

ENCAPSULAÇÃO DE *Herbaspirillum seropedicae* EM ALGINATO PROMOVE SUA
SOBREVIVÊNCIA E EFICIÊNCIA DE INOCULAÇÃO EM MILHO

IGOR DE OLIVEIRA PAIVA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
OUTUBRO – 2025

ENCAPSULAÇÃO DE *Herbaspirillum seropedicae* EM ALGINATO PROMOVE SUA
SOBREVIVÊNCIA E EFICIÊNCIA DE INOCULAÇÃO EM MILHO

IGOR DE OLIVEIRA PAIVA

“Dissertação apresentada ao Centro de
Ciências e Tecnologias Agropecuárias da
Universidade Estadual do Norte Fluminense
Darcy Ribeiro, como parte das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Produção Vegetal”

Orientador: Prof. Luciano Pasqualoto Canellas

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
OUTUBRO - 2025

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

P149

Paiva, Igor de Oliveira.

ENCAPSULAÇÃO DE *Herbaspirillum seropedicae* EM ALGINATO PROMOVE SUA SOBREVIVÊNCIA E EFICIÊNCIA DE INOCULAÇÃO EM MILHO / Igor de Oliveira Paiva. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2026.

90 f. : il.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2026.
Orientador: Luciano Pasqualoto Canellas.

1. Bactérias promotoras do crescimento vegetal. 2. Substâncias húmicas. 3. Atividade enzimática. 4. Sinalização molecular. 5. Inoculante microbiano. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

ENCAPSULAÇÃO DE *Herbaspirillum seropedicae* EM ALGINATO PROMOVE SUA SOBREVIVÊNCIA E EFICIÊNCIA DE INOCULAÇÃO EM MILHO

IGOR DE OLIVEIRA PAIVA

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal”

Aprovada em 31 de outubro de 2025

Comissão examinadora:

Prof. Fábio Lopes Olivares (Ph. D., Ciência do Solo) – UENF

Pesq. Dariellys Martínez Balmori (D. Sc., Produção Vegetal) – UENF

Prof. Eduardo de Sá Mendonça (Ph. D., Ciência do Solo) – UFES

Prof. Luciano Pasqualoto Canellas (Ph.D., Ciência do Solo) – UENF
Orientador

A Deus, que me deu saúde e
força; aos meus pais, Mauricio e
Léa; e a minha amada noiva Ana
Lucia.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus pela vida, proteção, oportunidades e por estar sempre ao meu lado, dando-me forças em todos os momentos dessa jornada;

Ao meu pai, Mauricio Paiva, por ser minha inspiração acadêmica e à minha mãe, Léa de Oliveira Paiva, por ser colo e carinho em todos os momentos em que precisei. Juntos, são meu exemplo pessoal de humildade, dedicação, responsabilidade e compromisso, despertando em mim o desejo de ser uma pessoa melhor. Foram um alicerce durante toda a minha vida, e não há como expressar o amor, o respeito, o carinho e a admiração que sinto por vocês. **ESSA CONQUISTA É NOSSA!**

À minha noiva, Ana Lucia Rangel de Souza, por ter sempre me apoiado, ajudado, incentivado, por acreditar e apostar em mim e nas minhas conquistas. Agradeço pela paciência, por toda a cumplicidade, companheirismo, amizade, apoio e conversas de incentivo, sendo uma pessoa que sempre me fez crescer profissionalmente e pessoalmente. **ESSA CONQUISTA É NOSSA!**

Ao meu orientador, Professor Luciano Pasqualoto Canellas, e ao coorientador, Fábio Lopes Olivares, pela receptibilidade, dedicação, aprendizado, sugestões e as valiosas lições transmitidas no decorrer dos dois anos de parceria de pesquisa;

Em especial, agradeço também às companheiras de pesquisa, Gabriela Petroceli Mota, Rakiely Martins da Silva, Sara Sangi Miranda e Dariellys Martínez Balori, pela parceria e disposição em ajudar na condução dos experimentos e das análises, por todos os direcionamentos, ensinamentos, sugestões, críticas, companheirismo e conversas de motivação na hora do café “Vai um cafezin”, desde o início de minha participação no laboratório;

Aos meus amigos do Núcleo de Desenvolvimento de Insumos Biológicos para Agricultura (NUDIBA), Fabiano da Conceição Braz de Oliveira Junior, Fernando Soares Sales e Lucas José da Silva Barbosa, pelo companheirismo, conversas e pela disposição em ajudar na condução dos experimentos;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) pela oportunidade de cursar um programa de excelência e pelo suporte oferecido na infraestrutura e nas instalações necessárias à realização deste trabalho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo apoio financeiro e pelas bolsas concedidas (Processo CAPES nº 88887.903297/2023-00), que possibilitaram a execução deste estudo;

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação acadêmica e sempre torceram pelo meu sucesso profissional.

SUMÁRIO

RESUMO.....	X
ABSTRACT.....	XII
INTRODUÇÃO	14
REVISÃO DE LITERATURA	18
Bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV)	18
Encapsulação de BPCV	21
Matriz de encapsulação: alginatos	23
Substâncias Húmicas	25
MATERIAL E MÉTODOS	29
Crescimento bacteriano e preparo do inoculante	29
Obtenção e caracterização das substâncias húmicas.....	30
Método de encapsulação.....	32
Teste de eficiência de encapsulação.....	32
Estabilidade de sobrevivência das células bacterianas encapsuladas	34
Ensaio com plantas – avaliação do crescimento de milho	34
Microscopia eletrônica de fluorescência	37
Confirmação molecular da presença de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	37
Atividade enzimática da nitrato redutase e malato desidrogenase	38
Nível de transcrição diferencial de genes com RT - qPCR.....	38
Análise Estatística.....	41
RESULTADOS.....	43
Aspectos morfológicos e eficiência de encapsulação	43
Sobrevivência das células bacterianas encapsuladas	45
Detecção da estirpe RAM10 por microscopia de fluorescência em raízes e quantificação molecular de <i>H. seropedicae</i>	48
Parâmetros biométricos e atividade enzimática da nitrato redutase e da malato desidrogenase	54
Nível de transcrição diferencial dos genes avaliados	57
DISCUSSÃO	60
CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Blocos repetitivos de ácido β -D-manurônico (M), α -L-gulurônico (G) e de ácido β -D-manurônico- α -L-gulurônico (MG) no ácido algínico. Adaptado de Prasad e Kadokawa (2009).

Figura 2. Espectro de RMN ^{13}C CP/MAS de substâncias húmicas (SH) derivadas de turfa fornecida como extrato húmico comercial bruto pela DNAgro Biotechnology.

Figura 3. Características visuais das cápsulas de alginato contendo *H. seropedicae* estirpe RAM10 enriquecidas com diferentes concentrações de substâncias húmicas antes e após a desidratação. (A, E) Hbs-0, (B, F) Hbs-50, (C, G) Hbs-100, (D, H) Hbs-150. Hbs-0, Hbs-50, Hbs-100 e Hbs-150 representam as cápsulas enriquecidas com 0, 50, 100 e 150 mg de C L^{-1} de substâncias húmicas. As imagens foram obtidas com câmera integrada de um smartphone (iPhone 15, Apple) sob iluminação laboratorial.

Figura 4. Modelagem matemática das curvas de estabilidade de sobrevivência ao armazenamento prolongado de *H. seropedicae* estirpe RAM10 (Hbs) encapsulada em alginato enriquecido com 0, 50, 100 e 150 mg C L^{-1} de substâncias húmicas, respectivamente. UFC: unidade formadora de colônias.

Figura 5. Valores de quantificação de bactérias (expressos como $\log_{10}$) associados às raízes de milho cultivado em solos contrastantes submetido aos tratamentos: plantas não inoculadas (NI); cápsulas de alginato contendo *H. seropedicae* estirpe RAM10 enriquecidas com 0, 50, 100 e 150 mg C L^{-1} de substâncias húmicas (Hbs-0, Hbs-50, Hbs-100 e Hbs-150, respectivamente), e inoculação direta com estirpe RAM10 (Hbs-Liq). Quantificação molecular de *H. seropedicae* via PCR em tempo real ($n=4$). As barras representam a média $\pm$ o erro-padrão.

Figura 6. Microscopia de fluorescência (A, C, E) e microscopia de campo claro (B, D, F) da interação entre *H. seropedicae* estirpe RAM10 e raízes de plantas de milho cultivadas em Argissolo Amarelo distrocoeso (Adx) submetido aos tratamentos: (A, B) plantas não inoculadas (NI); (C, D) cápsulas de alginato contendo *H. seropedicae* estirpe RAM10 sem adição de substâncias húmicas (Hbs-0); (E, F) cápsulas de alginato contendo *H. seropedicae* estirpe RAM10 enriquecidas com 50 mg C L^{-1} de substâncias húmicas (Hbs-50). (C, D) Infecção bacteriana por meio da cavidade (setas) resultante da ruptura de células epidérmicas durante a emergência de raízes

laterais (asterisco). (E, F) Colonização predominante das regiões de emergência de raízes laterais (setas).

Figura 7. Microscopia de fluorescência (A, C, E) e microscopia de campo claro (B, D, F) da interação entre *H. seropedicae* estirpe RAM10 e raízes de plantas de milho cultivadas em Argissolo Amarelo distrocoeso (Adx) submetido aos tratamentos: (A, B) cápsulas de alginato contendo *H. seropedicae* estirpe RAM10 enriquecidas com 100 mg C L⁻¹ de substâncias húmicas (Hbs-100); (C, D) cápsulas de alginato contendo *H. seropedicae* estirpe RAM10 enriquecidas com 150 mg C L⁻¹ de substâncias húmicas (Hbs-150); (E, F) inoculação direta com estirpe RAM10 (Hbs-Liq). (A, B, C, D) Colonização predominante nas regiões de emergência de raízes laterais (setas) resultando na infecção endofítica do feixe vascular (asterisco). (E, F) Colonização na zona meristemática de raízes laterais (seta) e nas junções das paredes das células epidérmicas (asteriscos).

