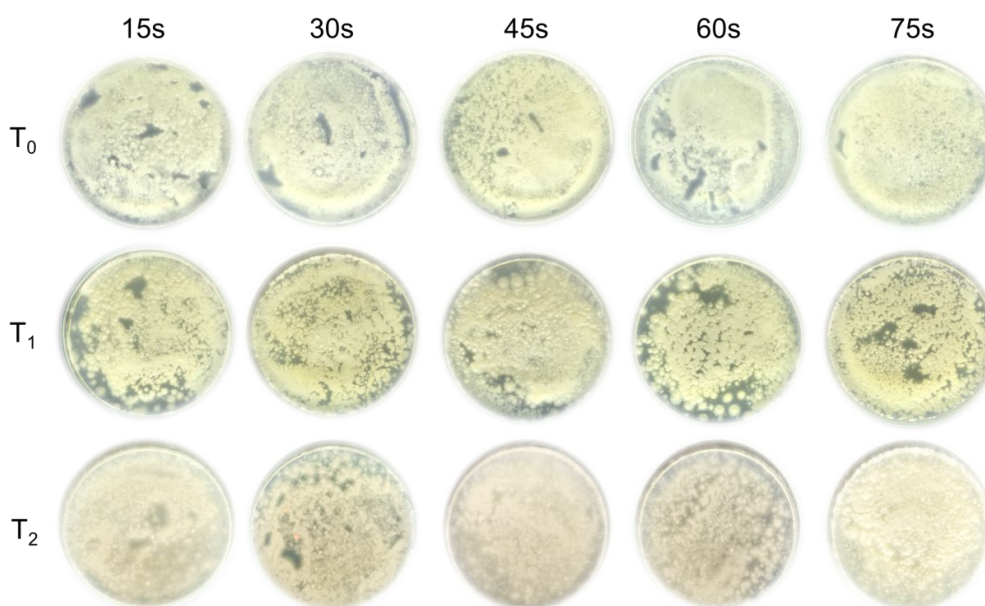


Figura 1. Crescimento do fungo *Serendipita indica* após fragmentação do micélio em diferentes tempos. Tempos de fragmentação: 15, 30, 45, 60 e 75 segundos. T₀ = 0 dias de armazenamento, T₁ = 7 dias de armazenamento e T₂ = 14 dias de armazenamento.

3.2. Teste de concentração do alginato de sódio

Na Figura 2 estão apresentados os resultados das esferas elaboradas com diferentes concentrações de alginato de sódio. A estrutura das esferas elaboradas com concentração inicial de 2% diferiu das demais, não apresentando uniformidade de tamanho e formato. No entanto, quando maiores concentrações foram utilizadas, maior uniformidade e maior resistência mecânica foram observadas.

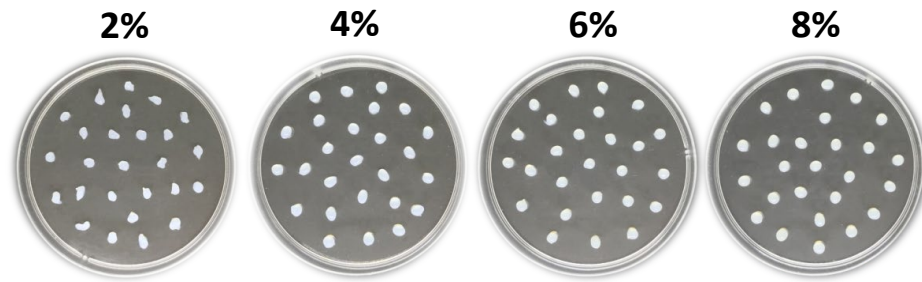
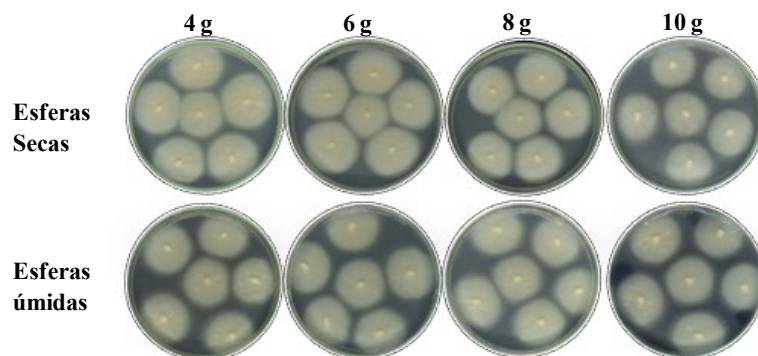


Figura 2. Esferas de alginato de cálcio preparadas com quatro diferentes concentrações iniciais de alginato de sódio (2, 4, 6 e 8%).

3.3. Ensaios de viabilidade com diferentes proporções de micélios

Como pode ser observado na Figura 3A, tanto as esferas úmidas quanto as esferas secas germinaram, para todas as proporções de micélios utilizados, apresentando viabilidade de 100% logo após o encapsulamento. Na Figura 3B estão representadas as médias dos diâmetros dos halos de crescimento dos micélios encapsulados. Observa-se que há diferença significativa, ao nível de 5%, entre as médias dos diâmetros dos halos de crescimento das esferas úmidas e secas, sendo as esferas secas responsáveis por maiores médias.



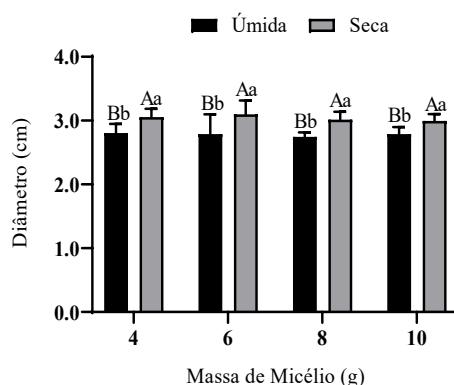


Figura 3. (A) Visão geral do crescimento *in vitro* dos micélios encapsulados. (B) Médias dos diâmetros dos halos dos micélios (4, 6, 8 ou 10 g) do fungo *S. indica* crescidos por 7 dias, após 24h do encapsulamento em esferas de alginato de cálcio (2%), armazenadas em via úmida ou seca. Os dados foram analisados por two-way ANOVA combinado com o teste de Tukey. Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$) entre os diâmetros dos halos das esferas elaboradas com diferentes proporções de micélios (4, 6, 8 ou 10 g/100 mL), armazenadas em via seca ou úmida; letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) entre os diâmetros dos halos conforme condição de armazenamento das esferas (úmidas e secas).

A partir dos 30 dias de armazenamento, avaliou-se também a influência da temperatura de armazenamento na viabilidade das esferas, onde foram empregadas as temperaturas de 25 °C e 4 °C. Como observado (Figura 4), as esferas úmidas (A) e secas (B) se mantiveram viáveis em ambas as temperaturas de armazenamento.

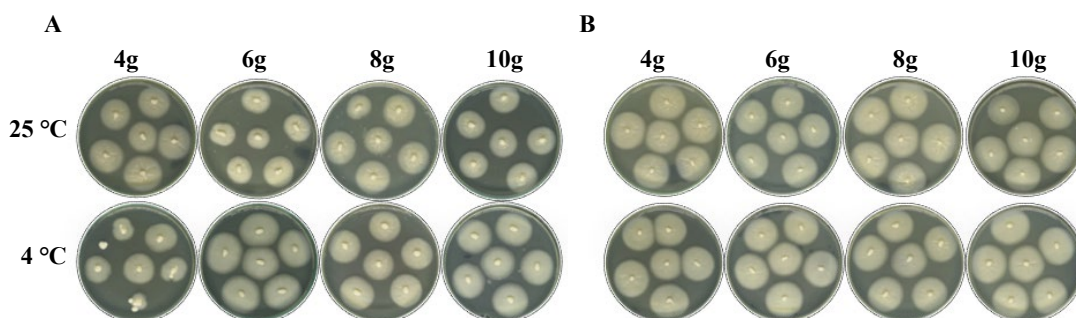


Figura 4. Visão geral do crescimento *in vitro* dos micélios (4, 6, 8 ou 10 g) do fungo *S. indica* crescidos por 7 dias, após 30 dias do encapsulamento em esferas de alginato de cálcio (2%), armazenadas em (A) via úmida ou (B) via seca, a 25 °C ou 4 °C.

Os gráficos, representados pela Figura 5, retraram as médias dos diâmetros dos halos de crescimento dos micélios, empregando diferentes proporções de massas (4, 6, 8 e 10 g/100 mL), armazenadas em (A) via úmida ou (B) via seca, a 25 °C ou 4 °C.

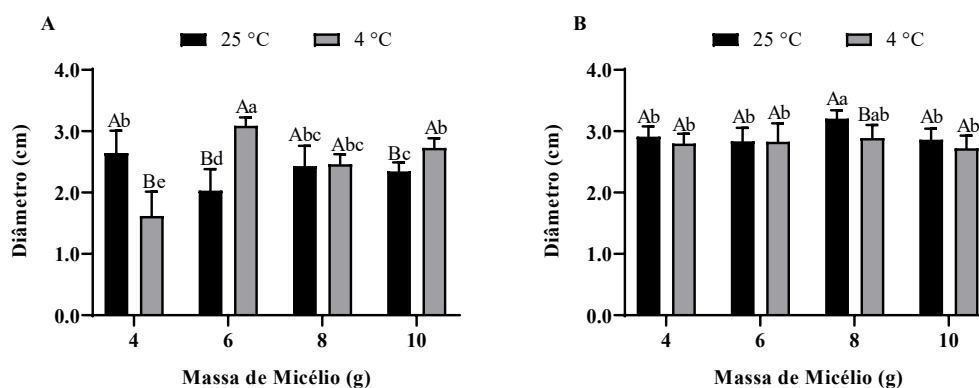


Figura 5: Médias dos diâmetros dos halos dos micélios (4, 6, 8 ou 10 g) do fungo *S. indica* crescidos por 7 dias, após 30 dias do encapsulamento em esferas de alginato de cálcio (2%), armazenadas em (A) via úmida ou (B) via seca, a 25 °C ou 4 °C. Os dados foram analisados por two-way ANOVA combinado com o teste de Tukey. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa, pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$), entre os diâmetros dos halos das esferas elaboradas com diferentes proporções de micélios (4, 6, 8 ou 10 g/100 mL), armazenados a 25 °C ou 4 °C; letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$), entre os diâmetros dos halos para as diferentes proporções de micélios e temperatura de armazenamento (4 °C e 25 °C).

Em relação às esferas úmidas (Figura 5A), pode-se notar uma diferença significativa entre as médias dos diâmetros dos halos de crescimento das esferas elaboradas com as diferentes proporções de micélios, sendo as esferas elaboradas com as proporções de 4 e 8 g/100 mL, armazenadas a 25 °C e as esferas elaboradas com as proporções de 6, 8 e 10 g/100 mL, armazenadas a 4 °C responsáveis pelas maiores médias. No geral, as esferas elaboradas com a proporção de 6 g/100 mL, armazenada a 4 °C apresentaram maior diâmetro quando comparadas às demais. Já para as esferas secas, observa-se uma diferença significativa apenas entre as esferas armazenadas a 4 °C, sendo a proporção de 8 g/100 mL, responsável por menor média de crescimento.

Na Figura 6, estão apresentados os resultados do crescimento das esferas úmidas e secas, após 60 dias de armazenamento, armazenadas nas temperaturas de 4 °C e 25 °C. Como pode ser observado, houve uma redução nos diâmetros dos

halos, e somente as esferas armazenadas à temperatura de 4 °C se mantiveram viáveis.

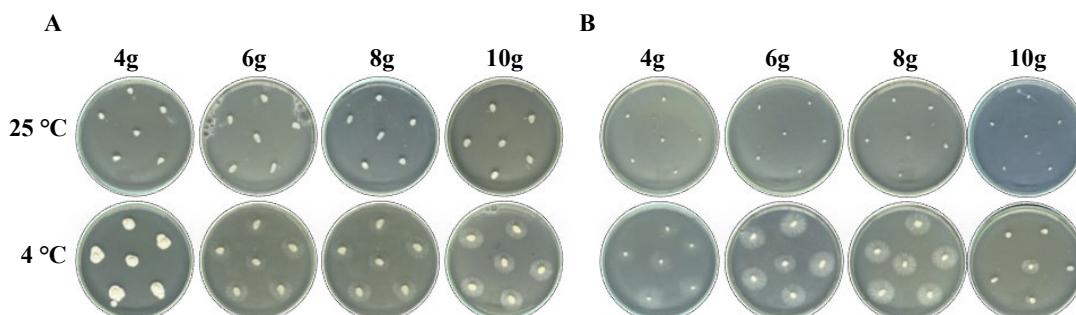


Figura 6. Visão geral do crescimento *in vitro* dos micélios (4, 6, 8 ou 10 g) do fungo *Serendipita indica* crescidos por 7 dias, após 60 dias do encapsulamento em esferas de alginato de cálcio (2%), armazenadas em (A) via úmida ou (B) via seca, a 25 °C ou 4 °C.

Quando foram avaliadas as medidas dos halos de crescimento das esferas armazenadas a 4 °C, nota-se que não houve crescimento dos micélios das esferas úmidas, elaboradas com 4 g/100 mL. Foi observada uma diferença significativa na média de crescimento das esferas armazenadas em via seca, sendo proporção de 10g/ 100 mL responsável por menor média, diferindo das demais.

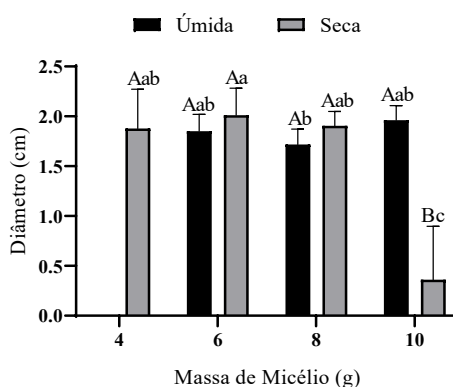


Figura 7: Médias do diâmetro do micélio (4, 6, 8 ou 10 g) do fungo *Serendipita indica* crescidos por 7 dias, após 60 dias do encapsulamento em esferas de alginato de cálcio (2%), armazenadas em via úmida ou via seca, a 4 °C. Os dados foram analisados por two-way ANOVA combinado com o teste de Tukey. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa, pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$), entre os diâmetros dos halos das esferas elaboradas com diferentes proporções de micélios (4, 6, 8 ou 10 g/100 mL), armazenadas a 4 °C; letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$), entre os diâmetros dos halos para as diferentes proporções de micélios e condição de armazenamento (via úmida ou via seca).

Ao final de 90 dias de armazenamento a 4 °C, pode-se notar que não houve crescimento dos micélios encapsulados nas esferas de alginato de cálcio, em ambos os tratamentos, após período de incubação por 7 dias á temperatura de 28 °C (Figura 8).

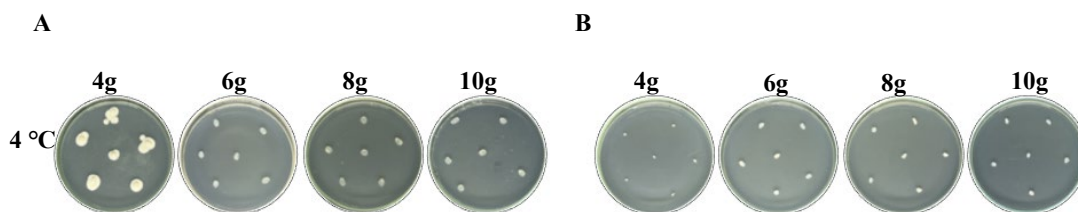


Figura 8. Visão geral do crescimento *in vitro* dos micélios (4, 6, 8 ou 10 g) do fungo *S. indica* crescidos por 7 dias, após 90 dias do encapsulamento em esferas de alginato de cálcio (2%), armazenadas em (A) via úmida ou (B) via seca, a 4 °C.