Figura 8. Microscopia de fluorescência (A, C, E) e microscopia de campo claro (B, D, F) da interação entre *H. seropedicae* estirpe RAM10 e raízes de plantas de milho cultivadas em Cambissolo Flúvico distrófico (CXd) submetido aos tratamentos: (A, B) plantas não inoculadas (NI); (C, D) cápsulas de alginato contendo *H. seropedicae* estirpe RAM10 sem adição de substâncias húmicas (Hbs-0); (E, F) cápsulas de alginato contendo *H. seropedicae* estirpe RAM10 enriquecidas com 50 mg C L⁻¹ de substâncias húmicas (Hbs-50). (C, D, E, F) Colonização preferencial nas regiões de emergência de raízes laterais (setas) e nas junções das paredes das células epidérmicas (asteriscos).

Figura 9. Microscopia de fluorescência (A, C, E) e microscopia de campo claro (B, D, F) da interação entre *H. seropedicae* estirpe RAM10 e raízes de plantas de milho cultivadas em Cambissolo Flúvico distrófico (CXd) submetido aos tratamentos: (A, B) cápsulas de alginato contendo *H. seropedicae* estirpe RAM10 enriquecidas com 100 mg C L⁻¹ de substâncias húmicas (Hbs-100); (C, D) cápsulas de alginato contendo *H. seropedicae* estirpe RAM10 enriquecidas com 150 mg C L⁻¹ de substâncias húmicas (Hbs-150); (E, F) inoculação direta com estirpe RAM10 (Hbs-Liq). (A, B) Infecção bacteriana por meio da cavidade (setas) resultante da ruptura de células epidérmicas durante a emergência de raízes laterais (asterisco). (C, D) Colonização preferencial nas regiões de emergência de raízes laterais (setas). (E, F) Bactérias colonizando preferencialmente as junções das paredes das células epidérmicas (asteriscos) e as extremidades dos pelos radiculares (setas).

Figura 10. Resposta da atividade enzimática da nitrato redutase (a) e malato desidrogenase (b) em folhas de milho cultivado em solos contrastantes submetido aos tratamentos: plantas não inoculadas (NI); cápsulas de alginato contendo *H. seropedicae* estirpe RAM10 enriquecidas com 0, 50, 100 e 150 mg C L⁻¹ de substâncias húmicas (Hbs-0, Hbs-50, Hbs-100 e Hbs-150, respectivamente), e inoculação direta com estirpe RAM10 (Hbs-Liq). Barras com erro-padrão seguidas pela mesma letra maiúscula ou minúscula não diferem entre si, respectivamente para o Argissolo Amarelo distrocoeso (Adx) e para o Cambissolo Flúvico distrófico (CXd), conforme o teste de LSD ($p < 0,05$).

Figura 11. Transcrição diferencial dos genes *ZmNR* (Redutase do Nitrato), *ZmNAR2* (Assimilação de Nitrato Relacionada 2), *ZmNTR1.2* (Transportador de Nitrato 1.2), *ZmMDH2* (Malato Desidrogenase 2) e *ZmMHA2* (H⁺-ATPase 2), avaliada por RT-qPCR em folhas de milho cultivado em solos contrastantes submetido aos tratamentos: plantas não inoculadas (controle); cápsulas de alginato contendo *H. seropedicae* estirpe RAM10 enriquecidas com 0, 50, 100 e 150 mg C L⁻¹ de substâncias húmicas (Hbs-0, Hbs-50, Hbs-100 e Hbs-150), e inoculação direta com estirpe RAM10 (Hbs-Liq). A expressão foi normalizada em relação ao tratamento NI (NI=1). Barras com erro-padrão da média, seguidas por * e ** apresentam diferenças significativas em $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente pelo teste t de Student. Argissolo Amarelo distrocoeso (Adx) e Cambissolo Flúvico distrófico (CXd).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização de substâncias húmicas (SH) derivadas de turfa fornecida como extrato húmico comercial bruto pela DNAgro Biotechnology.

Tabela 2. Características dos solos utilizados no cultivo do milho.

Tabela 3. Iniciadores usados para os estudos de expressão gênica conduzidos neste trabalho na cultura do milho.

Tabela 4. Morfologia das cápsulas de alginato enriquecidas com substâncias húmicas obtidas e eficiência de encapsulação inicial (EY) de *H. seropedicae* estirpe RAM10.

Tabela 5. Análise de regressão da variável estabilidade de sobrevivência em função dos dias de armazenamento das cápsulas de acordo com os tratamentos avaliados.

Tabela 6. Eficiência de encapsulação (EY) de *H. seropedicae* estirpe RAM10 em cápsulas de alginato enriquecido com substância húmica ao longo do período de armazenamento.

Tabela 7. Parâmetros biométricos de desenvolvimento do milho em resposta à aplicação das cápsulas.

RESUMO

PAIVA, Igor de Oliveira; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; outubro de 2025; ENCAPSULAÇÃO DE *Herbaspirillum seropedicae* EM ALGINATO PROMOVE SUA SOBREVIVÊNCIA E EFICIÊNCIA DE INOCULAÇÃO EM MILHO; Orientador: Prof.º Ph.D. Luciano Pasqualoto Canellas.

A intensificação da agricultura moderna exige alternativas biotecnológicas que conciliem o aumento de produtividade e a sustentabilidade. O uso combinado de bactérias promotoras do crescimento vegetal e substâncias húmicas apresenta potencial elevado para a promoção da qualidade biológica do solo. Contudo, os microrganismos selecionados em laboratório são suscetíveis à perda prematura de sua atividade biológica. Manter a viabilidade, preservar a sobrevivência e facilitar a aplicação e a adaptação microbiana ao ambiente são funções importantes que podem determinar o sucesso do funcionamento de um agente biológico. A encapsulação com alginato vem sendo considerada uma solução eficaz para promover proteção e garantir a liberação gradual dos microrganismos. O objetivo deste estudo consistiu em encapsular a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* estirpe RAM10 em alginato de sódio enriquecido com concentrações crescentes de substâncias húmicas (0, 50, 100 e 150 mg C L⁻¹) para avaliar a taxa de sobrevivência do microrganismo durante nove meses de armazenamento. A encapsulação foi realizada pelo método de gelificação iônica da matriz polimérica oriunda do alginato, utilizando CaCl₂ como agente reticulante. Após 180 dias de armazenamento, as cápsulas foram aplicadas em dois solos com características contrastantes (argiloso x arenoso), e o crescimento inicial de plântulas de milho e a colonização radicular pelo microrganismo foram avaliados, assim como alguns indicadores do metabolismo, entre os quais a atividade das enzimas nitrato redutase e malato desidrogenase e os níveis de expressão gênica dos genes *ZmNR* (Redutase do Nitrato), *ZmNAR2* (Assimilação de Nitrato Relacionada 2), *ZmNTR1.2* (Transportador de Nitrato 1.2), *ZmMDH2* (Malato Desidrogenase 2) e *ZmMHA2* (H⁺-ATPase 2). Os resultados revelaram que, aos 270 dias de armazenamento em temperatura ambiente, as cápsulas mantiveram populações viáveis de aproximadamente 10⁴ UFC g⁻¹, com taxas de sobrevivência entre 48,0% e

58,2%, sendo a maior taxa obtida em Hbs-150. A inoculação via solo com as cápsulas resultou em colonização intensa das raízes de milho, principalmente na zona próxima ao meristema apical (coifa) e zona de emergência de raízes laterais, bem como nas junções celulares das células epidérmicas. A análise metabólica da atividade enzimática demonstrou que as bactérias em associação com as substâncias húmicas promoveram significativamente a atividade da nitrato redutase e da malato desidrogenase nas folhas de milho para ambos os solos. Já em nível molecular, em relação ao controle não inoculado, a inoculação das cápsulas estimulou a transcrição diferencial de todos os genes avaliados, com destaque para *ZmMHA2*, gene que codifica a síntese da enzima H^+ -ATPase da membrana plasmática. Esses resultados demonstraram que a encapsulação de bactérias promotoras do crescimento vegetal em alginato suplementado com substâncias húmicas é uma estratégia eficiente para manter a viabilidade bacteriana durante o armazenamento em condições ambiente, assegurando a colonização radicular e promovendo processos fisiológicos e moleculares nas plantas.

Palavras-chave: Bactérias promotoras do crescimento vegetal, substâncias húmicas, colonização de raízes, atividade enzimática, sinalização molecular, inoculante microbiano.

ABSTRACT

PAIVA; Igor de Oliveira; M.Sc.; State University of Northern Fluminense
Darcy Ribeiro; October 2025; ENCAPSULATION OF *Herbaspirillum*
seropedicae IN ALGINATE PROMOTES ITS SURVIVAL AND
INOCULATION EFFICIENCY IN MAIZE; Adviser: Prof.º Ph.D. Luciano
Pasqualoto Canellas.

The intensification of modern agriculture demands biotechnological alternatives capable of reconciling increased productivity with sustainability. The combined use of plant growth-promoting bacteria and humic substances has high potential for enhancing soil biological quality. However, microorganisms selected under laboratory conditions are susceptible to premature loss of biological activity. Maintaining viability, preserving survival, and facilitating microbial application and adaptation to the environment are crucial functions that can determine the success of a biological agent. Encapsulation with alginate has been considered an effective strategy to ensure microbial protection and gradual release. The objective of this study was to encapsulate the bacterium *Herbaspirillum seropedicae* strain RAM10 in sodium alginate supplemented with increasing concentrations of humic substances (0, 50, 100 and 150 mg C L⁻¹) in order to assess microbial survival rates during nine months of storage. Encapsulation was conducted via ionic gelation of the polymer matrix derived from alginate using CaCl₂ as a crosslinking agent. After 180 days of storage, the capsules were applied to two contrasting soils (clayey and sandy), and early maize seedling growth and root colonization were evaluated, along with metabolic indicators such as nitrate reductase and malate dehydrogenase enzymatic activities, and the transcription levels of the genes *ZmNR* (Nitrate Reductase), *ZmNAR2* (Nitrate Assimilation Related 2), *ZmNTR1.2* (Nitrate Transporter 1.2), *ZmMDH2* (Malate Dehydrogenase 2), and *ZmMHA2* (H⁺-ATPase 2). Results showed that after 270 days of storage at room temperature, the capsules maintained viable bacterial populations of approximately 10⁴ CFU g⁻¹, with survival rates ranging from 48.0% to 58.2%, with the highest value obtained in Hbs-150. Soil inoculation via capsules resulted in intense maize root colonization, especially in the region near the apical meristem (root cap), in

the lateral root emergence zone, and at epidermal cell junctions. Metabolic analysis showed that the bacteria combined with humic substances significantly increased nitrate reductase and malate dehydrogenase activities in maize leaves in both soils. At the molecular level, relative to the non-inoculated control, capsule inoculation induced differential transcription of all evaluated genes, particularly *ZmMHA2*, which encodes the membrane H⁺-ATPase. Altogether, the findings demonstrate that encapsulation of plant growth-promoting bacteria in alginate supplemented with humic substances is an efficient strategy to maintain bacterial viability during storage under ambient conditions, ensuring root colonization and promoting both physiological and molecular processes in plants.

Keywords: Plant growth-promoting bacteria, humic substances, root colonization, enzymatic activity, molecular signaling, Microbial inoculant.

INTRODUÇÃO

Com a crescente urbanização e industrialização, tornam-se mais evidentes os impactos das alterações climáticas. Estimativas sugerem que até 2050 a produção mundial de alimentos deverá aumentar cerca de 70% sem provocar danos adicionais ao meio ambiente (Panpatte et al., 2017). Contudo, a atividade agrícola atual, caracterizada pelo uso intenso do solo e de insumos químicos, pela ineficiência na utilização de nutrientes e pela degradação e diminuição do conteúdo de matéria orgânica do solo, contribui para a estagnação dos rendimentos de produção e para o rápido esgotamento energético e dos recursos disponíveis. A sustentabilidade da agricultura moderna, portanto, demanda grande atenção (Vejan et al., 2019). O desenvolvimento de biotecnologias associadas ao uso de bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) pode ser eficaz nesse contexto. As BPCV operam por meio de diversos mecanismos para promover o crescimento vegetal, incluindo a fixação biológica de nitrogênio, a solubilização de macro e micronutrientes em formas pouco disponíveis, a produção de vários fitohormônios e a indução de resistência a doenças nas plantas, favorecendo, assim, o crescimento radicular, a absorção de água e nutrientes e a atenuação de doenças causadas por patógenos (Dobbelaere et al., 2001; Rodriguez et al., 2006; Spaepen et al., 2007; Pedraza, 2008; Zaidi et al., 2009; Glick, 2012; Armada et al., 2014; Vejan et al., 2016). As BPCV constituem um amplo conjunto de bactérias pertencentes a diferentes gêneros e espécies não patogênicas de bactérias, colonizadoras dos espaços intercelulares da planta hospedeira e da superfície próxima à raiz e à folha das plantas (rizosfera e filosfera) onde a presença de exsudados, tais como ácidos orgânicos, aminoácidos, açúcares e metabólitos secundários, atua como sinalizadores atrativos ou antimicrobianos e como fonte de nutrientes para a sobrevivência microbiana ali presente (Luz, 1996; Jones et al., 1998; Burdman et al., 2000). Contudo, aplicar células de BPCV altamente eficientes e selecionadas em laboratório diretamente no filopiano ou na rizosfera e, ao mesmo tempo, alcançar resultados significativos na promoção do crescimento das plantas

não é uma tarefa simples, pois esses microrganismos são suscetíveis à perda prematura de sua atividade biológica devido a diversos fatores impostos pelo ambiente, tais como radiação UV, flutuação de pH, temperatura, umidade, predação da microbiota nativa e estresse salino (Wu et al., 2012; Spence e Bais, 2013; Thapa e Prasanna, 2018), além da competição por recursos escassos com o microbioma já adaptado.

A inconsistência de resultados com a aplicação de inoculantes em plantas não leguminosas refletida na falta de reprodutibilidade no campo dos resultados observados em condições de laboratório ou em casa de vegetação (Hossain et al., 2023; Bhattacharjee et al., 2023), não pode ser atribuída somente às estirpes usadas que são altamente eficientes para os processos pelos quais foram selecionadas, mas também a múltiplos fatores que atuam simultaneamente como alta competitividade natural no ambiente, perda de viabilidade do microrganismo selecionado durante o processamento, armazenamento ou mesmo durante a administração do tratamento. Além disso, há ainda a instabilidade na formulação ou a falta de métodos adequados para armazenar os microrganismos sem prejudicar suas interações microbianas ou pela gestão dos tratos culturais que modificam as interações dos microrganismos com o ambiente (Vassilev et al., 2020; French et al., 2021; Daisley et al., 2022).

Frente aos desafios da adoção de BPCV na agricultura, a busca por estratégias para aumentar a sobrevivência de células bacterianas viáveis durante o armazenamento e aplicação é um objetivo necessário para assegurar a proteção eficaz dos inoculantes microbianos no solo e obter resultados positivos na inoculação das plantas (Vassilev et al., 2001). Uma alternativa promissora, mas ainda pouco estudada, é a encapsulação (macro-, micro- ou nanoencapsulação) dos microrganismos em diferentes matrizes, como polímeros naturais ou sintéticos, ceras, gomas, gorduras e carboidratos (Jiménez-Arias et al., 2020; Saberi Riseh et al., 2021; Scott-Fordsmand et al., 2022; Rojas-Sánchez et al., 2022). Entre essas matrizes, destaca-se o alginato de sódio, um polímero natural composto por ácido β (1-4) D-manurônico e ácido α (1-4) L-gulurônico, extraído a partir da digestão das folhas de algas marrons ou da superfície de algumas bactérias (Hay et al., 2010; Nehra e Choudhary, 2015).

A encapsulação de BPCV em alginato de sódio pode favorecer a armazenagem a seco em temperatura ambiente por períodos prolongados, promover a liberação gradual de células bacterianas no solo durante a degradação do polímero concomitante com a germinação e emergência das plântulas, proteger as células bacterianas contra estresses abióticos e possibilitar a adição de nutrientes na tentativa de prolongamento da vida útil das bactérias ajudando-as a se adaptarem efetivamente ao ambiente sem causar perturbações significativas ao ecossistema (Bashan et al., 2014; Vassilev et al., 2015; Zago et al., 2019).

Para melhorar a sobrevivência, favorecer a adaptação e colonização das bactérias e estimular o crescimento e a atividade microbiana, a suplementação com substâncias húmicas (SH) pode ser usada como aditivo na encapsulação de BPCV (Rekha et al., 2007). Diferentes pesquisadores constataram que plantas tratadas com SH apresentaram aumento expressivo na produção de exsudados e na concentração de compostos lábeis na rizosfera (Puglisi et al., 2009; Canellas e Olivares, 2017; Canellas et al., 2019) contribuindo para atração microbiana, que, por sua vez, pode promover o desenvolvimento radicular, bem como, a absorção de nutrientes e a colonização do hospedeiro bacteriano (Canellas e Olivares, 2014; Canellas et al., 2015a; Olivares et al., 2017). No entanto, para tornar viável esse processo biotecnológico inovativo é preciso entender os efeitos da combinação entre polímero, aditivo (SH) e microrganismos, bem como avaliar os processos de sua degradação no solo. Isso é essencial para compreender como a microbiota do solo e das plantas é afetada pelos derivados do polímero e aditivo que compõem a formulação de produtos de base microbiana (Vassilev et al., 2020).

Esse estudo foi baseado na hipótese de que a encapsulação de BPCV em alginato de sódio suplementado com SH pode fornecer um microambiente mais favorável à adaptação e sobrevivência das bactérias durante o armazenamento em prateleira e no solo no qual serão aplicadas, promovendo a liberação lenta e gradual do microrganismo. Com isso, o presente estudo teve como objetivo encapsular a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* estirpe RAM10 em alginato de sódio enriquecido com diferentes concentrações de substâncias húmicas para avaliar a taxa de sobrevivência

do microrganismo encapsulado durante o armazenamento e após a aplicação no solo. Desse modo, buscou-se produzir cápsulas de alginado enriquecidas com substâncias húmicas em doses crescentes de 0, 50, 100 e 150 mg C L⁻¹ para conter BPCV e avaliar a taxa de sobrevivência das células bacterianas encapsuladas submetidas ao armazenamento à temperatura ambiente por 9 meses. Os efeitos desse produto aplicado ao solo no crescimento e no metabolismo primário de plântulas de milho também foram avaliados.

REVISÃO DE LITERATURA

Bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV)

Em um ecossistema complexo, naturalmente as plantas interagem com uma gama diversificada de microrganismos, interações que podem ser benéficas, neutras ou prejudiciais à planta (Oldroyd, 2013; do Amaral et al., 2016). A utilização de bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) ganha destaque crescente por agrupar uma série de microrganismos que possuem a capacidade de estabelecer relações benéficas simbióticas, associativas ou não com as plantas, colonizando a superfície da raiz ou os espaços intercelulares, contribuindo para o crescimento vegetal, a elevação da produção e a tolerância a estresses (Glick, 2012; do Amaral, et al., 2014).

A eficácia comprovada dos inoculantes microbianos para o aumento da produtividade agrícola tem impulsionado significativamente a expansão do mercado global do segmento, que cresce a uma taxa estimada de 10% ao ano. Em termos financeiros, o valor desse mercado é projetado em US\$ 3,72 bilhões em 2025, podendo alcançar US\$ 5,97 bilhões até 2030. A América do Norte lidera o setor, representando cerca de 35% do mercado global (US\$ 1,3 bilhão), seguida pela Europa (US\$ 1,14 bilhão), Ásia-Pacífico (US\$ 0,61 bilhão), África (US\$ 0,25 bilhão) e América do Sul (US\$ 0,22 bilhão), sendo a Argentina o maior mercado dessa região, seguida pelo Brasil (Mordor Intelligence, 2025). No Brasil, segundo dados da Associação Nacional de Produtores e Importadores de Inoculantes (ANPII Bio, 2025), foram comercializados, em 2024, cerca de 206 milhões de doses de inoculantes, resultando em um volume de vendas de aproximadamente R\$ 528 milhões.