3.4. Análise dos parâmetros de crescimento vegetal

Na Figura 9 estão apresentadas as médias da altura e diâmetro do caule das plantas de milho, para os diferentes tratamentos aplicados. Observa-se que não houve diferença significativa em relação à altura, ao nível de 5%, entre os tratamentos controle e *S. indica*, apresentando uma altura aproximada de 130 cm. O tratamento que recebeu o fungo encapsulado apresentou menor altura, de aproximadamente 116 cm. Não foi observada diferença significativa entre os tratamentos quando avaliados os diâmetros dos caules.

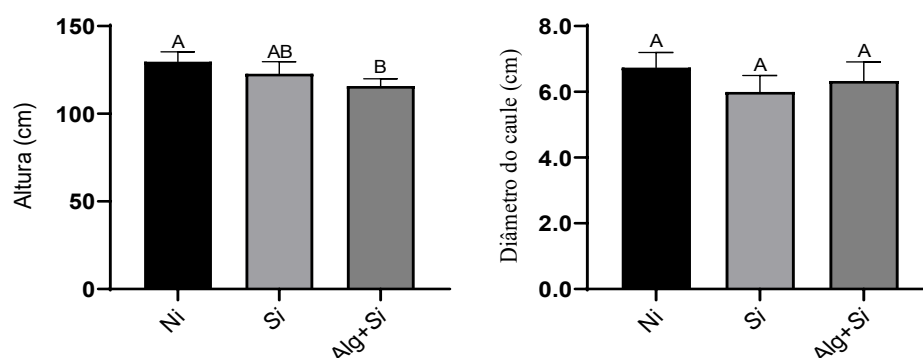
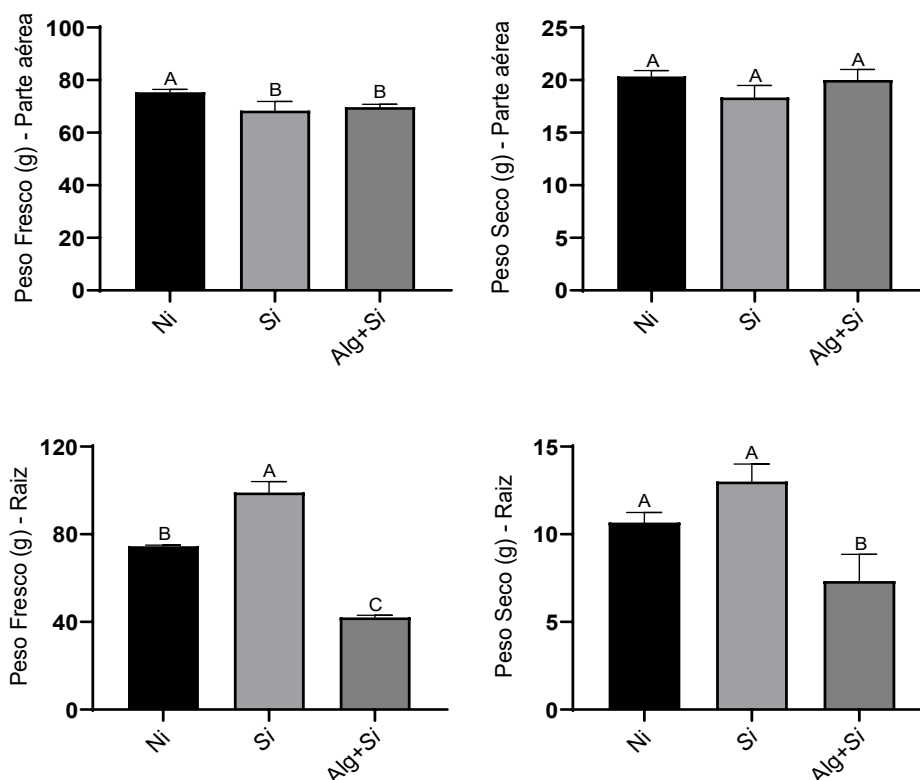


Figura 9: Altura (cm) e diâmetro do caule (cm) das plantas de milho não inoculadas (Ni), inoculadas com micélios fragmentados de *S. indica* (Si) e inoculadas com *S. indica* encapsulado em alginato de cálcio 2% (Alg+Si). Os dados foram analisados por one-way ANOVA combinado com o teste de Tukey. Letras diferentes entre os tratamentos indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os resultados das avaliações dos pesos, seco e fresco, da parte aérea e das raízes, e volume de raiz estão apresentados nas Figuras 10. Em relação ao peso fresco da parte aérea, observa-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos que receberam o fungo, ambos apresentando massas de aproximadamente 69 g. Já para o peso seco, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos.

Para as raízes, foi observada uma diferença significativa em relação ao peso fresco, sendo o tratamento com os micélios fragmentados do fungo *S. indica* responsável por maior massa, de aproximadamente 99 g. Menor massa foi obtida para tratamento que recebeu o fungo encapsulado em esferas de alginato. Resultado semelhante foi obtido em relação ao peso seco, onde as raízes das plantas que receberam o fungo encapsulado em esferas de alginato apresentaram menor massa, de aproximadamente 7 g, diferindo dos demais tratamentos. Não foi observada diferença significativa entre as massas das raízes dos tratamentos não-inoculado e inoculado com micélios fragmentados de *S. indica*.

Em relação ao volume de raiz, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos.



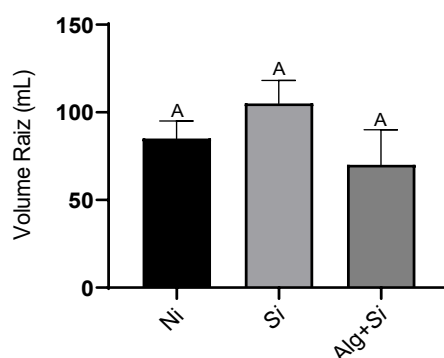


Figura 10: Peso fresco e seco (g) da parte aérea e das raízes e volume de raiz (mL) das plantas de milho não inoculadas (Ni), inoculadas com micélios fragmentados de *S. indica* (Si) e inoculadas com *S. indica* encapsulado em alginato de cálcio 2% (Alg+Si). Os dados foram analisados por one-way ANOVA combinado com o teste de Tukey. Letras diferentes entre os tratamentos indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.5. Determinação da taxa de colonização fúngica

Após 90 dias de inoculação de *S. indica*, foi avaliada a colonização das raízes das plantas de milho pelo método de coloração de azul de tripano e visualizadas em microscópio (Figura 11). Os resultados mostraram que 70% dos segmentos das raízes inoculadas com o fungo fragmentado e 85% das raízes inoculadas com o fungo encapsulado foram colonizadas por *S. indica*.

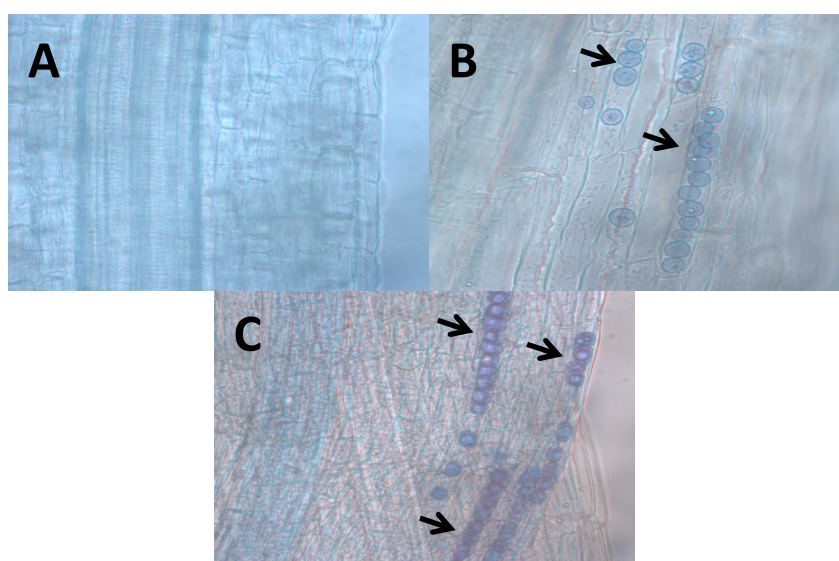


Figura 11. Micrografias representativas da colonização fúngica nas raízes de milho não-inoculadas (A), inoculadas com *S. indica* fragmentado (B) e inoculadas com *S. indica* encapsulado em alginato de cálcio (C). Setas apontam para os clamidósporos.

3.6. Conteúdo de macro e micronutrientes

Os conteúdos de nutrientes observados na parte aérea estão apresentados na Tabela 1. No geral, a inoculação fúngica não foi capaz de proporcionar um aumento no conteúdo de nutrientes na parte aérea das plantas de milho.

Em relação aos macronutrientes, nota-se que maiores conteúdos de N e K foram obtidos no tratamento não-inoculado e que não houve diferença significativa entre os conteúdos de P, S entre os tratamentos. Menores conteúdo de Ca, Mg e Carbono orgânico foram observados no tratamento com os micélios fragmentados de *S. indica*, sendo que não foram observadas diferenças significativas entre o tratamento controle e do fungo encapsulado.

Para os micronutrientes, menores conteúdos foram observados no tratamento que recebeu o fungo fragmentado, exceto para o conteúdo de Zn, que não diferiu entre os tratamentos. Os demais micronutrientes (Cu, B, Fe e Mn) não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos controle e o com o fungo encapsulado.

Tabela 1. Conteúdo de nutrientes da parte aérea das plantas de milho

Nutrientes		Tratamentos		
		Controle	<i>S. indica</i>	Alginato + <i>S. indica</i>
		<i>g kg⁻¹</i>		
<i>Macronutrientes</i>	N	116.00 A	89.83 C	100.80 B
	P	29.69 A	28.84 A	30.86 A
	K	235.10 A	160.42 C	187.50 B
	Ca	78.99 A	56.47 B	88.20 A
	Mg	75.61 A	63.02 B	75.83 A
	S	20.01 A	19.24 A	21.43 A
	Carbono	8125.88 A	7041.83 B	7837.33 A
		<i>mg kg⁻¹</i>		
<i>Micronutrientes</i>	Cu	30.5 A	18.42 B	35.00 A
	Zn	416.83 A	435.42 A	390.00 A
	B	346.55 A	307.98 B	355.53 A
	Fe	3329.58 A	2493.33 B	3475.00 A
	Mn	2353.58 AB	2112.92 B	2596.67 A

Os dados foram analisados por one-way ANOVA combinado com o teste de Tukey. Letras diferentes entre os tratamentos indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os conteúdos de nutrientes das raízes estão apresentados na Tabela 2. A inoculação com o fungo encapsulado proporcionou um aumento nos conteúdos de Ca, Mg, Carbono orgânico e Zn, quando comparado aos demais tratamentos. Maiores conteúdos de S e Fe foram obtidos no tratamento com os micélios fragmentados.

A inoculação fúngica, tanto na forma de micélios fragmentados, quanto na forma encapsulada, não foi capaz de promover um aumento no conteúdo dos demais nutrientes, uma vez que os resultados obtidos são estatisticamente iguais e/ou menores que o tratamento controle.

Tabela 2. Conteúdo de nutrientes das raízes das plantas de milho

Nutrientes		Tratamentos		
		Controle	<i>S. indica</i>	Alginate + <i>S. indica</i>
<i>g kg⁻¹</i>				
<i>Macronutrientes</i>	N	48.46 A	45.96 AB	40.90 B
	P	9.28 A	9.59 A	8.15 B
	K	31.00 A	23.56 B	16.50 C
	Ca	14.11 B	11.83 B	30.54 A
	Mg	9.69 B	10.56 B	12.98 A
	S	9.94 B	12.51 A	9.25 B
	Carbono	1142.35 B	1324.05 AB	2027.30 A
<i>mg kg⁻¹</i>				
<i>Micronutrientes</i>	Cu	23.25 A	29.25 A	27.50 A
	Zn	178.25 B	195.00 B	273.17 A
	B	194.11 A	212.03 A	119.61 B
	Fe	16126.90 B	25376.00 A	4946.33 C
	Mn	1446.67 A	1108.25 B	1486.83 A

Os dados foram analisados por one-way ANOVA combinado com o teste de Tukey. Letras diferentes entre os tratamentos indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

A utilização de microrganismos promotores de crescimento vegetal pode melhorar a absorção de nutrientes e água pelas plantas e afetar positivamente o rendimento das culturas. Nesse sentido, o fungo endofítico *Serendipita indica* é amplamente utilizado, principalmente por ser de fácil cultivo e por colonizar raízes de diferentes espécies vegetais (Varma et al., 2012).

Para elaboração de uma metodologia efetiva para inoculação do microrganismo, e obtenção de esferas com maior viabilidade, ensaios preliminares empregando diferentes tempos para fragmentação dos micélios, concentração de alginato de sódio, proporção de massa de micélios, tratamentos e condições de armazenamentos foram avaliados.

A determinação do tempo de fragmentação é uma etapa fundamental para encapsulamento do microrganismo, uma vez que pode variar conforme a espécie utilizada, sua resistência à fragmentação e o tipo de equipamento (Rossi et al., 2017). Apesar de ser uma etapa necessária, especialmente para fungos que possuem o crescimento filamentosos, a fragmentação pode resultar em perda da viabilidade ao longo do tempo de armazenamento, uma vez que as células se rompem e liberam constituintes, como compostos fenólicos, lipídios, proteínas de membranas e enzimas intracelulares que se acumulam no meio criando ambiente tóxico na suspensão, que geralmente se acentua ao longo do tempo (Iwase, 1992).

A princípio, acreditava-se que menor tempo de fragmentação proporcionaria maior viabilidade, uma vez que haveria maior preservação da estrutura fúngica. No entanto, após realização dos ensaios, foi possível observar que o maior tempo utilizado (75 segundos) apresentou um crescimento mais denso e uniforme, mesmo após 14 dias de armazenamento. Rossi et al. (2017) avaliaram diferentes tempos para fragmentação de fungos ectomicorrízicos para encapsulamento em esferas de alginato de cálcio, e constataram um aumento na viabilidade quando o tempo de fragmentação foi aumentado de 10 segundos para 60 segundos.

A principal vantagem do maior tempo de fragmentação dos micélios é a obtenção de propágulos fúngicos menores, que além de evitar possíveis obstruções nos equipamentos utilizados, terá uma melhor distribuição nas esferas formadas.

Quando adicionados ao meio ambiente, os microrganismos precisam de condições apropriadas para garantir sua sobrevivência, e a competição com

microrganismos nativos e as condições ambientais desfavoráveis, podem afetar negativamente seu desenvolvimento (Perez et al., 2018). Nesse sentido, a utilização de agentes carreadores, é uma alternativa para minimizar esses impactos e fornecer ao microrganismo um ambiente adequado por um longo período de tempo (Lobo et al., 2019).

O alginato de sódio é um polímero natural, amplamente utilizado na indústria agrícola, formado por cadeias lineares de ácidos α -L-glucurônico e β -D-manurônico, cujo grau de polimerização está relacionado ao peso molecular médio correspondente às unidades dos ácidos em sua estrutura (Szopa et al., 2022).

As propriedades físicas das esferas de alginato (resistência, uniformidade de tamanho e forma), obtidas após a etapa de polimerização com cloreto de cálcio (CaCl_2), são fortemente influenciados pelo grau de polimerização das moléculas e pelo processo de esterilização, sendo no geral, compostos com elevado grau de polimerização, mais instáveis (Daigle e Cotty, 1997). Além disso, o grau em que as moléculas podem ser afetadas é diretamente dependente da concentração de alginato de sódio utilizada na solução (Leo et al., 1990).

Sendo assim, após avaliação das propriedades físicas das esferas formadas com as diferentes concentrações de alginato de cálcio, após processo de esterilização, optou-se por utilizar a concentração inicial de 4%, que resultou em esferas uniformes em tamanho e formato, semelhantes às maiores concentrações testadas.