No Brasil, espécies do gênero *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* são exemplos emblemáticos da importância do insumo biológico para a economia do país, contudo, esses microrganismos atendem apenas às plantas leguminosas, as quais são capazes de realizar uma interação simbiótica com o organismo. Para atender às plantas não leguminosas de grande importância para

alimentação humana e produção de bioenergia diversos gêneros de BPCV estão descritos, incluindo: *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella* e *Pseudomonas* (Adesemoye et al., 2009; Hungria et al., 2010; Videira et al., 2012; Olivares et al., 2017). Essas bactérias modificam o padrão de estabelecimento das raízes e estimulam o crescimento da planta a partir de diferentes mecanismos, apresentando um papel importante no desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável (Rivera-Cruz et al., 2008; Schoebitz et al., 2009; Bhattacharyya e Jha, 2012).

Os mecanismos de promoção do crescimento vegetal disparados pelas BPCV estão sendo estudados, porém uma grande parte deles é bem conhecida. A produção de fitohormônios e enzimas essenciais, a redução dos níveis de etileno na raiz durante o desenvolvimento da planta pela produção da 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase (ACCd), indução de resistência sistêmica contra patógenos e nematoides, solubilização de macro e micronutrientes encontrados em formas insolúveis no solo, fixação biológica de nitrogênio, formação de biofilme sobre a raiz que aumenta a hidratação e nutrição da planta, são alguns desses mecanismos (Glick, 2005; Pedraza, 2008; Yang et al., 2009; Glick, 2012; Timmusk et al., 2014; Souza et al., 2015).

A forma como as BPCV colonizam as plantas pode variar de acordo com as características do microrganismo e da planta envolvida na associação. Muitos dos gêneros bacterianos isolados e utilizados para inoculação em Poaceas são classificados como associativos e/ou endofíticos (Döbereiner et al., 1995). As BPCV de natureza associativa, como *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense* e *Azotobacter* sp. colonizam as superfícies externas das raízes (rizoplane), mais especificamente nos pelos radiculares, zonas de alongação e regiões de fissuras formadas durante a formação das raízes laterais (Carvalho et al., 2014, 2016). Por sua vez, as BPCV endofíticas, como *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* spp., *Burkholderia* spp. e algumas estirpes de *A. brasilense*, exploram os tecidos internos das raízes, como cilindro vascular e xilema, colonizando os espaços intercelulares e o apoplasto nos quais, em alguns casos, podem ser translocadas para outras

partes da planta através do xilema (Döbereiner et al. 1995; Reinhold-Hurek e Hurek, 2011; Carvalho et al., 2014).

A adesão das BPCV às plantas ocorre, em grande parte, por meio de interações apolares, predominantemente em monocamada, podendo envolver estruturas fibrilares que permitem à bactéria se ancorar às células vegetais ou, ainda, pela formação de pequenos agregados embebidos em mucigel que as aderem sobre a estrutura da planta (Berg et al., 1979; Umali-Garcia et al., 1980; Olivares et al., 1997). De modo geral, diferentemente de fungos, as BPCV (com exceção do gênero *Rhizobium* e correlatas) não apresentam penetração ativa, ou seja, não sinalizam para produção de estruturas de fixação especializadas, como apressórios ou “pegs” de penetração, que lhes conferem a capacidade de exercer força mecânica ou pressão física suficiente para transpor barreiras como a parede celular e o turgor da planta, impossibilitando sua penetração em células epidérmicas intactas (Goodman, 1982). Em decorrência disso, as BPCV penetram de modo passivo por meio de aberturas naturais ou ferimentos nas diferentes estruturas do hospedeiro. Nas raízes, as principais formas de penetração são lenticelas, feridas devido à abrasão com o solo durante o processo de crescimento radicular e por regiões de emergência de raízes laterais que rompem a camada de células epidérmicas (Olivares et al, 1997).

Os inoculantes formulados com BPCV possuem potencial elevado para promoção da produção agrícola, contudo são suscetíveis à influência de fatores externos, exigindo uma abordagem específica para o armazenamento, conservação e aplicação a fim de prevenir a degradação prematura e a perda de sua viabilidade quando fornecidos às plantas (Campos et al., 2023). Nesse sentido, a inoculação e a preservação do inóculo são importantes uma vez que essas bactérias utilizam aberturas naturais nas plantas para iniciarem o processo de colonização permanecendo por um determinado tempo no ambiente de aplicação estando sujeitas a disputa competitiva por recursos limitados no solo (água e nutrientes), à predação por outros microrganismos, ao estresse salino e à flutuação de temperatura, pH, umidade, radiação que pode diminuir a vida útil e reduzir as chances de colonização do hospedeiro-alvo (Wu et al., 2012; Spence e Bais, 2013; Thapa e Prasanna, 2018). Com isso, novos veículos

para entrega de BPCV às culturas precisam ser desenvolvidos de modo que proporcionem melhor aplicação, maior sobrevivência das estirpes e que preservem a eficiência do microrganismo para alcançar melhores resultados de promoção do crescimento das plantas em condições de campo.

Encapsulação de BPCV

As técnicas de encapsulação vêm sendo desenvolvidas há mais de 50 anos e consistem na obtenção de cápsulas que envolvem, aprisionam, recobrem, revestem ou empacotam diferentes tipos de materiais, entre eles BPCV, conferindo uma forma de proteção quando são introduzidas no solo, assegurando a liberação gradual e prolongada (Bashan, 1986; Kim et al., 2012). A aplicação desse método tende a promover um ambiente microscópico mais propício ao microrganismo. Com isso, espera-se diminuir a perda de viabilidade durante o armazenamento e aplicação, minimizando a biodegradação prematura do microrganismo. Além disso, pode permitir a liberação gradual das células microbianas e contribuir para a redução da competição com estirpes nativas do solo bem-adaptadas (Vassilev et al., 2020).

A escolha do tipo de material da matriz e o processo metodológico que serão utilizados para encapsulação tornam-se fundamentais para a eficácia do produto. Existe uma grande variedade de matrizes transportadoras de microrganismos que podem ser de origem natural (turfa, lignita, carvão mineral, argila), sintéticas (poliacrilamida), orgânicas (carvão vegetal, biocarvão, compostos) ou biopolímeros (amido, alginato de sódio) (Le Corre et al., 2010; Fasusi et al., 2021; Moradi Pour et al., 2022). Safari et al. (2020) demonstraram que alguns tipos de matrizes têm a capacidade de potencializar a ação do inoculante de BPCV, além de manter a viabilidade bacteriana, cujas respostas variaram conforme a adaptação de cada microrganismo utilizado. Em seu estudo, observou-se ainda que, entre os diferentes carreadores utilizados na formulação de cápsulas de alginato,

aqueles compostos por nanoargila e carvão mineral foram os mais eficientes na encapsulação de *Pseudomonas putida* e *P. kilonensis*.

Na encapsulação de BPCV, destacam-se três principais métodos: a técnica de gelificação iônica (extrusão ou reticulação), emulsificação e secagem por pulverização (Balla et al., 2022). A literatura científica descreve várias outras técnicas de encapsulação por processos físico-químicos e novos métodos de formulação continuam a ser desenvolvidos. Hudson e Margaritis (2013) examinaram 20 técnicas para a fabricação de cápsulas derivadas de diferentes matrizes, cada uma com suas próprias aplicações, destacando suas vantagens e desvantagens.

Especialmente sobre a técnica de gelificação iônica, metodologia adotada neste trabalho, ela é globalmente utilizada, sendo amplamente reconhecida por suas vantagens de apresentar baixos custos e procedimentos de produção mais simples, gerando microcápsulas com a introdução de uma gota de solução ou suspensão aquosa contendo o material ativo, que neste caso são as BPCV e o alginato de sódio, em uma solução de cloreto de cálcio para a formação das cápsulas (Lim e Sun, 1980; Vinceković et al., 2017). Uma solução aquosa de alginato de sódio composta pelo consórcio microbiano desejado é dispensada sobre uma solução que contém cátions divalentes, como o cloreto de cálcio, na qual a gotícula é solidificada, resultando na formação de um hidrogel por meio da interação entre a cadeia polimérica de carga negativa do alginato de sódio e os cátions Ca^{2+} do cloreto de cálcio (Vemmer e Patel, 2013). As cápsulas geradas nesse processo são uniformes com diâmetro variável de acordo com o tamanho da agulha utilizada na saída do gotejador, sendo uma técnica adequada para produção de macro ou microencapsulados (Balla et al., 2022). Como alternativa ao alginato de sódio, é possível utilizar outros polímeros, tais como derivados de pectina e goma guar, e para substituir o CaCl_2 pode ser utilizado o gluconato de cálcio, bário ou cobre (Vejan et al., 2019).

Matriz de encapsulação: alginatos

Alginato é um termo genérico que engloba sais e derivados do ácido algínico, um polissacarídeo ácido de alto peso molecular encontrado naturalmente como sal insolúvel de cálcio, sódio, potássio e magnésio nas algas marrons das espécies *Macrocystis pyrifera*, *Ascophyllum nodosum*, *Lamaria hyperborea* e *L. Digitata* (King, 1983). É composto por proporções variáveis de resíduos de ácido urônico, β -D-manurônico (M) e α -L-gulurônico (G), ligados entre o carbono 1 e 4, sendo essa composição dependente da espécie de alga da qual o alginato é extraído (Fischer e Dörfel, 1955; King, 1983). No ácido algínico, encontram-se arranjos em bloco de homopolímero (MM e GG) ou em bloco de heteropolímero (MG), conforme descrito por Haug et al. (1967) e mostrado na Figura 1.

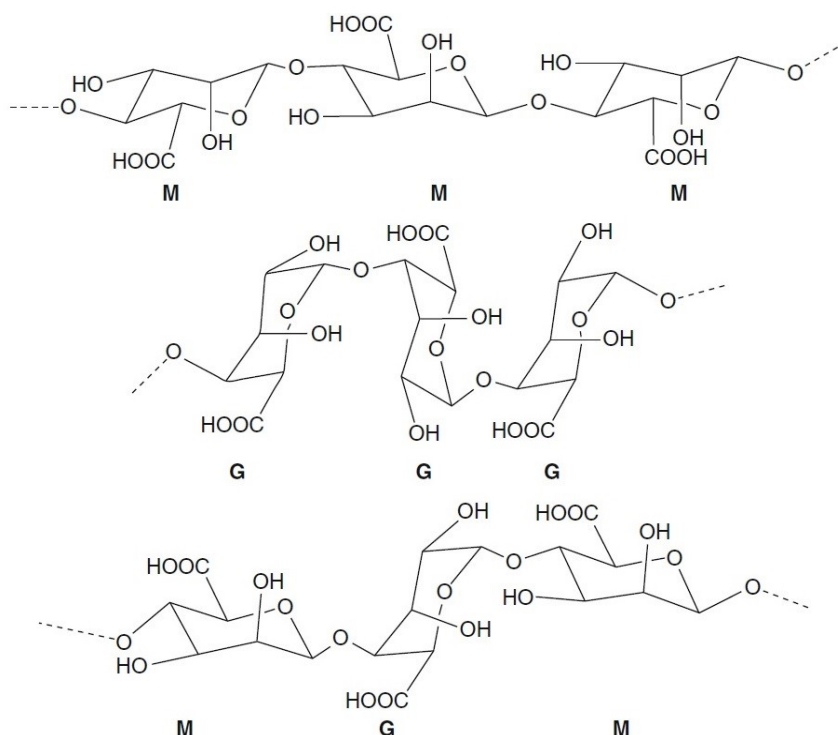


Figura 1. Blocos repetitivos de ácido β -D-manurônico (M), α -L-gulurônico (G) e de ácido β -D-manurônico- α -L-gulurônico (MG) no ácido algínico. Adaptado de Prasad e Kadokawa (2009).

Esses polissacarídeos podem ser empregados para formação de cápsulas, cuja estrutura tridimensional depende da composição e arranjo do seu bloco. Quando o polímero apresenta apenas monômeros G formam-se cápsulas mais firmes, compostas por blocos GG que se mantêm mais unidos, por outro lado quando composto apenas por monômeros M ou pela combinação de M e G, formam-se microcápsulas mais flexíveis, contendo blocos MM/MG em sequências alternadas (Smidsrød e Skjåk-Bræk, 1990). Nesse sentido, a presença de sequências de resíduos gulurônicos (G) favorece a formação de cavidades que funcionam como uma “caixa de ovo”, ou seja, os cátions interagem com cinco diferentes átomos de oxigênio de dois monômeros adjacentes na parte interna da cadeia, o que permite a formação rápida e simples de grânulos ou cápsulas de hidrogel quando em contato com cátions divalentes, fazendo do alginato um excelente material para a encapsulação (Smidsrød e Skjåk-Bræk, 1990; Burey et al., 2008; John et al., 2011; Schoebitz et al., 2013). As cápsulas podem ser constituídas por 1 a 8% de alginato com diâmetro variando de 1 a 6 mm (macrogrânulo) e 50-200 μm (microgrânulos), podendo apresentar como constituinte na sua formulação uma concentração de células bacterianas variando entre 10^8 a 10^{11} UFC mL^{-1} (Schoebitz et al., 2013; Bashan et al., 2014).

Diversas são as vantagens do uso de polímeros à base de alginato para a encapsulação microbiana, tais como possibilitar o armazenamento a seco em temperatura ambiente por períodos prolongados; liberação gradual de células bacterianas no solo durante a degradação do polímero concomitante com a germinação e emergência das plântulas; proteção das células bacterianas contra estresses abióticos; adição de nutrientes visando o prolongamento da vida útil das bactérias (aditivos) e nutrição das plantas; entre outros (Bashan et al., 2014; Vassilev et al., 2015; Zago et al., 2019). Para potencializar a sua aplicação, tem-se explorado e aplicado uma extensa variedade de aditivos ao alginato no sistema de encapsulação, entre eles as SH. Esses materiais podem desempenhar funções como agentes de volume transportadores, promover a estabilidade da formulação, fornecer proteção e nutrição para células ou esporos microbianos (Balla et al., 2022).

Substâncias Húmicas

Como principal componente da fração coloidal da matéria orgânica dos solos, água e sedimentos, contribuindo com 85 a 90% do teor total de carbono orgânico (Dick et al., 2009), as substâncias húmicas (SH) compreendem um amplo conjunto de subestruturas alifáticas e aromáticas, resultantes da decomposição de resíduos orgânicos de plantas e animais, mediados por processos microbiológicos (Stevenson, 1994).

Muito ainda se discute o modelo estrutural que melhor define a composição química, estrutura, forma e tamanho da SH. Na década de 1990, prevalecia a concepção de que as SH eram constituídas por macromoléculas orgânicas, com alguns espaços vazios de diferentes tamanhos que poderiam alojar outros compostos orgânicos, hidrofílicos ou hidrofóbicos, e também inorgânicos (Schulten e Schnitzer, 1995; 1997; Sein et al., 1999). Entretanto, o conceito elegantemente proposto por Piccolo (2001) trouxe uma nova perspectiva ao sugerir que as SH apresentam natureza supramolecular, ou seja, são formadas por um conjunto de milhares de moléculas de baixo peso molecular, derivadas da degradação de materiais biológicos auto-organizadas em arranjos supramoleculares estabilizados por ligações de hidrogênio e ligações hidrofóbicas fracas, como as forças de Van der Waals (Piccolo, 2001; 2002; Theng, 2012).

Convencionalmente, as SH podem ser divididas em duas frações principais, solúveis e insolúveis, baseadas na solubilidade em meio aquoso. A fração solúvel, em função do pH, é composta pelos ácidos húmicos (AH) extraídos em meio alcalino, mas, quando em $\text{pH} < 2,0$, tornam-se insolúveis devido à protonação dos grupamentos funcionais, que promove o colapso da estrutura e precipitação das macromoléculas, e ácidos fúlvicos (AF) solúveis em água em qualquer condição de pH. A fração insolúvel, por sua vez, representa a matéria orgânica intimamente ligada à fração mineral do solo, sendo denominada como húmina (Hu) (Kononova, 1982; Thurman, 1985; Stevenson, 1994; Mobed et al., 1996; Canellas et al., 2001). Sob o ponto de vista da teoria supramolecular, os AH foram definidos como a fração solúvel em base que apresenta quantidade relativa maior de grupos hidrofóbicos.

Com o abaixamento do pH, ocorre a formação de ligações de hidrogênio entre os componentes hidrofóbicos até um valor no qual a supraestrutura floclula. Já os AF foram definidos como a fração solúvel que apresenta quantidade relativa grande de grupamentos funcionais hidrofílicos com elevada densidade de carga permitindo que permaneçam solúveis em qualquer valor de pH (Piccolo, 2002).

As principais fontes utilizadas para extração de SH para uso comercial incluem carvões de baixa qualidade para produzir energia, como a leonardita (Aguirre et al., 2009), o lignito (Valero et al., 2018) e a turfa (Silva et al., 2011). Além dos carvões de baixa qualidade as SH também podem ser extraídas naturalmente do solo (Baldotto et al., 2011a), de compostos orgânicos feitos de húmus de minhoca (vermicompostos) (Atiyeh et al., 2002; Arancon et al., 2003; García et al., 2012; 2014; Canellas et al., 2013), esterco bovino (Arancon et al., 2003), lixo urbano e de lodo de esgoto (Canellas et al., 2000; Jindo et al., 2012), entre outros.

Após a extração, o uso da suspensão de SH solúveis em baixas concentrações pode oferecer inúmeros estímulos para a promoção de crescimento da planta, atuando direta ou indiretamente (Nardi et al., 2002; Canellas e Olivares, 2014; Canellas et al., 2015b). Os efeitos indiretos estão ligados a alterações nas propriedades químicas, físicas e biológicas do solo, influenciando na dinâmica de solubilização e absorção de nutrientes, aumentando a capacidade de troca catiônica e reterendo umidade, promovendo assim alterações na fisiologia vegetal, favoráveis às plantas (Pinton et al., 1999; Chen et al., 2003; Canellas et al., 2011). Os estímulos diretos agem nos processos metabólicos e fisiológicos das plantas, modificando a arquitetura radicular pela indução da formação de raízes laterais e pelos radiculares, ativando o metabolismo secundário, induzindo a atividade das bombas de prótons que impulsiona a energização dos transportadores secundários de íon e atuam na regulação de diversas enzimas e na modulação de diferentes genes envolvidos no metabolismo vegetal (Façanha et al., 2002; Zandonadi et al., 2007; Rosa et al., 2009; Trevisan et al., 2010; Dobbss et al., 2010; Canellas et al., 2015b).

Quando associadas a bactérias diazotróficas endofíticas, as SH podem estimular a atividade microbiana, proporcionando o aumento da população de bactérias introduzidas nas plantas. Isso ocorre pelo estímulo de atração gerado pela maior produção de substâncias orgânicas exsudadas pelas raízes, favorecendo a colonização do hospedeiro (Nardi et al., 2016; Olivares et al., 2017). Além disso, existem evidências de que as SH podem atuar como uma primeira camada protetora dos microrganismos (Tomaszewski et al., 2011; Shehata et al., 2014; Tong et al., 2020). A característica estrutural da SH, formada por um agregado de milhares de compostos unidos em arranjo supramolecular de ligações de natureza fraca, faz com que, quando em suspensão, os componentes hidrofóbicos da mistura heterogênea são espontaneamente agrupados e separados da fase aquosa (Piccolo, 2002). Ao reintegrar o extrato microbiano em suspensão contendo SH, os componentes da mistura heterogênea se reagrupam formando uma camada de proteção primária que pode conter as bactérias. Essa organização pode proteger células bacterianas e moléculas orgânicas lábeis contra a degradação (Spaccini et al. 2000, 2002; Martinez-Balmori et al., 2013; Silva et al., 2017; Olivares et al., 2017).