A viabilidade das esferas, elaboradas com as diferentes proporções de massa de micélios fragmentados, submetidas à secagem e armazenamento em água, e mantidas sob temperaturas de 4 e 25 °C, foi acompanhada durante 90 dias. Ao final desse período, foi possível assegurar uma viabilidade de aproximadamente 60 dias, para todas as proporções avaliadas, sendo necessário o armazenamento à temperatura de 4 °C. No entanto, à medida que aumenta o tempo de armazenamento, alguns fungos podem demorar um pouco mais para iniciar a germinação dos micélios para fora dos grânulos, sendo necessário um maior tempo de armazenamento para avaliação da viabilidade (Rossi et al., 2017). Acredita-se que, após 90 dias, seja necessário um aumento no tempo de armazenamento das esferas a 28 °C para avaliação da viabilidade, pois resultados preliminares (dados

não mostrados) sugerem que após esse período os micélios ainda se mantêm viáveis.

Embora os parâmetros de crescimento não tiverem sido afetados com a inoculação do fungo *S. indica*, não foram observadas respostas negativas, uma vez que fungos, especialmente os micorrízicos e endofíticos, podem competir por nutrientes com seus hospedeiros (Hallasgo et al., 2020), e em condições onde não há escassez, não são capazes de influenciar negativamente esses parâmetros.

A maior taxa de colonização, obtida nas raízes das plantas inoculadas com as esferas de alginato, confirma a eficiência da proteção conferida pela matriz polimérica, que é capaz de fornecer uma barreira temporária ao microrganismo, aumentando sua viabilidade. Assim, a degradação mais lenta do material resulta em uma liberação controlada dos propágulos fúngicos próximo ao sistema radicular, facilitando o processo de colonização (Szopa et al., 2022).

Os microrganismos presentes nos solos são responsáveis por melhorar a disponibilidade das fontes de nitrogênio para as plantas, atuando tanto na imobilização e mineralização do N orgânico, quanto na nitrificação ou desnitrificação do N inorgânico (Grzyb et al., 2020). Uma vez que o fungo também precisa de N para seu crescimento e sobrevivência (Lonardo et al., 2020), os resultados desse estudo sugerem que o tratamento com os micélios fragmentados exerceu influência negativa na absorção do N pelas plantas de milho, tanto na parte aérea quanto nas raízes. Por se encontrar na forma livre, o fungo absorve mais rapidamente o nutriente, fornecendo apenas o excedente ao seu hospedeiro. Por outro lado, as plantas tratadas com o fungo encapsulado foram capazes de absorver maior conteúdo de N, possivelmente devido à liberação gradativa do fungo, proporcionada pela matriz polimérica de alginato de cálcio (Lobo et al., 2019). Além disso, em troca do seu efeito benéfico na absorção de nutrientes, a planta hospedeira transfere parte do seu carbono fixado fotossinteticamente para o fungo (Fellbaum et al., 2012). Sendo assim, maiores conteúdos do carbono orgânico observados nos tratamentos controle e fungo encapsulado podem ter favorecido maior absorção do N pelas plantas de milho.

Apesar das inúmeras evidências dos benefícios conferidos às espécies vegetais pela utilização do fungo *S. indica*, pouco se sabe sobre seu papel na nutrição de outros macronutrientes essenciais, como o K (Kundu e Vadassery,

2022). Os resultados desse estudo mostraram que a inoculação do fungo não foi capaz de proporcionar maior absorção de K para as plantas de milho. Conchilo et al., (2021), ao avaliar possíveis alterações mediadas por *S. indica* no transporte de K em *Arabidopsis thaliana*, concluíram que, apesar de exibir múltiplos transportadores de K (*SiHAK1*, *SiTRK1*, *SiTRK2* e *SiTOK1*), em condições de deficiência do nutriente, *S. indica* reduz o acúmulo geral de K na planta hospedeira, enquanto melhora seu próprio crescimento, expressando o gene *SiHAK1*, principal transportador envolvido na captação de K.

Os conteúdos de P, S, tanto na parte aérea, quanto nas raízes, não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos. Apesar de ser um macronutriente essencial para o desenvolvimento vegetal, o P é pouco disponível nos solos e representa um constante desafio para produção agrícola (Kalayu, 2019). Muitos estudos focam no efeito combinatório de fungos endofíticos e bactérias solubilizadoras de fosfato para melhorar a absorção do nutriente pelas plantas (Nacoon et al., 2020). Um aumento na absorção de P em algumas espécies vegetais, após inoculação com *S. indica*, são relatados por alguns autores, que sugerem que os mecanismos de absorção estejam relacionados à redução do pH, através da produção de ácidos orgânicos, estimulando a atividade enzimática e indução de genes de transporte de fosfato de alta afinidade, especialmente sob condições privadas de P (Ngwene et al., 2016; Wu et al., 2018). Estudos mostram que as hifas do fungo são capazes de transportar P para as plantas em condições privadas de P, mas são incapazes de transferir em condições de altas concentrações, embora não haja diferença de colonização em ambas as condições (Gill et al., 2016).

Cerca de 95% do S presentes nos solos encontra-se indisponível para ser utilizado diretamente pelas espécies vegetais, sendo necessária a ação de microrganismos antes de sua absorção (Gahan and Schmalenberger, 2014; Narayan et al., 2021). Em condições limitadas de S, há um aumento na expressão do gene *PiSulT* de *S. indica*, e como consequência, há um aumento no transporte do nutriente para o vegetal. No entanto, em condições suficientes, *S. indica* prioriza a assimilação de sulfato sobre a atividade de transporte do gene e não compartilha o nutriente com o hospedeiro (Narayan et al., 2021). Os resultados desse estudo sugerem que o mutualismo entre *S. indica* e as raízes das plantas de milho foram

capazes de equilibrar a assimilação de sulfato, e por isso não foi observada diferença significativa entre os tratamentos.

Um aspecto importante na sobrevivência das plantas é a detecção precoce e a resposta rápida a estímulos específicos, sendo o Ca^{2+} um importante sinalizador das interações simbióticas (Beltayef et al., 2020). Neste estudo, maior absorção de Ca^{2+} foi observada nas raízes das plantas inoculadas com o fungo encapsulado. Resultados semelhantes foram relatados por Vadassery et al. (2009), que demonstraram que a elevação do conteúdo de Ca nas raízes de *Arabidopsis thaliana* inoculadas com *S. indica* é necessária para interação benéfica entre o microrganismo e seu hospedeiro.

O Mg é um macronutriente que está envolvido em uma série de processos biológicos nas plantas, e por ser o átomo central da clorofila, é de extrema importância no processo de fotossíntese (Gardner, 2003). Os resultados mostram que o fungo encapsulado foi capaz de proporcionar um aumento na absorção de Mg, principalmente nas raízes. Prasad et al., (2019) avaliaram o papel do fungo *S. indica* na melhoria da nutrição de Mg em plantas de *Arabidopsis thaliana*, e destacaram a importância do transportador PiMgT1, principalmente quando cultivadas sob condição de privação do nutriente. Os autores também sugerem que a maior taxa de colonização possa ter favorecido maior acúmulo do nutriente nas hifas intrarradiciais e nos tecidos radiculares.

Devido à baixa mobilidade dos nutrientes metálicos Zn, Fe, Cu e Mn nos solos, a absorção pelas raízes têm difusão limitada, sendo que maior densidade de hifas fúngicas extrarradiciais nos solos é uma alternativa para aumentar e facilitar a superfície de absorção desses nutrientes (Liu et al., 2000).

Padash et al. (2016), ao avaliarem a influência do aumento da concentração de Zn em substratos para cultivo de *Lactuca sativa* cv. colonizadas com *S. indica*, verificaram um aumento nos parâmetros de crescimento, no entanto, uma redução no conteúdo de ferro nas folhas. Resultados semelhantes foram obtidos nesse estudo, uma vez que os conteúdos de Fe e Zn encontrados nas raízes das plantas tratadas com o fungo fragmentado e encapsulado foram inversamente proporcionais, provavelmente pelas interações competitivas entre Fe e Zn, que ocorrem nos sítios de absorção das raízes das plantas. Em contrapartida, não foi observada diferença

entre os tratamentos para o conteúdo de Zn na parte aérea, e o conteúdo de Fe foi menor no tratamento com o fungo fragmentado.

O maior acúmulo de Cu, observado nas raízes das plantas de milho inoculadas com o fungo encapsulado, pode ser explicada pela maior associação simbiótica, que é capaz de imobilizar metais pesados, ligando-os às células das hifas, e restringindo seu transporte para a parte aérea (Hallasgo et al., 2020). O Cu é micronutriente essencial para o desenvolvimento vegetal, no entanto, quando presente em altas concentrações, pode inibir a morfologia da raiz, aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) na planta e induzir os níveis de expressão de genes relacionados à resposta ao estresse oxidativo (Sabra et al., 2018). Assim, ao restringir o Cu nas raízes, *S. indica* pode conferir às espécies vegetais maior tolerância a metais, fornecendo uma excelente estratégia para a fitorremediação (Nanda and Agrawal, 2018).

O conteúdo de Mn, tanto na parte aérea quanto raízes, foi menor nas plantas inoculadas com o fungo fragmentado. O impacto causado pela liberação de compostos orgânicos de baixo peso molecular pelas raízes inoculadas com fungos micorrízicos pode afetar a comunidade microbiana responsável pela potencial redução do Mn^{+IV} , reduzindo assim a atividade estimuladora do Mn nos solos (Kothari et al., 1991). Resultados semelhantes foram obtidos por Hallasgo et al., (2022), ao avaliarem um declínio consistente de Mn e Fe em plantas de tomate inoculadas com *S. indica*. Acredita-se que o maior contato do fungo fragmentado com a rizosfera possa ter modificado esse ambiente, resultando em menor absorção do nutriente.

Hosseini et al. (2007) provaram efeitos significativos da interação entre B × Zn em muitos processos bioquímicos e fisiológicos de plantas. De acordo com os autores, as interações nutricionais podem interferir na composição mineral da planta, de maneira que o excesso de um elemento pode estimular ou inibir a absorção de outros. Tavallali (2017) também verificou que os efeitos adversos da deficiência de B em mudas de pistache (*Pistacia vera* L. cv. *Badami*) são aliviados pelo aumento dos níveis de Zn até 10 mg.kg⁻¹ no solo, e que em concentrações adequadas, B e Zn interagem sinergicamente. O conteúdo de B, obtido nas raízes das plantas de milho, foi inversamente proporcional ao conteúdo de Zn, sendo maior no tratamento

controle e no tratamento com o fungo fragmentado. Em relação à parte aérea, esse efeito foi observado apenas no tratamento com o fungo fragmentado.

5. CONCLUSÕES

Os resultados desse estudo mostram que a utilização do alginato de sódio, como agente carreador para o fungo *S. indica*, pode ser uma alternativa promissora para o desenvolvimento de bioinoculantes, uma vez que foi capaz de conferir proteção e manter a viabilidade dos micélios fragmentados.

Além disso, a liberação gradativa do fungo, conferida pela matriz polimérica, foi capaz de proporcionar uma maior colonização nas raízes, e conseqüentemente, maior acúmulo de nutrientes, especialmente nas raízes das plantas de milho.

No entanto, maiores estudos serão necessários para melhorar o ajuste da tecnologia de encapsulamento e inoculação, especialmente visando aumentar a vida útil do inóculo e proporcionar maior absorção de nutrientes e aumento da biomassa vegetal.

6. REFERÊNCIAS

- Beltayef H, Melki M, Saidi W, Hajri R, Cruz C, Muscolo A, Youness M (2021) Potential *Piriformospora indica* effect on growth and mineral nutrition of *Phaseolus vulgaris* crop under low phosphorus intake. Journal of Plant Nutrition 44(4):498-507. <https://doi.org/10.1080/01904167.2020.1845366>
- Bhardwaj D, Ansari MW, Sahoo RK, Tuteja, N (2014) Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. Microbial Cell Factories 13(66). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-66>
- Boorboori MR, Zhang H-Y (2022) The Role of *Serendipita indica* (*Piriformospora indica*) in Improving Plant Resistance to Drought and Salinity Stresses. Biology 11(7): 952. <https://doi.org/10.3390/biology11070952>
- Clark R (1997) Arbuscular mycorrhizal adaptation, spore germination, root colonization, and host plant growth and mineral acquisition at low pH. Plant and Soil 192:15–22. <https://doi.org/10.1023/A:1004218915413>
- Conchillo LB, Haro R, Benito B (2021) K⁺Nutrition Exchange in the *Serendipita-Arabidopsis* Symbiosis: Study of the Fungal K⁺Transporters Involved. Frontiers in Ecology and Evolution 9:789371. <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.789371>

Daigle DJ, Cotty PJ (1997) The Effect of Sterilization, pH, Filler and Spore Inoculum Concentration on the Preparation of Alginate Pellets. *Biocontrol Science and Technology* 7:3-10. <http://dx.doi.org/10.1080/09583159730992>

Daniel AI, Fadaka AO, Gokul A, Bakare OO, Aina O, Fisher S, Burt AF, Mavumengwana V, Keyster M, Klein A (2022) Biofertilizer: The Future of Food Security and Food Safety. *Microorganisms* 10 (6): 1220. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061220>

Di Lonardo DP, Van der Wal A, Harkes P, Boer W (2020) Effect of nitrogen on fungal growth efficiency. *Plant Biosystems* 154(4):433-437. <https://doi.org/10.1080/11263504.2020.1779849>

Elnahal ASM, El-Saadony MT, Saad AM, Desoky EM, El-Tahan AM, Rady MM, AbuQamar SF, El-Tarabily KA (2022) Correction: The use of microbial inoculants for biological control, plant growth promotion, and sustainable agriculture: A review. *European Journal of Plant Pathology* 162:1007. <https://doi.org/10.1007/s10658-022-02472-3>

Fellbaum CR, Gachomo EW, Beesetty Y, Choudhari S, Strahan GD, Pfeffer PE, Kiers ET, Bücking H (2012) Carbon availability triggers fungal nitrogen uptake and transport in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *PNAS* 109 (7): 2666–2671. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118650109>

Gahan J, Schmalenberger A (2014) The role of bacteria and mycorrhiza in plant sulfur supply. *Frontiers in Plant Science* 5:1-7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00723>

Gardner RC (2003) Genes for magnesium transport. *Current Opinion in Plant Biology* 6(3):263-267. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00032-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00032-3)

Gill SS, Gill R, Trivedi DK, Anjum NA, Sharma KK, Ansari MW, Ansari AA, Johri AK, Prasad R, Pereira E, Varma A, Tuteja N (2016) *Piriformospora indica*: Potential and Significance in Plant Stress Tolerance. *Frontiers in Microbiology* 7:332. <http://doi.gov/10.3389/fmicb.2016.00332>

Grzyb A, Wolna-Maruwka A, Niewiadomska A (2020) Environmental Factors Affecting the Mineralization of Crop Residues. *Agronomy* 10:1951. <http://doi.gov/10.3390/agronomy10121951>

Hakim S, Naqqash T, Nawaz MS, Laraib I, Siddique MJ, Zia R, Mirza MS, Imran A (2021) Rhizosphere Engineering With Plant Growth-Promoting Microorganisms for Agriculture and Ecological Sustainability. *Frontiers in Sustainable Food System* 5:617157. <https://10.3389/fsufs.2021.617157>

Hallasgo AM, Spangl B, Steinkellner S, Hage-Ahmed K (2020) The Fungal Endophyte *Serendipita williamsii* Does Not Affect Phosphorus Status But Carbon and Nitrogen Dynamics in Arbuscular Mycorrhizal Tomato Plants. *Journal of Fungi* 6:233. <http://doi.gov/10.3390/jof6040233>

Hill TW, Kafer E (2001) Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace element and minimal medium salt stock solutions. *Fungal Genetics Reports* 48:20–21. <http://doi.gov/10.4148/1941-4765.1173>

Hosseini S M, Maftoun M, Karimian N, Ronaghi A, Emam Y (2007) Effect of Zinc x Boron interaction on plant growth and tissue nutrient concentration of corn. *Journal of Plant Nutrition* 30(5):773-781. <http://doi.gov/10.1080/01904160701289974>

Iwase K (1992) Gluconic acid synthesis by the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma robustum*. *Canadian Journal of Botany* 70(1): 84-88. <https://doi.org/10.1139/b92-011>

Jackson M L. Soil chemical analysis, 2nd edn. Prentice Hall, New Jersey, 1965.

John RP, Tyagi RD, Brar SK, Surampalli RY, Prévost, D (2011) Bio-encapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery. *Critical Reviews in Biotechnology* 31(3):211-226. <http://doi.org/10.3109/07388551.2010.513327>

Jurić S, Đermić E, Topolovec-Pintarić S, Bedek M, Vinceković M (2019) Physicochemical properties and release characteristics of calcium alginate microspheres loaded with *Trichoderma viride* spores. *Journal of Integrative Agriculture* 18(11):2534-2548. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(19\)62634-1](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(19)62634-1)

Kalayu G (2019) Phosphate Solubilizing Microorganisms: Promising Approach as Biofertilizers. *International Journal of Agronomy* 2019:4917256. <https://doi.org/10.1155/2019/4917256>

Kothari SK, Marschner H, Romheld V (1991) Contribution of the VA mycorrhizal hyphae in acquisition of phosphorus and zinc by maize grown in a calcareous soil. *Plant and Soil* 131:177-185. <https://doi.org/10.1007/BF00009447>

Kour D, Rana KL, Yadav AN, Yadav N, Kumar M, Kumar V, Vyas P, Dhaliwal HS, Saxena AK (2020) Microbial biofertilizers: Bioresources and eco-friendly technologies for agricultural and environmental sustainability. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 23:101487 <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101487>

Krasilnikov P, Taboada MA, Amanullah (2022) Fertilizer Use, Soil Health and Agricultural Sustainability. *Agriculture* 12(4):462. <https://doi.org/10.3390/agriculture12040462>

Kundu A, Vadassery J (2022) Molecular mechanisms of *Piriformospora indica* mediated growth promotion in plants. *Plant Signal & Behavior* 17(1):2096785. <http://doi.gov/10.1080/15592324.2022.2096785>

Leo WJ, Mcloughlin AJ, Malone DM (1990) Effects of Sterilization Treatments on Some Properties of Alginate Solutions and Gels. *Biotechnology Progress* 6(1):51-53. <https://doi.org/10.1021/bp00001a008>

Liu A, Hamel C, Hamilton RI, Ma BL, Smith DL (2000) Acquisition of Cu, Zn, Mn and Fe by mycorrhizal maize (*Zea mays* L.) grown in soil at different P and micronutrient levels. *Mycorrhiza* 9:331–336. <https://doi.org/10.1007/s005720050277>

Lobo CB, Tomás MSJ, Viruel E, Ferrero MA, Lucca ME (2019) Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural Technologies. *Microbiology Research* 219:12-25. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.10.012>

Nacoon S, Jogloy S, Riddech N, Mongkolthanaruk W, Kuyper TW, Boonlue S (2020) Interaction between Phosphate Solubilizing Bacteria and Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Growth Promotion and Tuber Inulin Content of *Helianthus tuberosus* L. *Scientific Reports* 18;10(1):4916. <http://doi.gov/10.1038/s41598-020-61846-x>

Nanda R, Agrawal V (2018) *Piriformospora indica*, an excellent system for heavy metal sequestration and amelioration of oxidative stress and DNA damage in *Cassia angustifolia* Vahl under copper stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 30(156):409-419. <http://doi.gov/10.1016/j.ecoenv.2018.03.016>

Narayan OP, Verma N, Jogawat A, Dua M, Johri AK (2021) Sulfur transfer from the endophytic fungus *Serendipita indica* improves maize growth and requires the sulfate transporter SiSulT. *The Plant Cell* 33(4):1268–1285. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab006>

Ngwene B, Boukai S, Söllner L, Franken P, Andrade-Linares DR (2016) Phosphate utilization by the fungal root endophyte *Piriformospora indica*. *Plant and Soil* 405: 231–241. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2779-8>

Padash A, Shahabivand S, Behtash F, Aghaee A (2016) A practicable method for zinc enrichment in lettuce leaves by the endophyte fungus *Piriformospora indica* under increasing zinc supply. *Scientia Horticulturae* 213:367-372. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.10.040>

Paixão M, Mônico A, Hoffay A, Correa A, Schmildt E (2018) Ácido giberélico na germinação de sementes de mamão. *Anais do VII Simpósio do Papaya Brasileiro*.

Perez JJ, Francois NJ, Maroniche GA, Borrajo MP, Pereyra MA, Creus CM (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>

Peters JB (2005) Wisconsin Procedures for Soil Testing, Plant Analysis and Feed & Forage Analysis: Plant Analysis. Department of Soil Science, College of Agriculture and Life Sciences, University of Wisconsin-Extension, Madison, W.I.

Phillips JM, Hayman DS (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55(1):158-161. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(70\)80110-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(70)80110-3)

Prasad D, Verma N, Bakshi M, Narayan OP, Singh AK, Dua M, Johri AK (2019) Functional Characterization of a Magnesium Transporter of Root Endophytic Fungus *Piriformospora indica*. *Frontiers in Microbiology* 9:3231. <http://doi.gov/10.3389/fmicb.2018.03231>

Rodrigues LS, Kasuya MCM, Borges AC (1999) Viability of ectomycorrhizal fungus mycelium entrapped in calcium alginate gel. *Mycorrhiza* 8:263–266. <https://doi.org/10.1007/s005720050243>

Rossi MJ, Nascimento FX, Brandao PMFDR, Camelini CM, Giachini AJ (2017) Activated Charcoal Increases the Viability of Ectomycorrhizal fungi During the Stages of Cultivation Aiming the Production of Large-Scale Inocula via Submerged Cultivation. *Advances in Biotechnology & Microbiology* 6(4):555692. <https://doi.org/10.19080/AIBM.2017.06.555692>

Sabra M, Aboulnasr A, Franken P, Perreca E, Wright LP, Camehl I (2018) Beneficial Root Endophytic Fungi Increase Growth and Quality Parameters of Sweet Basil in Heavy Metal Contaminated Soil. *Frontiers in Plant Science* 9:1726. <http://doi.gov/10.3389/fpls.2018.01726>

Schoebitz M, López MD, Roldán A (2013) Bioencapsulation of microbial inoculants for better soil–plant fertilization. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 33:751–765. <http://doi.gov/10.1007/s13593-013-0142-0>

Szopa D, Mielczarek M, Skrzypczak D, Izydorczyk G, Mikula K, Chojnacka K, Witek-Krowiak A (2022) Encapsulation efficiency and survival of plant growth-promoting microorganisms in an alginate-based matrix – A systematic review and protocol for a practical approach. *Industrial Crops and Products* 181:114846. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114846>

Tavallali V (2017) Interactive effects of zinc and boron on growth, photosynthesis, and water relations in pistachio. *Journal of Plant Nutrition* 40(11):1588-1603. <http://doi.gov/10.1080/01904167.2016.1270308>

Vadassery J, Ranf S, Drzewiecki¹ C, Mithofer A, Mazars C, Scheel D, Lee J, Oelmüller R (2009) A cell wall extract from the endophytic fungus *Piriformospora indica* promotes growth of *Arabidopsis* seedlings and induces intracellular calcium elevation in roots. *The Plant Journal* 59:193–206. <http://doi.gov/10.1111/j.1365-313X.2009.03867.x>

Varma A, Bakshi M, Lou B, Hartmann A, Oelmüller R (2012) *Piriformospora indica*: A Novel Plant Growth-Promoting Mycorrhizal Fungus. *Journal of Agricultural Research* 1(2):117–131. <http://doi.gov/10.1007/s40003-012-0019-5>

Vassilev N, Vassileva M, Martos V, Garcia del Moral LF, Kowalska J, Tylkowski B and Malusá E (2020) Formulation of Microbial Inoculants by Encapsulation in Natural Polysaccharides: Focus on Beneficial Properties of Carrier Additives and Derivatives. *Frontiers in Plant Science* 11:270. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00270>

Vejan P, Khadiran T, Abdullah R, Ismail S, Dradasnia A (2019) Encapsulation of plant growth promoting Rhizobacteria - prospects and potential in agricultural sector: a review. *Journal of Plant Nutrition* 42(19):2600-2623. <https://doi.org/10.1080/01904167.2019.1659330>

Wu M, Wei Q, Xu L, Li H, Oelmüller R, Zhang W (2018) *Piriformospora indica* enhances phosphorus absorption by stimulating acid phosphatase activities and organic acid accumulation in *Brassica napus*. *Plant and Soil* 432:333–344. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3795-2>

Yadav, KK, Sarkar S (2019) Biofertilizers, Impact on Soil Fertility and Crop Productivity under Sustainable Agriculture. *Environment and Ecology* 37 (1): 89-93.

CAPÍTULO III

RESUMO

COSTA, FERNANDA SENNA FERREIRA, D.Sc, Universidade Vila Velha – ES, dezembro de 2023. **Potencial utilização de biofertilizantes à base de alginato de cálcio para o cultivo sustentável de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*).** Orientador: Alessandro Coutinho Ramos.

A crescente demanda por práticas agrícolas mais sustentáveis e eficazes tem impulsionado a pesquisa e a inovação em diversas áreas, incluindo o desenvolvimento de biofertilizantes e o uso de agentes carreadores, como o alginato de cálcio. Além disso, o conceito de consórcio microbiano, que envolve a interação coordenada de microorganismos benéficos no solo, tem se destacado como uma abordagem promissora para melhorar a saúde das plantas e fertilidade dos solos. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da inoculação de esferas de alginato de cálcio contendo o fungo *Serendipita indica* e a bactéria *Herbaspirillum seropedicae*, bem como o consórcio microbiano, em relação aos parâmetros morfológicos e nutrição de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Cinco esferas de cada tratamento (controle, *S. indica*, *H. seropedicae* e *S. indica* + *H. seropedicae*) foram inoculadas em sementes de tomate, previamente desinfestadas, em vasos contendo terra vegetal:areia (2:1). Após 90 dias, foi feita a avaliação da altura, peso seco e fresco da parte aérea e das raízes, diâmetro do caule, volume de raiz, taxa de colonização e conteúdo de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg) da parte aérea. O maior peso fresco foi observado na parte aérea das plantas inoculadas com esferas de *S. indica* e do consórcio microbiano (*S. indica* + *H. seropedicae*), apresentando diferença significativa em relação ao tratamento não inoculado. Também foi observada diferença significativa em relação ao peso seco das raízes, porém, este foi maior no tratamento não inoculado, em relação aos tratamentos inoculados. Os demais parâmetros não foram alterados com a inoculação dos microorganismos. Uma alta taxa de colonização fúngica (100%) foi observada nos tratamentos com esferas contendo *S. indica* e no consórcio microbiano (*S. indica*+*H. seropedicae*). Em relação aos nutrientes, houve um aumento no conteúdo de Ca e K, nas plantas inoculadas com esferas contendo o consórcio microbiano, e K nas plantas inoculadas com *S. indica* e com o consórcio microbiano, quando comparado ao tratamento não-inoculado. Os resultados ressaltam a relevância da pesquisa em

biofertilizantes como ferramenta promissora para promover a sustentabilidade e eficácia de práticas agrícolas, contribuindo para soluções mais eficientes e amigáveis ao meio ambiente e agricultura.

Palavras-chaves: *Serendipita indica*; *Herbaspirillum seropedicae*, alginato, nutrição vegetal.

ABSTRACT

COSTA, FERNANDA SENNA FERREIRA, D.Sc, University Vila Velha – ES, december, 2023. **Potential use of calcium alginate-based biofertilizers for the sustainable cultivation of tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.).** Advisor: Alessandro Coutinho Ramos

A high demand for more sustainable and effective agricultural practices have boosted the research and the innovation in many areas, including the biofertilizers and the use of carries agents, as the calcium alginate. Furthermore, the microbial consortium concept, which involves the coordinated interaction of beneficial microorganisms in soil, has been highlighted as a promising to improve the plants health and soils fertility. Thereby, the objective of this study was to evaluate the effects of calcium alginate beads containing the *Serendipita indica* fungi and the *Herbaspirillum seropedicae* bacteria, as well the microbial consortium, related to the nutrition and morphological parameters in tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.). Five beads of each treatment (control, *S. indica*, *H. seropedicae* and *S. indica* + *H. seropedicae*) were inoculated in tomato seed, previously disinfected, in vases containing vegetable soil:sand (2:1). After 90 days, an evaluation of height, dry and fresh weight of aerial part and roots was made, as well the roots volume, percentage colonization and macronutrients contents (N, P, K, Ca, Mg) of aerial parts. The higher fresh weights were observed in the inoculated aerial part whit *S. indica* beads and those with microbial consortium (*S. indica* + *H. seropedicae*), showing significant difference in comparison whit the non-inoculated plants. Also, it was observed significant difference in comparison with the dry weight roots; however, it was the higher in the non-inoculated plants, regarding the inoculated treatments. The other parameters were not change with the microbial inoculation. A higher percentage of fungi colonization (100%) was observed in treatment with beads containing *S. indica* and the microbial consortium (*S. indica* + *H. seropedicae*). Related to the nutrients, an increasing in Ca and K contents in the inoculated plants with *S. indica* and in the microbial consortium occurred, in comparison with the non-inoculated plants. The results highlight the research relevance of biofertilizer as a promising tool to promote the sustainable and effective of agricultural practices, contributing for more efficient and friendly solutions to the environment and agriculture.

Keywords: *Serendipita indica*, *Herbaspirillum seropedicae*, alginate beads, plant nutrition; *Solanum lycopersicon*.

1. INTRODUÇÃO

O tomate (*Solanum lycopersicon L.*) pertence à família Solanaceae e é uma das espécies vegetais mais cultivadas em todo o mundo (Caruso et al., 2022). Em 2021, de acordo com os últimos dados disponíveis, foram atribuídos mais de 5 milhões de hectares à produção de tomate, sendo a China o maior produtor, seguida por Índia, Turquia e Estados Unidos (FAO, 2023).

A fim de atender as exigências do mercado, impulsionando uma produção contínua, a prática de monocultura tem se tornado cada vez mais comum para produção de tomates (Fu et al., 2017; Caruso et al., 2022). No entanto, impactos negativos no rendimento e qualidade das culturas, bem como à ocorrência de pragas e doenças, são observados (Oladokun et al., 2019).

Uma vez que as espécies vegetais possuem necessidades nutricionais diferentes, o cultivo de uma mesma espécie, por longo período de tempo em uma mesma região, pode resultar em escassez de alguns nutrientes e acúmulo de outros (Ali et al., 2021). Esse desequilíbrio nutricional e o acúmulo excessivo de nutrientes e metabólitos, faz com que a comunidade microbiana, que está intimamente relacionada aos processos biológicos de ciclagem de nutriente e formação e decomposição da matéria orgânica, se torne instável, proliferando de maneira excessiva, principalmente os microrganismos nocivos e patógenos (Ali et al., 2021; Dang et al., 2022).

A fim de compreender como as propriedades dos solos e os microrganismos respondem às diferentes práticas de manejo e às mudanças ambientais, muitos pesquisadores, nos últimos anos, estão buscando eliminar possíveis obstáculos no cultivo de tomate, através de melhorias dos métodos de cultivo e gestão pós-colheita (Fu et al., 2017). Entre elas, a seleção de variedades superiores e mais resistentes à doenças e pragas, aplicações de técnicas de enxerto para aumentar a resistência das plantas, fertilização, ou rotação de culturas para equilibrar a nutrição dos solos (Buller et al., 2013; Zhang et al., 2014; De Corato et al., 2020).