Já a aplicação de SH como aditivo na encapsulação proporciona um ambiente mais poroso na cápsula, facilitando a difusão de oxigênio, nutrientes e metabólitos, que favorecem a multiplicação bacteriana no meio encapsulado, assegurando alta viabilidade do inoculante imobilizado (Young et al., 2006). Resultados análogos foram observados por Melo et al. (2016), nos quais a adição de 1% de ácidos húmicos à formulação de estirpes de *Bacillus subtilis* resultou na preservação da viabilidade do microrganismo por 5 meses de armazenamento, proporcionando simultaneamente o estímulo do crescimento de plantas de alface. A imobilização de *Azospirillum brasilense* em microcápsulas de alginato com ácidos húmicos, assegurou uma elevada taxa de sobrevivência e viabilidade ao longo de um período de 3 meses de armazenamento (Zago et al., 2019).

Nesse sentido, a utilização de SH como aditivo na microencapsulação de BPCV em alginato vai depender tanto da concentração como das características químicas da fonte, além do tipo e espécie de microrganismo, uma vez que poderá tanto estimular como inibir o crescimento e a atividade

microbiana de determinadas estirpes, tornando-se necessário maiores estudos para entender os efeitos das diferentes concentrações das SH sobre o polímero e os microrganismos (Pukalchik et al., 2019).

MATERIAL E MÉTODOS

Crescimento bacteriano e preparo do inoculante

A bactéria selecionada para este estudo foi a *Herbaspirillum seropedicae* estirpe RAM10, proveniente da Coleção de Microrganismos do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - LBCT/UENF, gentilmente cedida pelo Prof. Fábio Lopes Olivares. Esta estirpe, derivada de *H. seropedicae* ZA95, foi originalmente isolada de plantas de arroz e apresenta em seu material genético a inserção transposicional do gene que codifica a *Green Fluorescence Protein* (GFP) que confere fluorescência verde (Baldani et al., 1986).

Com isso, frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio NB suplementado com glicerol foram inoculados pela transferência direta de uma alçada da cultura estocada em meio NB sólido. Os frascos foram então colocados para incubação a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ e 180 rpm em agitador orbital até atingir a fase exponencial de crescimento. Após o crescimento, a suspensão microbiana foi transferida para tubos Falcon de 50 mL onde foram submetidas à centrifugação em uma centrífuga orbital Rotanta-460R (Andreas Hettich GmbH & Co, Tuttlingen, Alemanha) a 5000 g por 10min a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ para separação do meio de cultura das células microbianas (Hbs). A Hbs foi então ressuspensa em soluções contendo diferentes concentrações de substâncias húmicas (SH) (0, 50, 100 e 150 mg C L⁻¹), fornecidas pela DNAgro Biotechnology do Brasil (São Paulo, Brasil), com pH ajustado para 6,0, definindo assim os tratamentos Hbs-0, Hbs-50, Hbs-100 e Hbs-150.

Obtenção e caracterização das substâncias húmicas

As substâncias húmicas foram obtidas a partir de um produto comercial à base de turfa fornecido pela DNAgro Biotechnology do Brasil (São Paulo, Brasil). Este produto foi previamente caracterizado e suas informações encontram-se descritas na Tabela 1.

O teor de carbono orgânico total (COT) foi determinado por combustão seca utilizando um analisador Shimadzu TOC-L CSH/CSN com amostrador automático ASI-L (Shimadzu, Tóquio, Japão), baseado no método de combustão de Dumas. Neste sistema, a amostra líquida foi injetada em um forno de combustão de alta temperatura (~680°C) sob uma atmosfera rica em oxigênio, promovendo a oxidação completa de todos os compostos contendo carbono a dióxido de carbono (CO₂). Os gases resultantes passaram por filtros de purificação para umidade e óxidos de nitrogênio, e o CO₂ purificado foi posteriormente quantificado por um detector infravermelho não dispersivo (NDIR). As concentrações de carbono foram calculadas a partir de curvas de calibração preparadas com padrões de ftalato ácido de potássio. Para as medições de TOC, o produto comercial fonte de SH foi diluído 1:1000 com água ultrapura, sendo 15 mL utilizados para leitura. Água ultrapura, a mesma utilizada para a diluição da amostra, foi incluída como branco analítico.

A acidez total (AT) foi determinada com hidróxido de bário por titulação potenciométrica, com base na liberação de íons H⁺ a partir dos grupos funcionais (COOH e OH). Para a determinação da AT, 50 mg de substância húmica foram extraídos pela adição de Ba(OH)₂ 0,2 M a 20 mL, a mistura foi agitada e titulada com HCl 0,5 M até que o pH da solução atingisse 8,4. A AT foi calculada de acordo com a equação (Schnitzer e Gupta, 1965):

$$AT = \frac{[(V_b - V_s) \times C \times 1000]}{w} \quad (\text{Eq. 1})$$

Em que: AT representa a acidez total expressa em mmol H⁺ g⁻¹, V_b o volume do branco (mL), V_s o volume da amostra (mL), C a concentração do HCl utilizado (mol L⁻¹) e w a massa da substância húmica (mg).

Um ensaio de descoloração foi utilizado para avaliar a capacidade antioxidante (CA), no qual a oxidação do ABTS com persulfato de potássio gera um radical monocatiônico pré-formado de 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS^{•+}) (Re et al., 1999). Esse radical é então reduzido na presença das substâncias húmicas como antioxidantes doadores de hidrogênio. Todos os extratos húmicos foram ajustados para 50 mg C L⁻¹ em pH 7,00.

Além disso, o substrato húmico utilizado neste estudo, previamente seco por liofilização, foi analisado por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de estado sólido de Carbono-13 utilizando polarização cruzada com rotação no ângulo mágico (RMN ¹³C CP/MAS) conforme descrito previamente por Aquino et al., 2019. O espectro de RMN ¹³C CP/MAS da SH usada no estudo é mostrado na Figura 2.

Tabela 1. Caracterização de substâncias húmicas (SH) derivadas de turfa fornecida como extrato húmico comercial bruto pela DNAgro Biotechnology.

Fonte	COT g L ⁻¹	AT mmol g ⁻¹	CA μM g ⁻¹
Turfa DNAgro	11,7	4,63	201

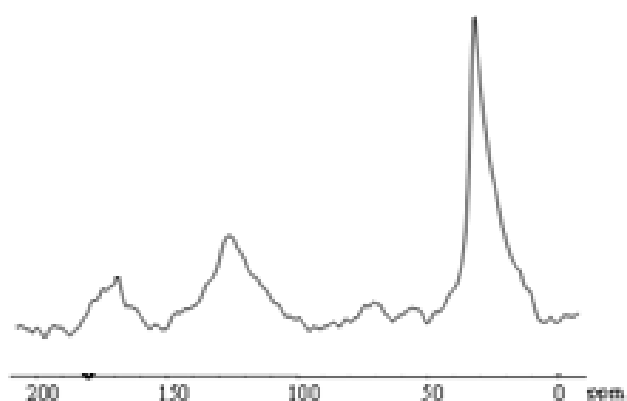


Figura 2. Espectro de RMN ¹³C CP/MAS de substâncias húmicas (SH) derivadas de turfa fornecida como extrato húmico comercial bruto pela DNAgro Biotechnology.

Método de encapsulação

A encapsulação da bactéria selecionada foi realizada pelo método de gelificação iônica relatado por Baldiviezo et al. (2023) com algumas modificações. A suspensão da Hbs+SH, previamente preparada, foi misturada na proporção de 1:2 (v:v), conforme Zago et al. (2019), à solução de alginato de sódio (AlgNa) comercial a 1,5% da Sigma-Aldrich® (Merck, Darmstadt, Alemanha), ou seja, a cada 2 mL de solução de AlgNa, adicionou-se 1 mL da suspensão de Hbs+SH nas diferentes concentrações. Após homogeneização da solução, antes do encapsulamento, uma parte de cada mistura foi separada e armazenada em potes plásticos esterilizados. O restante foi gotejado numa solução de CaCl_2 1,5% usando uma bomba peristáltica BP-202 (Milan®, Colombo/PR, Brasil) com fluxo aproximado de $0,1 \text{ L h}^{-1}$. Ao término do gotejamento, as cápsulas foram mantidas em agitação por cerca de 20 minutos para sua completa solidificação e homogeneização do formato. Posteriormente, foram cuidadosamente lavadas em água ultrapura, removendo o excesso de CaCl_2 . As cápsulas lavadas foram colocadas em pratos de vidro à temperatura ambiente por 72h para desidratação. Após secagem, as amostras de cada tratamento foram embaladas em potes plásticos esterilizados e armazenados em temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$).

Teste de eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação das bactérias foi verificada pelo rendimento de encapsulação (EY). Este rendimento indica o nível de recuperação de bactérias viáveis nas cápsulas após o processo de encapsulação, calculado pela fórmula proposta por Amine et al. (2014):

$$EY = \frac{N_{esfera}}{N_{suspensão}} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Em que: N_{esfera} e $N_{suspensão}$ são, respectivamente, o log de UFC da contagem de células viáveis recuperadas das cápsulas e o log da UFC na suspensão celular inicialmente adicionada à mistura do biopolímero durante a produção das cápsulas, expressas como UFC ml⁻¹.