Os fertilizantes inorgânicos são de grande importância no cultivo de espécies vegetais, pela sua capacidade de correção dos solos e por fornecerem nutrientes necessários para o crescimento e aumento no rendimento das culturas (Chen et al., 2021). No entanto, sob regime de monocultura, os agricultores geralmente aplicam grandes quantidades desses produtos para manter os níveis de produção, e em

longo prazo, não só leva à consolidação do solo, como também ao aumento da poluição, e maiores custos de produção (Wu et al., 2016).

A busca por alternativas ecológicas, para mitigar os efeitos nocivos dos agroquímicos no meio ambiente e promover uma agricultura mais sustentável, é uma estratégia viável e pode ser alcançada com a utilização de microrganismos provenientes dos solos (Basu et al., 2021). Esses microrganismos são capazes de proporcionar efeitos benéficos quando associados às espécies vegetais, e através de mecanismos diretos ou indiretos, podem resultar em um aumento na produtividade de culturas, melhorar a fertilidade dos solos e promover a diversidade e a interação com outros microrganismos benéficos, inibindo o crescimento de potenciais patógenos e conferindo maior resistência a estresses abióticos (Santoyo et al., 2021).

Atualmente, a maioria dos estudos se concentra na avaliação das interações entre uma única espécie de microrganismo com a espécie vegetal. No entanto, devido à diversidade de microrganismos encontrados nos solos e as múltiplas interações que podem ocorrer quando associadas às raízes das plantas, a utilização de consórcios microbianos, contendo dois ou mais microrganismos compatíveis de diferentes cepas ou espécie, pode resultar em efeitos aditivos ou sinérgicos (Santoyo et al., 2021).

S. indica é um fungo endofítico, isolado de raízes de plantas no deserto de Thar, na Índia, capaz de colonizar raízes de diferentes espécies vegetais (Verma et al., 1998). O fungo é conhecido por melhorar o rendimento das culturas e conferir resistência contra estresses bióticos e abióticos, desencadeando resistência sistêmica induzida, aumentando a capacidade antioxidante, mobilizando nutrientes e manipulando os níveis hormonais da planta (Gill et al., 2016).

Assim como os fungos, as bactérias também são capazes de se associar às raízes das plantas impulsionando seu desenvolvimento de forma direta ou indireta. *Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria diazotrófica, pertencente à subclasse das β -proteobactérias, que se encontra associada preferencialmente em gramíneas de grande importância alimentar, como milho, cana-de-açúcar, arroz, sorgo e trigo (Olivares et al., 1996). Quando associada às plantas, esse microrganismo é capaz de promover a fixação biológica de nitrogênio, produzir genes reguladores de

crescimento, como auxinas e giberelinas e solubilizar fosfato inorgânico (Irineu et al., 2022).

Muitos estudos utilizam *S. indica* de forma isolada como forma de avaliar sua capacidade de promover o crescimento e aporte de nutriente às espécies vegetais, no entanto, pouco se sabe sobre a interação com outros microrganismos (Sharma et al., 2023).

Atualmente, um dos maiores desafios da utilização de microrganismos para promoção do crescimento vegetal é garantir a preservação e manter a viabilidade durante transporte, armazenamento e aplicação em campo. Ao aplicar diretamente nos solos, os microrganismos ficam expostos a diversas condições ambientais, como a escassez ou excesso de água, alterações de pH e temperatura, além da competição com os microrganismos nativos que podem influenciar na sua efetividade (Rojas-Sánchez et al., 2022). Assim, a utilização de técnicas para imobilização de microrganismos, com a seleção e utilização de um veículo adequado, capaz de conferir proteção e manter a estabilidade dos microrganismos se torna essencial para superar essas limitações (Chaudhary et al., 2020).

Sendo assim, o objetivo desse estudo foi estabelecer um consórcio microbiano, a partir do fungo *Serendipita indica* e da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* e verificar a influência dos microrganismos, de forma isolada e em consórcio, veiculados em matriz polimérica de alginato de cálcio, sobre os parâmetros morfológicos e nutricionais de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção do inóculo de *S. indica* e encapsulamento em alginato de cálcio

O fungo endofítico *Serendipita indica* foi previamente obtido da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia, da Universidade de Vila Velha.

Para propagação do fungo em meio líquido, 4 discos de ágar (6 mm de diâmetro) contendo micélios retirados da borda de colônias ativas, foram adicionados em frascos erlenmeyer contendo 125 mL de meio Kaefer modificado, composto por: glicose (20 g L⁻¹), peptona (2 g L⁻¹), extrato de levedura (1 g L⁻¹), 50 mL L⁻¹ de solução de micronutrientes (NaNO₃ (12 g L⁻¹), KCl (10,4 g L⁻¹), MgSO₄·7H₂O (10,4 g L⁻¹) e KH₂PO₄ (30,4 g L⁻¹), 10 mL L⁻¹ de solução de micronutrientes (ZnSO₄·7H₂O (2,2 g L⁻¹), MnCl₂·4H₂O (0,5 g L⁻¹), H₃BO₃ (1,1 g L⁻¹), CoCl₂·5H₂O (0,16 g L⁻¹), CuSO₄·5H₂O (0,16 g L⁻¹), (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O (0,11 g L⁻¹), Fe-EDTA (1 mL L⁻¹), solução de vitamina (1 mL L⁻¹) (Hill e Kaefer, 2001).

O pH do meio foi previamente ajustado para 6,5 antes da esterilização a 121 °C durante 40 minutos. O fungo foi incubado a 28 ± 2 °C, 98 rpm, por 15 dias. Após esse período, procedeu-se a fragmentação, onde 10 g de massa fúngica foram adicionadas de 100 mL de água destilada estéril, utilizando liquidificador.

Para obtenção das esferas, uma solução de alginato de sódio (NaC₆H₇O₆) na concentração de 4% (m/v), foi adicionada à suspensão de micélios fragmentados, na proporção 1:1 (Rodrigues et al., 1999). A mistura foi gotejada, com auxílio de bomba peristáltica (MS Tecnopon), a uma velocidade de 8 mL/minuto, em solução de cloreto de cálcio (CaCl₂) 0,7 M, na proporção 8:10. As esferas formadas foram mantidas por 40 minutos, sob agitação constante, para completa polimerização (Rodrigues et al., 1999). Ao final, as esferas foram lavadas e armazenadas em temperatura de refrigeração (4 °C) até o momento da inoculação.

2.2. Obtenção do inóculo de *H. seropedicae* e encapsulamento em alginato de cálcio

Herbaspirillum seropedicae foi obtido da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia, da Universidade de Vila Velha.

O inóculo foi preparado por meio do crescimento bacteriano em meio líquido Dygs, composto por: glicose (2 g L^{-1}), peptona ($1,5 \text{ g L}^{-1}$), extrato de levedura (2 g L^{-1}), K_2HPO_4 10% (m/v) (5 mL L^{-1}), $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ 10% (m/v) (5 mL L^{-1}), ácido glutâmico ($1,5 \text{ g L}^{-1}$), ácido málico (10% m/v) (20 mL L^{-1}), por 24 horas a 30°C , em agitador orbital a 130 rpm.

O meio foi centrifugado a 3000 rpm, por 10 minutos e sobrenadante foi descartado. As células foram lavadas com solução de PBS (pH 7,4), para remoção do nitrogênio do meio de cultura, e ressuspendidas em água destilada estéril. A concentração inicial de bactérias foi determinada em espectrofotômetro, a 600 nm.

O encapsulamento foi realizado conforme metodologia descrita por Reetha et al (2014), com modificações. As esferas foram obtidas a partir da adição de alginato de cálcio 4% (m/v), na suspensão de bactérias, na proporção de 1:1. A concentração final de bactérias foi determinada por contagem direta em placas de Petri, contendo meio Dygs, com uma concentração final de aproximadamente 10^{12} UFC/mL. A mistura foi gotejada, com auxílio de bomba peristáltica (MS TecnoPON), a uma velocidade de 8 mL/minuto, em solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) 0,7 M, na proporção 8:10. As esferas formadas foram mantidas por 40 minutos, sob agitação constante, para completa polimerização (Rodrigues et al., 1999). Ao final, as esferas foram lavadas e armazenadas em temperatura de refrigeração (4°C) até o momento da inoculação.

2.3. Interação sinérgica entre *S. indica* e *H. seropedicae*

A avaliação da interação entre *S. indica* e *H. seropedicae* foi realizada conforme metodologia descrita por Dabral et al. (2020), com modificações. Placas de Petri contendo meio Kaefer modificado (Hill e Kaefer, 2001), foram inoculadas com um pequeno fragmento de ágar, contendo micélios retirados da borda de colônias ativas do fungo *S. indica*, em posição central. Em seguida, 100 μL da suspensão de

H. seropedicae (crescida por 24 horas em meio líquido Dygs, a 30 °C, em agitador orbital a 130 rpm), foram adicionadas próximo ao fragmento do fungo. As placas foram incubadas em BOD, a 28 °C, por 12 dias. A interação entre *S. indica* e *H. seropedicae* foi determinada através medida radial da área de crescimento do fungo, avaliada em software ImageJ.

2.4. Obtenção das esferas de alginato de cálcio contendo consórcio microbiano

As esferas contendo consórcio microbiano (*S. indica* e *H. seropedicae*) foram elaboradas a partir do cultivo isolado dos microrganismos, conforme metodologias descritas nos itens 2.1 e 2.2, respectivamente.

As células de *H. seropedicae* foram centrifugadas e lavadas com solução de PBS (pH 7,4). Após descarte do sobrenadante, igual volume da suspensão de micélios fragmentados (10 g/100 mL) foi adicionado e homogeneizados em vórtex. Uma solução de alginato de cálcio 4% (m/v) foi adicionada à suspensão de microrganismos, na proporção de 1:1. A mistura foi gotejada, com auxílio de bomba peristáltica (MS Tecnopon), a uma velocidade de 8 mL/minuto, em solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) 0,7 M, na proporção 8:10. As esferas formadas foram mantidas por 40 minutos, sob agitação constante, para completa polimerização (Rodrigues et al., 1999). Ao final, as esferas foram lavadas e armazenadas em temperatura de refrigeração (4 °C) até o momento da inoculação.

2.5. Eficiência de encapsulamento das esferas de alginato contendo *H. seropedicae* e consórcio microbiano

A eficiência de encapsulamento foi determinada pelo número de bactérias não encapsuladas, deixadas em solução de CaCl_2 após o desenvolvimento do grânulo (He et al., 2015). A avaliação foi feita pelo método convencional de contagem em placa com meio Dygs, antes (N_i) e após encapsulamento (N_f), pela diluição da solução de CaCl_2 em solução salina (0,85% m/v). As placas foram incubadas a 30 °C, por 48 horas e a eficiência de encapsulamento (EE) foi calculada pela equação:

$$EE\% = (N_i - N_f) / N_i * 100$$

Para as esferas elaboradas com o consórcio microbiano (*S. indica* e *H. seropedicae*), foi adicionado o fluconazol às placas contendo meio Dygs (150µg/mL) para avaliação da viabilidade bacteriana.

2.6. Material vegetal e inoculação das esferas em sementes de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

Foram utilizadas sementes de tomate cereja (*Solanum lycopersicum* L.), obtidas da empresa Topseed Garden, previamente desinfestadas em álcool etílico 70% por 2 minutos, seguida de hipoclorito de sódio 2,5 % por 5 minutos e embebidas em água destilada estéril por 30 minutos (Paixão et al., 2018).

As sementes foram germinadas em bandejas contendo terra vegetal:areia (2:1), previamente autoclavados a 121 °C durante 60 minutos, por duas vezes, com intervalo de 24 horas entre elas. Em cada tubete, foram adicionadas 2 sementes de tomate, juntamente com 5 esferas de cada tratamento (controle, *S. indica*, *H. seropedicae* e *S. indica* + *H. seropedicae*).

As bandejas foram mantidas por 20 dias em estantes de germinação com fotoperíodo de luz de 16 horas (intensidade de luz de 100 µmol m²s⁻¹), escuridão de 8 horas, umidade de 80% e temperatura de 25 °C, regadas três vezes na semana. Posteriormente, as plantas foram transplantadas para vasos com capacidade de 2 L, contendo o mesmo substrato.

As plantas foram mantidas em casa de vegetação por mais 70 dias, sendo irrigadas 3 vezes na semana, com água destilada e solução de Clark modificada (1/4 força), pH 5,5-5,6 (Clark, 1975).

2.7. Avaliação dos parâmetros de crescimento vegetal

Ao final dos 90 dias após a inoculação, as plantas foram avaliadas em relação à altura (cm), diâmetro do caule (cm), peso fresco e seco (g) da parte aérea e das raízes e volume de raiz (mL).

As plantas foram retiradas dos vasos e as raízes lavadas com água corrente para remoção do substrato. A parte aérea e as raízes foram separadas e pesadas, para determinação do peso fresco. Em seguida, foram acondicionados em sacos de papel e submetidos à secagem em estufa, com circulação forçada de ar a 65 °C, até peso constante.

2.8. Determinação da taxa de colonização fúngica

A taxa de colonização fúngica foi determinada de acordo com Phillips e Hayman (1970), com modificações. As raízes foram submetidas a sucessivas lavagens em solução de KOH 10% (m/v), a 60 °C. Em seguida, foram coradas com azul de tripano 0,02% (m/v), por 25 minutos. Vinte segmentos, com aproximadamente 1 cm de comprimento, foram escolhidos aleatoriamente e examinadas utilizando microscópio óptico (Zeiss, AIXO). A porcentagem de colonização foi determinada pela seguinte equação:

$$\text{Colonização da raiz (\%)} = [(\text{número de segmentos colonizados/número total de segmentos examinados})/100]$$

2.9. Determinação do conteúdo de macronutrientes

Para a determinação dos teores de N, o material vegetal foi submetido à digestão sulfúrica, com determinação titulométrica (Jackson, 1965). Os demais nutrientes (P, K, Ca, Mg,) foram quantificados por ICP-OES, após digestão com HNO₃ concentrado e H₂O₂ em sistema de digestão aberta, sob as condições: gás plasma 8,0 L.min⁻¹, taxa de fluxo de gás auxiliar 0,70 L.min⁻¹ e taxa de fluxo de gás carreador 0,55 L.min⁻¹ (Peters, 2005).

2.10. Delineamento experimental e análise estatística

Para a montagem dos experimentos foi utilizados delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), sendo que cada experimento foi composto por 4

tratamentos: (1) plantas não inoculadas, (2) plantas inoculadas com esferas contendo micélios fragmentados de *S. indica*, (3) plantas inoculadas com esferas contendo *H. seropedicae* e (4) plantas inoculadas com esferas contendo consórcio microbiano (*S. indica* + *H. seropedicae*), com 5 repetições (n= 20). Os dados foram analisados estatisticamente por one-way ANOVA, sendo a diferença entre os tratamentos verificada através do teste de Tukey a $p \leq 0.05$, utilizando-se o programa GraphPad Prism 8.0.

3. RESULTADOS

3.1. Interação sinérgica entre *S. indica* + *H. seropedicae*

O impacto de *H. seropedicae* no crescimento de *S. indica* foi avaliado em relação à área de crescimento radial em placas de Petri contendo meio sólido Kaefer modificado (Hill e Kaefer, 2001). A inoculação de *H. seropedicae*, resultou em estímulo no crescimento ($31,13 \pm 0,66 \text{ cm}^2$), quando comparado ao controle ($19,90 \pm 0,58 \text{ cm}^2$) (Figura 1).

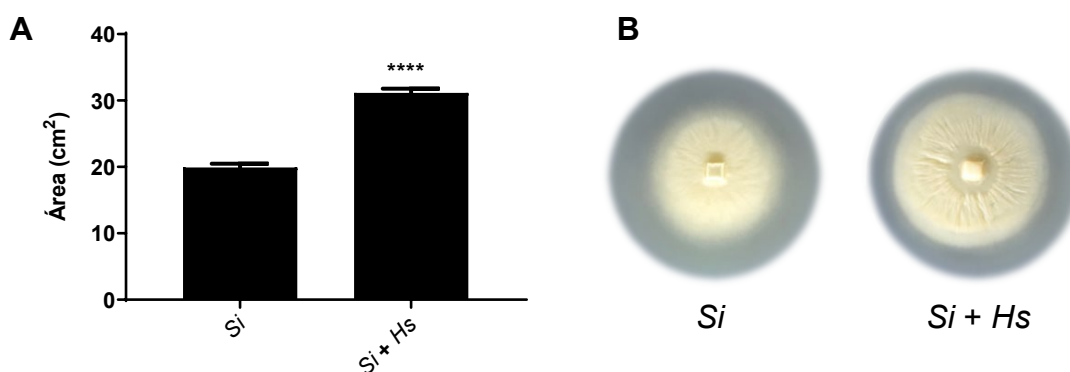


Figura 1: Interação sinérgica entre *H. seropedicae* e *S. indica*. (A) Área do crescimento radial do fungo *S. indica* (Si) e do consórcio *S. indica* + *H. seropedicae* (Si + Hs). (B) Crescimento de *S. indica* em meio Kaefer modificado, sem inoculação (Si) e com inoculação de *H. seropedicae* (Si + Hs). Os resultados são reportados com as médias de 3 repetições $\pm$ desvio padrão.

3.2. Eficiência do encapsulamento das esferas de alginato de cálcio contendo *H. seropedicae* e o consórcio microbiano (*S. indica* + *H. seropedicae*)

A eficiência do encapsulamento das esferas elaboradas com *H. seropedicae* e com o consórcio microbiano (*S. indica* + *H. seropedicae*) foi avaliada após a etapa de polimerização das esferas em solução de cloreto de cálcio.

A avaliação, feita pelo método tradicional de contagem em placas, mostrou uma concentração de bactérias de 10^3 UFC/mL deixadas na solução de cloreto de cálcio. Assim, a técnica de encapsulamento com alginato de cálcio demonstrou uma eficiência de 99,99%.

3.3. Avaliação dos parâmetros de crescimento vegetal

Na Figura 2 estão apresentadas as médias de altura e diâmetro do caule das plantas de tomate, avaliados após 90 dias do plantio, para os diferentes tratamentos. No geral, a inoculação das esferas contendo os microrganismos na forma isolada ou em consórcio, não foi capaz de proporcionar um aumento no crescimento vegetal.

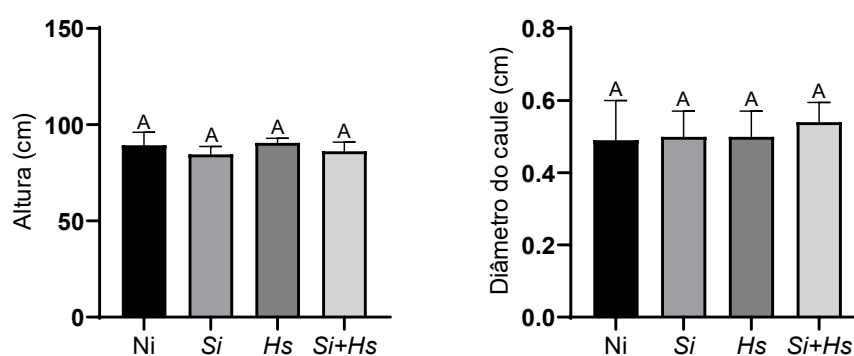


Figura 2: Altura e diâmetro do caule (cm) das plantas de tomate não inoculadas (Ni) e inoculadas com esferas de alginato de cálcio contendo: micélios fragmentados de *S. indica* (Si), *H. seropedicae* (Hs) e consórcio microbiano (Si+Hs). As barras seguidas pela mesma letra maiúscula indicam que não houve diferença significativa entre as médias, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Em relação ao peso fresco da parte aérea, é possível observar que as plantas inoculadas com esferas contendo micélios fragmentados de *S. indica* e o consórcio microbiano (*S. indica* + *H. seropedicae*), apresentaram maior massa, diferindo das

plantas não inoculadas. Já para o peso seco, não foi possível observar diferença significativa entre os tratamentos (Figura 3).

Para as raízes, maior peso seco foi obtido nas plantas não inoculadas, diferindo dos demais, seguido das plantas inoculadas com os microrganismos de forma isolada. Não foi observada diferença significativa entre os tratamentos quando avaliado o peso fresco e volume de raiz (Figura 3).

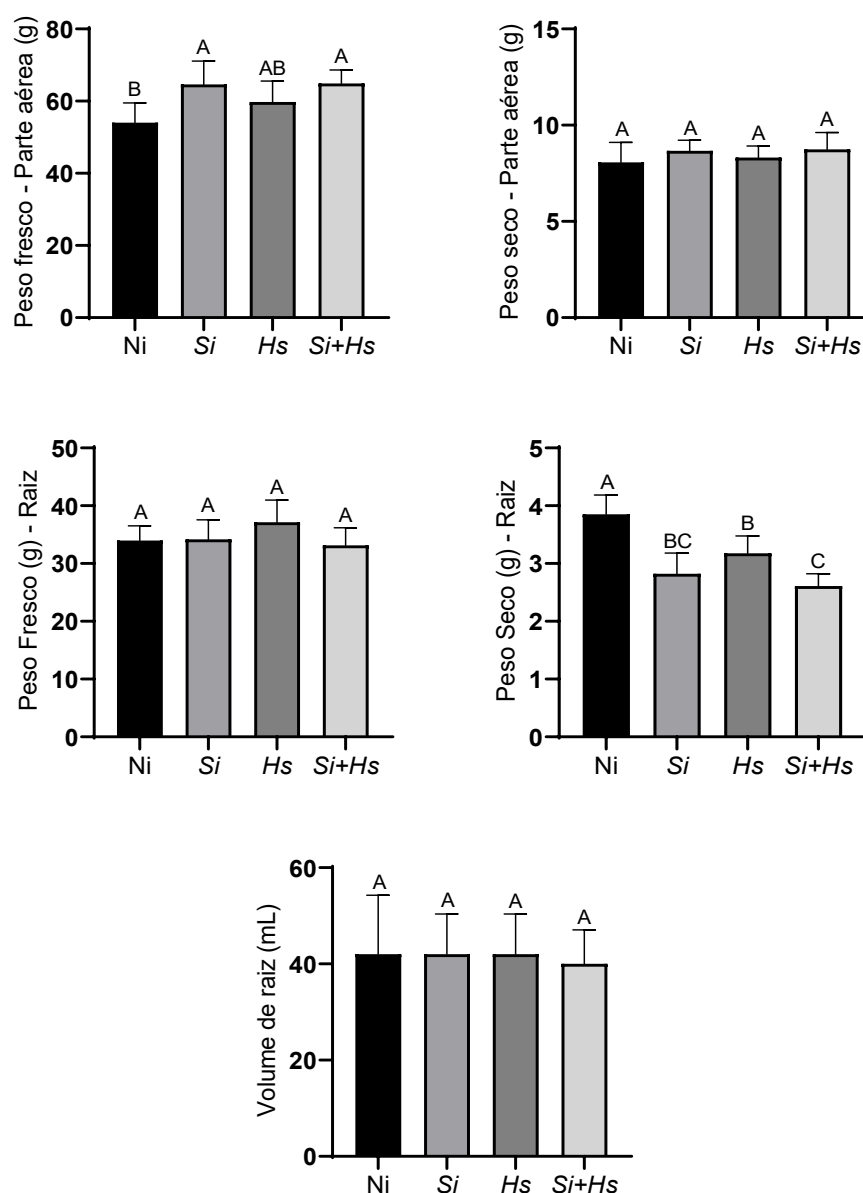


Figura 3: Peso fresco e seco (g) da parte aérea e das raízes e volume de raiz (mL) das plantas de tomate não inoculadas (Ni) e inoculadas com esferas de alginato de cálcio contendo: micélios fragmentados de *S. indica* (Si), *H. seropedicae* (Hs) e o consórcio microbiano (Si+Hs). As barras seguidas por letras diferentes apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

3.4. Determinação da taxa de colonização fúngica

Após 90 dias de inoculação, foi avaliada a taxa de colonização das raízes das plantas de tomate pelo método de coloração de azul de tripano e visualizadas em microscópio (Figura 4). Os resultados mostraram uma taxa de colonização de 100%, tanto para o tratamento com o *S. indica*, quanto para o consórcio microbiano (*S. indica* + *H. seropedicae*).

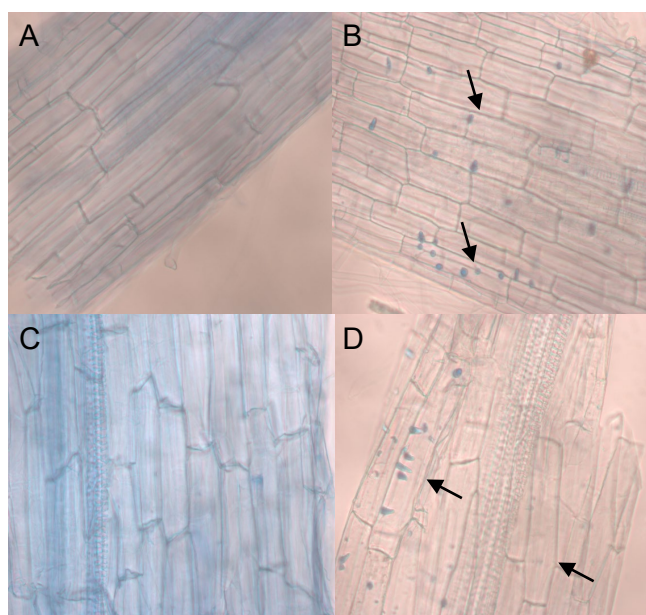


Figura 4: Micrografias representativas da colonização fúngica nas raízes de tomate não inoculadas (A), inoculadas com esferas de alginato de cálcio contendo: micélios fragmentados de *S. indica* (B) *H. seropedicae* (C) e o consórcio microbiano (*S. indica* + *H. seropedicae*). Setas apontam para os clamidósporos.

3.5. Conteúdo de macronutrientes

Os conteúdos dos macronutrientes, N, P, K, Ca e Mg, quantificados na parte aérea das plantas de tomate, estão apresentados na Tabela 1. Os resultados indicam que a inoculação foi capaz de promover um maior acúmulo de K nas plantas inoculadas com esferas contendo micélios fragmentados de *S. indica* e com o consórcio microbiano (*S. indica* + *H. seropedicae*) e Ca, nas plantas inoculadas com o consórcio microbiano.

A inoculação com os microrganismos não foi capaz de proporcionar aumento no conteúdo dos demais nutrientes analisados (N, P e Mg). No entanto, é possível observar diferença significativa em relação ao conteúdo de N, onde o tratamento

inoculado com as esferas contendo o consórcio de microrganismos apresentou menor conteúdo quando comparado aos demais. O conteúdo de P também apresentou diferença significativa entre os tratamentos em que os microrganismos foram inoculados, sendo maior conteúdo observado nas plantas inoculadas com o consórcio microbiano. O conteúdo de Mg permaneceu estatisticamente igual em todos os tratamentos.

Tabela 1. Conteúdo de nutrientes da parte aérea das plantas de tomate

Nutrientes		Tratamentos			
Macronutrientes		g kg ⁻¹			
		Não inoculadas	<i>S. indica</i>	<i>H. seropedicae</i>	<i>Si+Hs</i>
	N	87.40 A	86.5 A	89.47 A	71.60 B
	P	19.88 AB	17.77 B	18.59 B	21.99 A
	K	200.16 C	263.97 A	215.80 BC	243.34 AB
	Ca	129.53 B	120.64 B	130.14 B	150.73 A
	Mg	31.83 A	30.39 A	33.99 A	33.47 A

Os dados foram analisados por one-way ANOVA combinado com o teste de Tukey. Letras diferentes entre os tratamentos indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da inoculação de esferas de alginato de cálcio, contendo o fungo endofítico *S. indica* e a bactéria diazotrófica *H. seropedicae*, de forma isolada e em consórcio, sobre os parâmetros morfológicos e nutricionais de plantas de tomate.

Os inoculantes microbianos, elaborados a partir da forma isolada ou combinada de bactérias e/ou fungos, são alternativas promissoras para aumentar a produtividade e melhorar a qualidade, segurança alimentar e proporcionar sistemas agrícolas mais sustentáveis e ecológicos (Emmanuel e Babalola, 2020; Lopes et al., 2021).

Compreender a compatibilidade entre os microrganismos é um pré-requisito importante para o desenvolvimento de um consórcio microbiano, e a realização de ensaios *in vitro* são métodos preliminares de triagem utilizados para estabelecimento de possíveis associações (Athira e Anith, 2020). Algumas bactérias são capazes de impulsionar a colonização e crescimento de fungos endofíticos, sendo consideradas,

portanto, como bactérias auxiliares para o crescimento (del Barrio-Duque et al., 2020). No entanto, outras associações podem responder de forma neutra ou até mesmo antagonista, a depender da cepa utilizada e suas possíveis mutações (Varma et al, 2012).

Nesse estudo, foi possível observar que *H. seropedicae* atuou em efeito sinérgico ao fungo *S. indica*. A presença da bactéria estimulou o crescimento do fungo em 103% em relação ao controle, após 14 dias de inoculação.

S. indica hospeda a bactéria endofúngica *Rhizobium radiobacter* (Sharma et al., 2008), também conhecida por possuir propriedades benéficas para as espécies vegetais, atuando na promoção do crescimento e conferindo resistência a fungos e patógenos (Glaeser et al., 2016). Sabe-se que essa bactéria é capaz de sobreviver independentemente do seu hospedeiro, prosperando como endófito, formando assim uma simbiose facultativa com o fungo. Isso sugere que a interação entre o fungo e a bactéria pode não ser específica, e que outras bactérias também podem se associar ao fungo, ou até mesmo, ao invés de estimular o fungo, outras cepas poderiam estimular a atividade da bactéria endofúngica de *S. indica*, levando a um melhor crescimento (Glaeser et al., 2016; del Barrio-Duque et al. 2019). Nesse sentido, estudos envolvendo a associação de bactérias promotoras do crescimento vegetal com o fungo *S. indica* são conduzidos, a fim de aumentar ainda mais a aptidão fúngica e os efeitos positivos já relatados por esse microrganismo para as espécies vegetais (del Barrio-Duque et al. 2019; del Barrio-Duque et al. 2020).

Dabral et al., (2020), ao avaliarem a interação *in vitro* entre *S. indica* e *Azotobacter vinelandii*, constataram que a inoculação da bactéria, sete dias após a inoculação do fungo, resultou em maior estímulo no crescimento do fungo. Arora e Mishra (2016) observaram melhorias significativas no crescimento, teor de fósforo e nitrogênio, concentrações de pigmentos fotossintéticos, teor de artemisinina e padrão de expressões de genes, quando plantas de *Artemisia annua* L. foram inoculadas com *S. indica* e *Azotobacter chroococcum*.

Embora estudos mostrem que a utilização de combinações de bactérias com o fungo *S. indica* para produção de inóculos resultem em melhor desempenho das espécies vegetais, outros estudos indicam possíveis interações antagônicas entre os microrganismos (del Barrio-Duque et al. 2020). Potenciais espécies de bactérias, atualmente empregadas como agentes de biocontrole, como *Pseudomonas*

fluorescens, *Serratia spp.*, *Bacillus spp.* e *Burkholderia spp.*, foram avaliadas em associação ao fungo *S. indica*. No entanto, possivelmente devido às suas propriedades antifúngicas, a maioria delas atuou como inibidoras no crescimento do fungo (del Barrio-Duque et al. 2019).