Para extração do microrganismo encapsulado, foi utilizado o método descrito por He et al. (2015), com modificações. Resumidamente, dissolveu-se 0,5 g das cápsulas secas de cada tratamento em um tubo Falcon contendo 10 mL de tampão fosfato de potássio (0,25M, pH 7,0 ± 0,1). Os tubos foram mantidos em incubadora SHAKER SL-222 (SOLAB®, Piracicaba/SP, Brasil) em agitador orbital a 180 rpm por 24 horas a 30 ± 2°C. Após esse período, para completa solubilização, as cápsulas foram maceradas em almofariz adicionando-se mais 10 mL do tampão fosfato. Ao final da maceração, o material retornou aos tubos Falcon, os quais foram agitados por 1min em vortex PHOENIX AP-56 (TECNAL®, Piracicaba/SP, Brasil). Para a quantificação das bactérias diazotróficas associadas às esferas e na suspensão celular inicialmente adicionada à mistura do biopolímero durante a produção das cápsulas, alíquotas de 1 mL de cada suspensão microbiana foram transferidas para 9 mL de solução salina NaCl a 0,85% (10⁻¹) e submetidas à diluição seriada até 10⁻⁹.

A concentração de bactérias diazotróficas foi determinada de acordo com Döbereiner et al. (1995). Alíquotas de 100 µL da cultura bacteriana das diluições seriadas foram inoculadas em frascos contendo 5 mL de meio semi-sólido JNFb, em triplicata, e incubadas a 30°C por até sete dias. A quantificação foi realizada pelo Número Mais Provável (NMP) baseado na presença ou ausência da película aerotóxica conforme a tabela de probabilidade de McCrady (Pochon e Tardieux, 1962).

Estabilidade de sobrevivência das células bacterianas encapsuladas

As cápsulas secas de cada tratamento foram colocadas em potes plásticos esterilizados, lacrados e armazenados em temperatura ambiente por 9 meses. Ao longo desse período foram realizadas seis coletas do material armazenado (15, 30, 60, 90, 180, 270 dias) para extração e contagem da quantidade de microrganismo ainda presente no meio.

A extração das células bacterianas viáveis das cápsulas foi realizada conforme o método de He et al. (2015), descrito anteriormente. Em seguida, para a quantificação das bactérias totais e das bactérias diazotróficas associadas às cápsulas (Hbs-0, Hbs-50, Hbs-100 e Hbs-150), alíquotas de 1 mL de cada suspensão microbiana foram transferidas para 9 mL de solução salina NaCl a 0,85% (10^{-1}) e submetidas à diluição seriada até 10^{-9} .

A concentração de bactérias totais foi determinada pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Para isso, 100 μ L da cultura bacteriana das diluições seriadas foram semeadas com alça de Drigalski na superfície do meio NB sólido e as placas foram incubadas por 48h. Já a concentração de bactérias diazotróficas foi determinada de acordo com Döbereiner et al. (1995), conforme descrito anteriormente.

Ensaio com plantas – avaliação do crescimento de milho

O ensaio, realizado de 27 de fevereiro a 10 de abril de 2025, foi conduzido em casa de vegetação (21°45'40.3"S 41°17'22.4"W) na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes-RJ, Brasil. Durante o experimento, a temperatura média da casa de vegetação foi de $32 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (dia) e $26 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (noite). As plantas foram expostas a condições naturais de fotoperíodo e cultivadas em dois solos com propriedades físico-químicas e texturas contrastantes (Tabela 2) coletados na camada de 0-20 cm. Os vasos foram preenchidos com o volume de 2,8 L, o que correspondeu a $3,5 \text{ kg vaso}^{-1}$ de Argissolo Amarelo distrocoeso (Adx)

e 2,4 kg vaso⁻¹ de Cambissolo Flúvico distrófico (CXd), de acordo com Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (Santos et al., 2018), coletados em Campos dos Goytacazes na região da Lagoa de Cima (21°44'29.7"S 41°32'02.3"W) e da Baixa Grande (21°56'45.7"S 41°11'12.7"W).

Tabela 2. Características dos solos utilizados no cultivo do milho.

Solo	pH	C Org.	MO	Argila	Silte	Areia	P
		(g dm ⁻³)			(g kg ⁻¹)		(mg dm ⁻³)
Adx	5,1	12,0	20,7	184	97	719	7,0
CXd	4,8	33,0	56,9	482	348	170	165
Solo	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H + Al	V	m
		(mmol _c dm ⁻³)					%
Adx	1,0	13,6	7,5	1,8	26,9	46	7
CXd	2,3	96,3	27,0	3,9	97,5	59	3

pH determinado em água na proporção de 1:2,5 (p/v); P e K⁺: fósforo e potássio disponível determinado pelo extrator Mehlich-1; cálcio trocável (Ca²⁺), magnésio trocável (Mg²⁺) e alumínio (Al³⁺) extraídos com solução de KCl 1 mol L⁻¹; H + Al determinado em extrator Acetato de Cálcio 0,5 mol L⁻¹ a pH 7,0; C Org.: carbono orgânico extraído em solução de dicromato de potássio 0,0667 mol L⁻¹; MO: Matéria orgânica determinada pela equação de Walkley Black (MO = C Org. x 1,724); Argila, silte e areia determinados pelo método de Boyoucos. Todas as metodologias estão descritas em detalhes em Teixeira et al. 2017.

A calagem foi realizada em ambos os solos visando neutralizar o Al³⁺ tóxico, elevar o pH para 5,8 – 6,5 e aumentar os teores de cálcio e magnésio trocável utilizando calcário dolomítico (Omya Agrodol[®], Cachoeiro de Itapemirim/ES, Brasil) (CaO e MgO na proporção de 4:1). Após incorporação do calcário, as amostras de solo foram incubadas por 30 dias, mantendo-se a umidade próxima a 70% da capacidade máxima de retenção de água do solo (CMRA). No plantio do milho, foi fornecido aos solos 0,5 g kg⁻¹ de NPK

10-10-10 (Fertilizantes Heringer, Paulínia/SP, Brasil), correspondendo a uma taxa de aplicação de 100 kg ha^{-1} .

Após a fertilização de semeadura, foram aplicadas $0,148 \text{ g}$ de cápsulas kg^{-1} de solo das cápsulas que estavam armazenadas por 180 dias, proporcionando uma concentração estimada de bactérias de 10^9 UFC kg^{-1} de solo do microrganismo encapsulado. Além disso, foram incluídos dois tratamentos controles no experimento: não inoculado (NI) e inoculado na forma líquida (Hbs-Liq). O inoculante do tratamento Hbs-Liq foi preparado conforme a metodologia descrita anteriormente na seção “Crescimento bacteriano e preparo do inoculante”; resumidamente, após a incubação em agitador orbital e centrifugação, as colônias microbianas foram ressuspensas em água autoclavada e aplicadas logo após o preparo diretamente no sulco de plantio, com auxílio de uma pipeta, assegurando a mesma dose de 10^9 UFC kg^{-1} de solo.

Após o preparo dos vasos, a umidade do solo foi mantida em cerca de 70% CMRA. Cinco sementes de milho (Dekalb DKB 335 PRO 4, Bayer S.A., São Paulo/SP, Brasil) foram semeadas por vaso, e, aos quatro dias após emergência, foi realizado o desbaste, mantendo-se uma planta de milho por vaso. A fertilização de cobertura foi realizada aos 21 dias após o plantio, utilizando $0,5 \text{ g kg}^{-1}$ de solo de NPK 10-10-10. O milho foi cultivado nos dois solos por 40 dias.

Após o cultivo do milho, as plantas foram coletadas, sendo separadas em partes aéreas e raízes, assim como o solo aderido às raízes. Foram realizadas as seguintes análises: (i) microscopia de fluorescência para detecção da estirpe RAM10, (ii) confirmação molecular da presença de *Herbaspirillum seropedicae*, (iii) atividade das enzimas nitrato redutase e malato desidrogenase e (iv) níveis de expressão gênica dos genes *ZmNR* (Redutase do Nitrato), *ZmNAR2* (Assimilação de Nitrato Relacionada 2), *ZmNTR1.2* (Transportador de Nitrato 1.2), *ZmMDH2* (Malato Desidrogenase 2) e *ZmMHA2* (H^+ -ATPase 2) conforme descrição abaixo.

Microscopia eletrônica de fluorescência

Segmentos radiculares com aproximadamente 5 mm de comprimento, provenientes de todos os tratamentos previamente descritos, foram seccionados transversalmente e montados em lâminas histológicas contendo água destilada. As amostras foram cobertas com lamínulas e observadas em microscópio de fluorescência Olympus BX60 com filtro FitC (excitação: 460-490 nm; emissão: 510-550 nm).

Confirmação molecular da presença de *Herbaspirillum seropedicae*

O DNA total foi isolado das raízes de milho utilizando o kit DNeasy PowerSoil Pro (Qiagen), conforme as instruções do fabricante. A concentração e a pureza do DNA foram estimadas por espectrofotometria, utilizando o NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA). A integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v), corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL).

A quantificação do DNA de *Herbaspirillum seropedicae* foi realizada por PCR em tempo real (qPCR), utilizando o par de primers HERBAS1-F e HERBAS1-R (Pereira et al., 2014). As reações foram conduzidas em volume final de 15 µL, contendo 7,5 µL de GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), 0,5 µL de cada primer (10 µM), 3 µL de água ultrapura e 100 ng de DNA extraído. Foram utilizadas placas de reação óptica MicroAmp de 48 poços (Applied Biosystems) e um sistema de PCR em tempo real StepOne (Applied Biosystems). As condições de amplificação consistiram em: etapa inicial de 2 minutos a 50°C, seguida por desnaturação a 95°C por 10 minutos, e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. A especificidade da amplificação foi verificada pela análise da curva de melting dos produtos de PCR, realizada com o software StepOne Real-Time PCR System (versão 2.3, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Para a construção da curva padrão e consequente quantificação absoluta do DNA genômico, utilizou-se uma cultura pura de *H. seropedicae* estirpe RAM10. A extração do DNA total foi realizada pelo método do CTAB 2% (Wilson, 2001). O DNA obtido foi diluído em série decimal em água ultrapura, resultando em concentrações finais variando de 1000 a 0,1 ng. O número de cópias genômicas (m) foi calculado com base no tamanho do genoma da estirpe SmR1 de *H. seropedicae* (5,51 Mbp), conforme descrito por Pedrosa et al. (2011). A eficiência da amplificação foi determinada pela equação:

$$E = (10^{\frac{-1}{s}} - 1) \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

Em que: E representa a eficiência da amplificação (%) e s é o coeficiente angular da curva padrão.