Uma vez compreendidas às interações *in vitro*, a etapa seguinte consiste na elaboração do bioinoculante. A produção de bioinoculantes utilizando microrganismos, isolados ou em consórcio, na forma de células livres pode resultar em inúmeras desvantagens, principalmente associadas à viabilidade e estabilidade durante o processo de produção e armazenamento e redução repentina da população quando aplicados aos solos, devido à competição com a microbiota nativa (Pongsilp e Nimnoi, 2020). Assim, diversas formulações, compostas por agentes carreadores, são utilizados a fim de garantir maior sobrevivência através da imobilização dos microrganismos (Szopa et al., 2021).

Polímeros naturais, como o alginato de sódio, são atualmente os agentes carreadores mais utilizados em formulações por encapsulamento, por ser biodegradável, e capaz de oferecer proteção contra condições ambientais adversas, provendo uma liberação controlada dos microrganismos e facilitando o processo de colonização (Szopa et al., 2021).

Um parâmetro importante, e que determina a eficácia de imobilização de bactérias, é a eficiência de encapsulamento, que consiste na contagem do número de bactérias aprisionadas antes do encapsulamento e as bactérias livres, após etapa de polimerização (Cesari et al., 2020). Os resultados desse estudo mostraram que a técnica utilizada para preparo das esferas, assim como a concentração inicial de alginato de sódio (4%) e do agente de reticulação (CaCl_2 0,7M), foram satisfatórias para conseguir uma alta taxa de encapsulamento, de 99,99%. Wu et al., (2020) relataram variações de 69,32% a 97,46% na eficiência de encapsulamento de *Pseudomonas putida*, quando a concentração de alginato de sódio aumentou de 0,5% para 1,5%. Além disso, o número de células imobilizadas na matriz de alginato de cálcio, de 10^9 UFC/mL foi considerado satisfatório para aplicação como bioinoculante, considerando que uma concentração ideal pode variar de 10^5 a 10^9 UFC/mL (Cesari et al., 2020).

A biomassa vegetal é uma das características morfológicas mais importantes que reflete o desempenho da planta sob condições adversas e a eficiência da

simbiose com microrganismos (Ghorbani et al., 2019). Um aumento de 20% até 100% no peso fresco de plantas inoculadas com *S. indica* foi relatado por alguns autores (Fakhro et al., 2010). Resultados semelhantes foram obtidos nesse estudo, onde foi observado um aumento de 20% no peso fresco na parte aérea das plantas de tomate inoculadas com esferas contendo micélios fragmentados do fungo *S. indica* e do consórcio microbiano (*S. indica* + *H. seropedicae*), quando comparado ao controle, indicando, nesse caso, que o fungo pode ter exercido maior influência para o aumento da biomassa vegetal.

Para os demais parâmetros analisados, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos, exceto para o peso fresco das raízes, onde os tratamentos que receberam os microrganismos resultaram em menor peso, quando comparados ao tratamento controle. Ao contrário dos nossos estudos, inoculação de plantas de tomate, com *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis* e *S. indica*, de forma isolada e em consórcio, resultou em aumento significativo nos parâmetros de crescimento da espécie vegetal (Athira e Anith, 2020).

Apesar da alta taxa de colonização, observada tanto nas raízes das plantas inoculadas com o fungo *S. indica* de forma isolada, quanto em consórcio com a bactéria *H. seropedicae*, não foi possível observar um aumento nos parâmetros analisados. Fakhro et al., (2010), encontraram evidências que os efeitos da inoculação de *S. indica* não se devem simplesmente a extensão da colonização, mas também às condições experimentais, principalmente em relação à concentração inicial do inóculo, estágio de desenvolvimento da planta e do meio em que o fungo foi cultivado.

A utilização de bactérias e fungos promotores do crescimento vegetal constitui um dos métodos mais comuns de fertilização biológica (Daniel et al., 2022). No entanto, os mecanismos que permitem que os microrganismos tenham um efeito sinérgico quando aplicados às espécies vegetais são complexos. Sabe-se que o efeito dessa interação na promoção do crescimento vegetal está diretamente relacionado à natureza dos microrganismos e a interação entre eles, além do genótipo da planta e da composição de nutrientes do solo (Santoyo et al., 2021).

Além de ser um macronutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento vegetal, atuando como componente estrutural de membranas e paredes celulares (Thor, 2019), o Ca^{2+} é considerado também como o segundo

principal mensageiro celular. A cascata de sinalização do Ca^{2+} desempenha um papel importante na regulação de uma ampla gama de processos biológicos na fisiologia eucariótica, incluindo interação patogênica e benéficas entre a planta e os microrganismos (Vadassery & Oelmüller, 2009). Neste estudo, o maior conteúdo de Ca^{2+} , observado na parte aérea das plantas inoculadas com o consórcio microbiano (*S. indica* + *H. seropedicae*), poderia ser resultado de uma maior interação e adaptação entre os microrganismos inoculados e a espécie vegetal.

O K é um macronutriente que se move facilmente entre os diferentes órgãos da planta, e está envolvido em diversas funções metabólicas, como ativação enzimática, síntese protéica, translocação de metabólitos e manutenção do equilíbrio osmótico (Ray et al., 2020). Apesar de poucos estudos relatarem os benefícios da associação simbiótica na indução da expressão gênica, capazes de ativar transportadores de K^+ na planta hospedeira (Garcia e Zimmermann 2014), os resultados obtidos nesse estudo mostram que tanto as plantas inoculadas com o fungo *S. indica* de forma isolada, quanto em consórcio (*S. indica* + *H. seropedicae*), apresentaram maior acúmulo de K na parte aérea, quando comparado às plantas não inoculadas. No entanto, também é possível observar que não houve diferença significativa no conteúdo de K quando o fungo foi inoculado de forma isolada ou em consórcio com a bactéria *H. seropedicae*. Diante desses resultados, pode-se sugerir que a maior absorção do nutriente esteja diretamente relacionada à presença do fungo *S. indica*.

O P é um macronutriente essencial, geralmente encontrado complexado com cátions (Ca, Al, Fe e Mg), formando precipitados insolúveis, indisponíveis para serem absorvidos diretamente pelas espécies vegetais (Mónica et al., 2019). Para lidar com as limitações desse nutriente, as plantas desenvolveram estratégias para aumentar a eficiência de absorção, que envolvem a extensa ramificação radicular, aumento no comprimento dos pêlos radiculares, solubilização do P inorgânico através da secreção de ácidos orgânicos e fosfatases, e/ou interação simbiótica mutualística com microrganismos dos solos (Hart et al., 2014; Ferrol et al., 2019).

Até o momento, os benefícios da inoculação do fungo *S. indica* para a espécies vegetais, em relação ao aumento no conteúdo de P, é controverso e precisa ser melhor investigado (Hallasgo et al., 2020). Alguns autores relataram aumento no conteúdo de P em espécies vegetais após inoculação do fungo *S.*

indica, cujos mecanismos poderiam incluir a redução do pH, através da produção de ácidos orgânicos, e estimulação da atividade das enzimas fosfatases, responsáveis pela solubilização do fosfato inorgânico e de genes transportadores de alta afinidade, principalmente em condições de restrição de P (Swetha e Padmavathi, 2016; Wu et al., 2018). No entanto, esse efeito não foi observado por outros autores (Hallasgo et al., 2020), que assim como os resultados obtidos nesse estudo, não verificaram aumento no conteúdo do nutriente em plantas de tomate após inoculação com *S. indica*.

Estudos focados no efeito combinatório de *S. indica* e potenciais bactérias solubilizadoras de fosfato estão sendo realizados atualmente (del Barrio-Duque et al., 2019). Estrada et al., (2013), mostram que espécies de bactérias do gênero *Herbaspirillum*, conhecidas por fixarem N, foram capazes de solubilizar fosfato inorgânico e promover um aumento na produtividade de plantas de arroz cultivadas na presença de fosfato tricálcico. Artursson et al., (2006) verificaram que em solos com baixa biodisponibilidade de P, as bactérias solubilizadoras têm um papel significativo no apoio à simbiose fúngica, através da liberação de íons de fosfato, a partir de compostos orgânicos e inorgânicos pouco solúveis, contribuindo para o aumento do reservatório de P nos solos, tornando-os acessíveis para as hifas fúngicas e posteriormente para absorção pelas raízes das plantas, o que justifica maior conteúdo do nutriente observado nas raízes das plantas inoculadas com o consórcio microbiano.

Alguns microrganismos diazotróficos, incluindo *H. seropedicae*, podem colonizar as raízes, caule e folhas de certas espécies vegetais, apresentando efeitos benéficos, atribuídos à fixação biológica de nitrogênio e à produção de hormônios vegetais, resultando em maior crescimento e desenvolvimento das raízes, devido à maior absorção de água e nutrientes (Hoseinzade et al., 2016).

Os resultados desse estudo mostram que a inoculação com os microrganismos não foi capaz de proporcionar um aumento no conteúdo de N na parte aérea das plantas de tomate. No entanto, uma diferença significativa no conteúdo do nutriente foi observada entre as plantas inoculadas com os microrganismos de forma isolada e com o consórcio microbiano, sendo estas, responsáveis por maior conteúdo. Resultados semelhantes a este estudo foram obtidos por da Cunha et al., (2022), ao avaliarem a influência da inoculação de *H.*

seropedicae em plantas de milho. Eles verificaram que, apesar da inoculação ter resultado em aumento da biomassa das raízes, não foi observado aumento no conteúdo N. da Fonseca Breda et al., (2019) também observaram que a inoculação com *H. Seropedicae* não proporcionou diferenças significativas no acúmulo de N nas folhas de milho em relação às plantas controle. No entanto, quando altos níveis do nutriente foram empregados, uma maior acúmulo foi observado. Esses autores também observaram um aumento na biomassa seca das raízes e folhas, indicando que o efeito da promoção do crescimento nessas associações está mais relacionado à estimulação hormonal do que à fixação biológica de N.

Estudos mostram que devido à baixa difusibilidade das moléculas de N orgânico nos solos, os microrganismos assimilam primeiramente e posteriormente é assimilado pelas plantas (Jacoby et al., 2017). Assim, acredita-se que a maior densidade de microrganismos encontrada no consórcio microbiano tenha de certa forma, influenciado na absorção do nutriente pelas plantas.

O magnésio (Mg^{2+}) é um macronutriente bivalente, crucial na síntese de clorofila e produção de proteínas nas espécies vegetais (Tang et al., 2023). Apesar de já ter sido documentado que *S. indica* aumenta a absorção de Mg^{2+} em espécies vegetais, devido à presença do transportador de magnésio PiMgT1, principalmente em condições limitadas do nutriente (Prasad et al., 2019), os resultados desse estudo indicam que a presença do microrganismo não foi capaz de aumentar o conteúdo do nutriente na parte aérea das plantas de tomate nos tratamentos em que foi inoculado. A inoculação da bactéria também não proporcionou maior conteúdo do nutriente nas plantas inoculadas. Resultados semelhantes foram obtidos por Baldoto et al., (2012), ao inocular *Herbaspirillum seropedicae* em plantas de milho, não observou maior acúmulo do nutriente.

Apesar dos ensaios *in vitro* indicarem uma associação benéfica e sinérgica entre a bactéria *H. seropedicae* e o fungo *S. indica*, quando avaliados *in vivo*, não resultaram em aumentos morfológicos e aportes nutricionais significativos na parte aérea das plantas de tomate. Uma possível hipótese seria que, no presente caso, as condições experimentais controladas (sem indução de estresse) e a disponibilidade limitada de nutrientes, influenciaram na baixa efetividade dos inóculos, uma vez que os efeitos proporcionados pelos microrganismos promotores do crescimento vegetal

normalmente são potencializados em condições desfavoráveis ou estressantes (Al-Garni et al., 2019).

Além disso, como os vasos possuem pequenos volumes de substrato, os microrganismos adicionados se encontram protegidos e em condições ideais para estabelecimento das interações microrganismo-planta. Assim, os efeitos benéficos da inoculação com os microrganismos podem ser limitados, mais pela potencial resposta das plantas hospedeiras do que pelas propriedades de promoção de crescimento do inoculante (Bradacová et al., 2019).

5. CONCLUSÕES

Embora a hipótese inicial desse estudo sugerisse que a inoculação dos microrganismos nas plantas de tomate, tanto de forma isolada quanto em consórcio, resultaria maior desenvolvimento das plantas e sua saúde nutricional, os resultados obtidos não corroboram plenamente essa expectativa.

Esses resultados não significativos podem ser atribuídos a uma série de fatores, incluindo a interação complexa entre os microrganismos e o ambiente específico em que as plantas foram cultivadas, a composição do solo, condições climáticas e até mesmo a resposta variável das plantas às diferentes cepas.

É importante ressaltar que, apesar dos resultados obtidos neste estudo não terem apresentado grandes diferenças significativas, não invalida a importância dos microrganismos promotores do crescimento vegetal. Ao contrário, eles contribuem para o conhecimento científico, destacando a complexidade das interações entre os microrganismos e plantas e abrindo espaço para pesquisas mais aprofundada.

Assim, a exploração de novas combinações de microrganismos, ajustes nas condições de cultivo e condições experimentais, a fim de obter uma abordagem mais detalhada deve ser direcionada, a fim de compreender plenamente o potencial desses microrganismos na promoção do crescimento de diferentes espécies vegetais.

6. REFERÊNCIAS

- Al-Garni SMS, Mohibul MD, Khan A, Bahieldin A (2019) Plant growth-promoting bacteria and silicon fertilizer enhance plant growth and salinity tolerance in *Coriandrum sativum*. *Journal of Plant Interactions* 14(1):386-396. <http://doi.gov/10.1080/17429145.2019.1641635>
- Ali A, Ghani MI, Elrys AS, Ding H, Iqbal M, Cheng Z, Cai Z (2021) Different cropping systems regulate the metabolic capabilities and potential ecological functions altered by soil microbiome structure in the plastic shed mono-cropped cucumber Rhizosphere. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 318. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2021.107486>
- Arora NK, Mishra J (2016) Prospecting the roles of metabolites and additives in future bioformulations for sustainable agriculture. *Applied Soil Ecology* 107:405-407. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.05.020>
- Artursson V, Finlay RD, Jansson JK (2006) Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental Microbiology* 8(1):1–10. <http://doi.gov/10.1111/j.1462-2920.2005.00942.x>
- Athira S, Anith KN (2020) Plant growth promotion and suppression of bacterial wilt incidence in tomato by rhizobacteria, bacterial endophytes and the root endophytic fungus *Piriformospora indica*. *Indian Phytopathology* 73:629–642 <https://doi.org/10.1007/s42360-020-00283-2>
- Baldotto MA, Baldotto LEB, Santana RB, Marciano CR (2012) Initial performance of maize in response to NPK fertilization combined with *Herbaspirillum seropedicae*. *Revista Ceres* 59(6):841-849.
- Basu A, Prasad P, Das SN, Kalam S, Sayyed RZ, Reddy MS, El Enshasy H (2021) Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) as Green Bioinoculants: Recent Developments, Constraints, and Prospects. *Sustainability* 13:1140. <https://doi.org/10.3390/su13031140>
- Bradáčová K, Florea AS, Bar-Tal A, Minz D, Yermiyahu U, Shawahna R, Kraut-Cohen J, Zolti A, Erel R, Dietel K, Weinmann M, Zimmermann B, Berger N, Ludewig U, Neumann G, Posta G (2019) Microbial Consortia versus Single-Strain Inoculants: An Advantage in PGPM-Assisted Tomato Production? *Agronomy* 9(2):105. <https://doi.org/10.3390/agronomy9020105>
- Buller S, Inglis D, Miles C (2013) Plant Growth, Fruit Yield and Quality, and Tolerance to Verticillium Wilt of Grafted Watermelon and Tomato in Field Production in the Pacific Northwest. *Hortscience* 48(8):1003–1009. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.48.8.1003>

Caruso AG, Bertacca S, Parrella G, Rizzo R, Davino S, Panno S (2022) Tomato brown rugose fruit virus: A pathogen that is changing the tomato production worldwide. *Annals of Applied Biology* 181:258-274. <https://doi.org/10.1111/aab.12788>

Cesari AB, Paulucci NS, Yslas EI, Dardanelli MS (2020) Immobilization of Bradyrhizobium and Azospirillum in alginate matrix for long time of storage maintains cell viability and interaction with peanut. *Applied Microbiology and Biotechnology* 104:10145–10164. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10910-7>

Chaudhary T, Dixit M, Gera R, Shukla AK, Prakash A, Gupta G, Shukla P (2020) Techniques for improving formulations of bioinoculants. *3 Biotech* 10:199. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02182-9>

Chen H, Zhao J, Jiang J, Zhao Z, Guan Z, Chen S, Chen F, Fang W, Zhao S (2021) Effects of Inorganic, Organic and Bio-Organic Fertilizer on Growth, Rhizosphere Soil Microflora and Soil Function Sustainability in Chrysanthemum Monoculture. *Agriculture* 11:1214. <https://doi.org/10.3390/agriculture11121214>

Clark R (1997) Arbuscular mycorrhizal adaptation, spore germination, root colonization, and host plant growth and mineral acquisition at low pH. *Plant and Soil* 192:15–22. <https://doi.org/10.1023/A:1004218915413>

da Cunha ET, Pedrolo AM, Bueno JCF, Pereira TP, Soares CRFS, Arisi ACM (2022) Inoculation of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 increases biomass in maize roots DKB 390 variety in the early stages of plant development. *Archives of Microbiology* 204:373. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02986-8>

da Fonseca Breda FA, da Silva TFR, dos Santos SG, Alves GC, Reis VM (2019) Modulation of nitrogen metabolism of maize plants inoculated with *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae*. *Archives of Microbiology* 201:547–558. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1594-z>

Dabral S, Saxena SC, Choudhary DK, Bandyopadhyay P, Sahoo RK, Tuteja N, Nath M (2020) Synergistic inoculation of *Azotobacter vinelandii* and *Serendipita indica* augmented rice growth. *Symbiosis* 81:139–148. <https://doi.org/10.1007/s13199-020-00689-6>

Dang K, Ji L, Slaughter LC, Hou J, Shen M, Li J, Dong Y (2021) Synergistic changes of rhizosphere bacterial community and soil properties in greenhouse soils under long-term tomato monoculture. *Applied Soil Ecology* 183. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2022.104738>

Daniel AI, Fadaka AO, Gokul A, Bakare OO, Aina O, Fisher S, Burt AF, Mavumengwana V, Keyster M, Klein A (2022) Biofertilizer: The Future of Food Security and Food Safety. *Microorganisms* 10(6):1220. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061220>

De Corato U, Patruno L, Avella N, Salimbeni R, Lacolla G, Cucci G, Crecchio C (2020) Soil management under tomato-wheat rotation increases the suppressive response against *Fusarium* wilt and tomato shoot growth by changing the microbial composition and chemical parameters. *Applied Soil Ecology* 154. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103601>

del Barrio-Duque A, Ley J, Samad A, Antonielli L, Sessitsch A and Compant S (2019) Beneficial Endophytic Bacteria-*Serendipita indica* Interaction for Crop Enhancement and Resistance to Phytopathogens. *Frontiers in Microbiology* 10:2888. <http://doi.gov/10.3389/fmicb.2019.02888>

del Barrio-Duque A, Samad A, Nybroe O, Antonielli L, Sessitsch A, Compant S (2020). Interaction between endophytic Proteobacteria strains and *Serendipita indica* enhances biocontrol activity against fungal pathogens. *Plant and Soil* 451:277–305. <https://doi.org/10.1007/s11104-020-04512-5>

del Barrio-Duque A, Samad A, Nybroe O, Antonielli L, Sessitsch A, Compant S (2020) Interaction between endophytic Proteobacteria strains and *Serendipita indica* enhances biocontrol activity against fungal pathogens. *Plant Soil* 451:277–305. <https://doi.org/10.1007/s11104-020-04512-5>

Emmanuel OC, Babalola OO (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>

Estrada GA, Baldani VLD, de Oliveira DM, Urquiaga, Baldani JI (2013) Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. *Plant and Soil* 369:115–129. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1550-7>

Fakhro A, Andrade-Linares DR, von Barga S, Bandte M, Büttner C, Grosch R, Schwarz D, Franken P (2010) Impact of *Piriformospora indica* on tomato growth and on interaction with fungal and viral pathogens. *Mycorrhiza* 20(3):191-200. <http://doi.gov/10.1007/s00572-009-0279-5>

Ferrol N, Azcón-Aguilar C, Pérez-Tienda J (2019) Review: Arbuscular mycorrhizas as key players in sustainable plant phosphorus acquisition: An overview on the mechanisms involved. *Plant Science* 280:441-447. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.11.011>

Food and Agriculture Organization of United Nations FAO (2023) FAOSTAT – Crops and livestock products. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>. Acesso em 23 de outubro de 2023.

Fu H, Zhang G, Zhang F, Sun Z, Geng G, Li T (2017) Effects of Continuous Tomato Monoculture on Soil Microbial Properties and Enzyme Activities in a Solar Greenhouse. *Sustainability* 9:317. <https://doi.org/10.3390/su9020317>

Garcia, K Zimmermann SD (2014) The role of mycorrhizal associations in plant potassium nutrition. *Frontiers in Plant Science* 4:337. <http://doi.gov/10.3389/fpls.2014.00337>

Ghorbani A, Omran VOG, Razavi SM, Pirdashti H, Ranjbar M (2019) *Piriformospora indica* confers salinity tolerance on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) through amelioration of nutrient accumulation, K⁺/Na⁺ homeostasis and water status. *Plant Cell Reports* 38:1151–1163. <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02434-w>

Gill SS, Gill R, Trivedi DK, Anjum NA, Sharma KK, Ansari MW, Ansari AA, Johri AK, Prasad R, Pereira E, Varma A and Tuteja N (2016) *Piriformospora indica*: Potential and Significance in Plant Stress Tolerance. *Frontiers in Microbiology* 7:332. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00332>

Glaeser SP, Imani J, Alabid I, Guo H, Kumar N, Kämpfer P, Hardt M, Blom J, Goesmann A, Rothballer M, Hartmann A, Kogel K-H (2016) Non-pathogenic *Rhizobium radiobacter* F4 deploys plant beneficial activity independent of its host *Piriformospora indica*. *The ISME Journal* 10:871-884. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.163>

Hallasgo AM, Spangl B, Steinkellner S, Hage-Ahmed K (2020) The Fungal Endophyte *Serendipita williamsii* Does Not Affect Phosphorus Status But Carbon and Nitrogen Dynamics in Arbuscular Mycorrhizal Tomato Plants. *Journal of Fungi* 6:233. <http://doi.gov/10.3390/jof6040233>

Hart M, Ehret DL, Krumbein A, Leung C, Murch S, Turi C, Franken P (2015) Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi improves the nutritional value of tomatoes. *Mycorrhiza* 25:359-376. <http://doi.gov/10.1007/s00572-014-0617-0>

He Y, Wu Z, Tu L, Han Y, Zhang G, Li C (2015) Encapsulation and characterization of slow-release microbial fertilizer from the composites of bentonite and alginate. *Applied Clay Science* 109–110:68–75. <https://doi.org/10.1016/J.CLAY.2015.02.001>

Hill TW, Kafer E (2001) Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace element and minimal medium salt stock solutions. *Fungal Genetics Reports* 48, 20–21. <http://doi.gov/10.4148/1941-4765.1173>

Hoseinzade H, Ardakani MR, Shahdi A, Rahmani AH, Noormohammadi G, Miransari M (2016) Rice (*Oryza sativa* L.) nutrient management using mycorrhizal fungi and endophytic *Herbaspirillum seropedicae*. *Journal of Integrative Agriculture* 15(6):1385-1394. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61241-2](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61241-2)

Irineu LESS, Soare, CP, Soares TS, Almeida FA, Almeida-Silva F, Gazara RK, Meneses CHSG, Canellas LP, Silveira V, Venancio TM, Olivares (2022) Multiomic Approaches Reveal Hormonal Modulation and Nitrogen Uptake and Assimilation in the Initial Growth of Maize Inoculated with *Herbaspirillum seropedicae*. *Plants* 12:48. <https://doi.org/10.3390/plants12010048>

Jackson M L. Soil chemical analysis, 2nd edn. Prentice Hall, New Jersey, 1965.

Jacoby R, Peukert M, Succurro A, Koprivova A, Kopriva S (2017) The Role of Soil Microorganisms in Plant Mineral Nutrition—Current Knowledge and Future Directions. *Frontiers in Plant Science* 8:1617. <http://doi.gov/10.3389/fpls.2017.01617>

Lopes MJS, Dias-Filho MB and Gurgel ESC (2021) Successful Plant Growth-Promoting Microbes: Inoculation Methods and Abiotic Factors. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 5:606454. <http://doi.gov/10.3389/fsufs.2021.606454>

Oladokun JO, Halabi MH, Barua P, Nath PD (2019) Tomato brown rugose fruit disease: current distribution, knowledge and future prospects. *Plant Pathology* 68:1579–1586. <https://doi.org/10.1111/ppa.13096>

Olivares FL, Baldani VLD, Reis VM, Baldani JI, Dobereiner J (1996) Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum spp.* in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. *Biology and Fertility of Soils* 21:197-200. <https://doi.org/10.1007/BF00335935>

Paixão M, Mônico A, Hoffay A, Correa A, Schmildt E (2018) Ácido giberélico na germinação de sementes de mamão. *Anais do VII Simpósio do Papaya Brasileiro*.

Peters JB (2005) Wisconsin Procedures for Soil Testing, Plant Analysis and Feed & Forage Analysis: Plant Analysis. Department of Soil Science, College of Agriculture and Life Sciences, University of Wisconsin-Extension, Madison, W.I.

Pongsilp N, Nimnoi P (2020) Inoculation of *Ensifer fredii* strain LP2/20 immobilized in agar results in growth promotion and alteration of bacterial community structure of Chinese kale planted soil. *Scientific Reports* 10:15857. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72986-5>

Prasad D, Verma N, Bakshi M, Narayan OP, Singh AK, Dua M, Johri AK (2019) Functional Characterization of a Magnesium Transporter of Root Endophytic Fungus *Piriformospora indica*. *Frontiers in Microbiology* 9:3231. <http://doi.gov/10.3389/fmicb.2018.03231>

Ray K, Banerjee H, Dutta S, Sarkar S, Murrell TS, Singh VK, Majumdar K (2020) Macronutrient Management Effects on Nutrient Accumulation, Partitioning, Remobilization, and Yield of Hybrid Maize Cultivars. *Frontiers in Plant Science* 11:1307. <http://doi.gov/10.3389/fpls.2020.01307>

Reetha D, Kumaresan G, John MD (2014) Studies to improve the shelf life of *Azospirillum lipoferum* immobilized in alginate beads. *International Journal of Recent Scientific Research* 5(12):2178-2182.

Rodrigues LS, Kasuya MCM, Borges AC (1999) Viability of ectomycorrhizal fungus mycelium entrapped in calcium alginate gel. *Mycorrhiza* 8:263–266. <https://doi.org/10.1007/s005720050243>

Rojas-Sánchez B, Guzmán-Guzmán P, Morales-Cedeño LR, Orozco-Mosqueda MC, Saucedo-Martínez BC, Sánchez-Yáñez JM, Fadiji AE, Babalola OO, Glick BR, Santoyo G (2022) Bioencapsulation of Microbial Inoculants: Mechanisms, Formulation Types and Application Techniques. *Applied Bioscience* 1:198–220. <https://doi.org/10.3390/applbiosci1020013>

Santoyo G, Guzmán-Guzmán P, Parra-Cota FI, Santos-Villalobos SI, Orozco-Mosqueda MC, Glick BR (2021) Plant Growth Stimulation by Microbial Consortia. *Agronomy* 11:219. <https://doi.org/10.3390/agronomy11020219>

Sharma M, Schmid M, Rothballer M, Hause G, Zuccaro A, Imani J, Kämpfer P, Domann E, Schäfer P, Hartmann A, Kogel K-H (2008) Detection and identification of bacteria intimately associated with fungi of the order *Sebacinales*. *Cellular Microbiology* 10(11):2235–2246. <http://doi.gov/10.1111/j.1462-5822.2008.01202.x>

Sharma N, Dabral S, Tyagi J, Yadav G, Aggarwal H, Joshi NC, Varma A, Koul M, Choudhary DK and Mishra A (2023) Interaction studies of *Serendipita indica* and *Zhihengliuella* sp. ISTPL4 and their synergistic role in growth promotion in rice. *Frontiers in Plant Science* 14:1155715. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1155715>

Swetha S, Padmavathi T (2016) Study of Acid Phosphatase in Solubilization of Inorganic Phosphates by *Piriformospora indica*. *Polish Journal of Microbiology* 1(4):407–412.

Szopa D, Mielczarek M, Skrzypczak D, Izydorczyk G, Mikula K, Chojnacka K, Witek-Krowiak A (2022) Encapsulation efficiency and survival of plant growth-promoting microorganisms in an alginate-based matrix – A systematic review and protocol for a practical approach. *Industrial Crops and Products* 181:114846. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114846>

Tang L, Xiao L, Chen E, Lei X, Ren J, Yang Y, Xiao B, Gong C (2023) The magnesium transporter CsMGT10 from tea plants plays a key role in the greening of leaf veins in chlorosis. *Plant Physiology and Biochemistry* 201:107842. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.107842>

Thor K (2019) Calcium—Nutrient and Messenger. *Frontiers in Plant Science* 10:440. <http://doi.gov/10.3389/fpls.2019.00440>

Vadassery J, Ranf S, Drzewiecki¹ C, Mithofer A, Mazars C, Scheel D, Lee J, Oelmuller R (2009) A cell wall extract from the endophytic fungus *Piriformospora indica* promotes growth of *Arabidopsis* seedlings and induces intracellular calcium elevation in roots. The Plant Journal 59:193–206. <http://doi.gov/10.1111/j.1365-313X.2009.03867.x>

Varma A, Bakshi M, Lou B, Hartmann A, Oelmueller R (2012) Piriformospora indica: A Novel Plant Growth-Promoting Mycorrhizal Fungus. Agricultural Research 1:117-131. <https://doi.org/10.1007/s40003-012-0019-5>

Verma S, Varma A, Rexer KH, Hassel A, Kost G, Sarbhoy A, Bisen P, Britta Bütehorn B, Franken P (1998) *Piriformospora indica*, gen. et sp. nov., a new rootcolonizing fungus. Mycologia 90(5):896-903. <https://doi.org/10.1080/00275514.1998.12026983>

Wu L, Chen J, Wu H, Qin X, Wang J, Wu Y, Khan MU, Lin S, Xiao Z, Luo X, Zhang Z and Lin W (2016) Insights into the Regulation of Rhizosphere Bacterial Communities by Application of Bio-organic Fertilizer in Pseudostellaria heterophylla Monoculture Regime. Frontiers in Microbiology 7:1788. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01788>

Wu M, Wei Q, Xu L, Li H, Oelmuller R, Zhang W (2018) *Piriformospora indica* enhances phosphorus absorption by stimulating acid phosphatase activities and organic acid accumulation in *Brassica napus*. Plant and Soil 432:333–344. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3795-2>

Wu Z, Li X, Liu X, Dong J, Fan D, Xu X, He Y (2020) Membrane shell permeability of Rs-198 microcapsules and their ability for growth promoting bioactivity compound releasing. RSC Advances 10:1159. <http://doi.gov/10.1039/c9ra06935f>

Zhang H, Ding W, He X, Yu H, Fan J, Liu D (2014) Influence of 20–Year Organic and Inorganic Fertilization on Organic Carbon Accumulation and Microbial Community Structure of Aggregates in an Intensively Cultivated Sandy Loam Soil. Plos One 9(3): e92733. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092733>