Atividade enzimática da nitrato redutase e malato desidrogenase

A atividade da enzima nitrato redutase foi realizada a partir da coleta de folhas da terça parte de 4 plantas por tratamento. Os tecidos foliares foram cortados em fragmentos (0,3 a 0,5 g), pesados e transferidos para seringas contendo 5 mL da solução de incubação, composta por tampão fosfato 0,05 M (pH 7,5), KNO_3 (0,05 M) e 1% de propanol. As seringas foram submetidas a vácuo (quatro vezes consecutivas) para infiltração do substrato, e mantidas em repouso no escuro por 45 minutos. Após a incubação, foram retiradas alíquotas de 1 mL da solução de cada tratamento (em triplicata), transferidas para tubos de ensaio, e adicionados 1 mL da solução de sulfanilamida a 1% (preparada em HCl 3 M) e 1 mL da solução de N-naftil-etileno-diamina a 0,02% para coloração dos nitritos liberados. A quantificação de NO_2^- foi realizada por espectrofotometria a 540 nm, utilizando uma curva padrão de NaNO_2 (0 a 16 μM). A curva foi preparada a partir de solução estoque de NO_2^- 0,1 mM, com diluições apropriadas em água destilada, sulfanilamida e N-naftil-etileno-diamina. Os resultados foram expressos em termos da concentração de NO_2^- por grama de massa fresca

gerados por hora ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ N-NO}_2^-$), conforme descrito por Majerowicz et al. (2003).

A atividade da enzima malato desidrogenase (NAD^+ -MDH, EC 1.1.1.37), que participa do Ciclo de Krebs e da fixação de CO_2 em plantas, foi determinada em tecidos foliares. Foram utilizados 200 mg de amostras frescas, previamente maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas com 5 mL de tampão de extração composto por Tris-HCl 100 mM (pH 7,8), MgCl_2 20 mM, DTT 1 mM, EDTA 1 mM e PMSF 1 mM. O homogeneizado foi centrifugado a $22.000 \times g$ por 15 minutos a 4°C , e o sobrenadante obtido foi utilizado como extrato enzimático. A reação enzimática foi realizada em uma mistura contendo 3 mL de tampão de reação (Tris-HCl 100 mM, pH 7,8; MgCl_2 20 mM; EDTA 1 mM; NADH 0,1 mM; oxaloacetato 0,5 mM) e 200 μL do extrato. A atividade da MDH foi avaliada pela oxidação do NADH, com leitura da absorbância a 340 nm em espectrofotômetro, conforme descrito por Bergmeyer (1974). A atividade enzimática foi expressa em termos de concentração de NADH oxidado por segundo por miligrama de proteína ($\text{nmol s}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ ptn}$), utilizando a equação:

$$UE \text{ ml}^{-1} = \frac{(\Delta A_{340} \times 3,0 \times df)}{(6,22 \times Ve)} \quad (\text{Eq. 4})$$

Em que: *UE* representa a unidade enzimática, 3,0 o volume total da reação, *df* é o fator de diluição, 6,22 é o coeficiente de extinção molar do NADH a 340 nm, e *Ve* é o volume de extrato enzimático utilizado. A atividade específica foi obtida pela razão entre a unidade enzimática por mililitro.

Nível de transcrição diferencial de genes com RT - qPCR

Extração de RNA e síntese de cDNA: O RNA foi extraído com três réplicas biológicas independentes usando o reagente TRIzol™ (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) conforme descrito pelo fabricante. A análise quantitativa (ng/ μL), de pureza e integridade do RNA apropriadas para RT-qPCR foi confirmada através do Nanodrop1000 (Thermo Scientific,

Nanodrop Products, Wilmington, DE, EUA) e observada em gel de agarose 1,5%. Em seguida, o RNA foi transcrito reversamente para cDNA conforme descrito por Silva et al. (2023) utilizando-se uma alíquota de 1 µg de RNA total com uso do kit de transcrição reversa de cDNA (GoScript™ Reverse Transcriptase) de alta capacidade seguindo as orientações do fabricante (Promega, A5001). A RT-qPCR (PCR quantitativa de transcrição reversa) foi realizada no termociclador Step One Fast Real Time PCR (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) fazendo uso do SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). A reação de PCR foi composta de SYBR Green PCR Master Mix, pares de iniciadores e cDNA molde. Os ciclos foram realizados seguindo as seguintes condições: 2 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 20 segundos a 95°C e 30 segundos a 58°C. Três réplicas técnicas assim como três sínteses independentes de cDNA foram utilizadas em todos os ensaios da RT-qPCR. Os resultados foram analisados estatisticamente com auxílio do software R. O nível relativo de transcrito dos genes de interesse foi normalizado utilizando o gene endógeno tubulina alfa, através do método $2^{-\Delta\Delta CT}$, conforme Livak e Schmittgen (2001). Os iniciadores foram desenhados e validados por ferramentas de bioinformática, (Primer3Plus e NCBI Blast). Os dados gerados em cada programa foram cruzados para definição dos iniciadores com características ideais. Os pares dos iniciadores selecionados foram submetidos à verificação de possíveis dímeros e dobramentos utilizando-se o programa PrimerPremier. As sequências de iniciadores desenhados para observar a expressão diferencial dos genes encontram-se descritas na Tabela 3.

Tabela 3. Iniciadores usados para os estudos de expressão gênica conduzidos neste trabalho na cultura do milho.

Gene	Enzima/função		Sequência de iniciadores	pb
<i>ZmNR1</i>	Redutase do Nitrato	FW	ACAGGGCTTGCCTTGTCTTT	20
		RV	CGACGCGTTACTAGGGTCAA	20
<i>ZmNAR2</i>	Assimilação de Nitrato Relacionada 2	FW	AGGAACTACCGTTTGGTGCT	20
		RV	TCAAGGAACCTGAATTGACTCG	22
<i>ZmNTR1.2</i>	Transportador de Nitrato 1.2	FW	CCGGAGCATGTCTAAGTCTAC	21
		RV	CTCTTCAGTAACTCCTTTGCCC	22
<i>ZmMDH2</i>	Malato Desidrogenase 2	FW	AGTCGTTGCGACAACTGATG	20
		RV	TTCCTTTCCATTCCCTCCTT	20
<i>ZmMHA2</i>	H ⁺ -ATPase 2	FW	CTTCCCTGAACACAAGTACGAG	22
		RV	ACACCATCTCCAGTCATACCA	21
<i>ZmTUB alfa</i>	Tubulina alfa (Controle endógeno)	FW	CCGCACCATCCAGTTCGT	18
		RV	CTGGTAGTTGATTCCGCACTTG	22

FW = forward (sentido 5'-3'), RV = reverse (sentido 3'-5') e pb = número de pares de base.

Análise Estatística

Os dados coletados foram submetidos, inicialmente, aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk), homocedasticidade (Bartlett), aditividade e independência dos resíduos para verificar se as premissas básicas da análise da variância (ANOVA) foram satisfeitas. Satisfeitos os pressupostos, os dados foram submetidos à ANOVA com teste F a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

O teste t de Student foi aplicado para comparar os níveis de transcrição diferencial dos genes avaliados entre os grupos controle e tratado com as cápsulas, e as demais médias foram comparadas pelo método da diferença mínima significativa (LSD) de Fisher ($p < 0,05$).

Os resultados da estabilidade de sobrevivência das células bacterianas encapsuladas foram submetidos à análise de regressão. Para investigar a relação entre os dias de armazenamento e a concentração de bactérias determinada pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) foi ajustado um modelo de decaimento exponencial simples com três parâmetros, o qual melhor explica a dinâmica de sobrevivência das bactérias encapsuladas ao longo do período, de acordo com a equação:

$$Y = y_0 + a.e^{-bx} \quad (\text{Eq. 5})$$

Em que: y_0 é o valor assintótico, a a amplitude inicial e b a taxa de decaimento.

Todas as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software R (versão 4.4.0; R Core Team, 2024) e do SigmaPlot 14.0 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, EUA).

RESULTADOS

Aspectos morfológicos e eficiência de encapsulação

O processo de encapsulação pelo método de gelificação iônica, utilizado para conter *Herbaspirillum seropedicae* estirpe RAM10, resultou na formação de cápsulas homogêneas, de formato esférico e com coloração variando de branco-acinzentado (Figura 3A) no tratamento sem adição de SH, até tons de marrom-claro que se intensificaram à medida que a concentração de SH foi aumentada (Figura 3B, 3C e 3D). Após a secagem em temperatura ambiente, as cápsulas apresentaram formato irregular, superfície enrugada e coloração levemente amarelada na ausência de SH (Figura 3E), enquanto aquelas suplementadas com SH, de modo geral, adquiriram tons marrom-escuro (Figura 3F, 3G e 3H). Nos tratamentos com adição de SH, não foi observado acúmulo de grânulos oriundos da deposição de SH ou qualquer outro componente da formulação, uma vez que estes permaneceram em constante agitação durante o processo de encapsulação.

O aumento da concentração de SH na formulação não promoveu diferenças significativas no tamanho e no peso das cápsulas, que apresentaram diâmetro entre $2,9 \pm 0,1$ e $3,0 \pm 0,1$ mm e peso variando entre $21,7 \pm 0,6$ e $23,3 \pm 1,2$ mg, respectivamente (Tabela 4).

A eficiência de encapsulação (EY) de *H. seropedicae* estirpe RAM10 em cápsulas de AlgNa suplementadas com concentrações crescentes de SH é mostrada na Tabela 4. Foi observada a tendência de redução da EY inicial com o aumento do conteúdo de SH, passando de 92,1% no tratamento Hbs-0 para 91,1% em Hbs-50, atingindo o menor valor em Hbs-100 (77,1%). Entretanto, no tratamento Hbs-150 ocorreu uma ligeira recuperação parcial de EY, alcançando 89,4%.

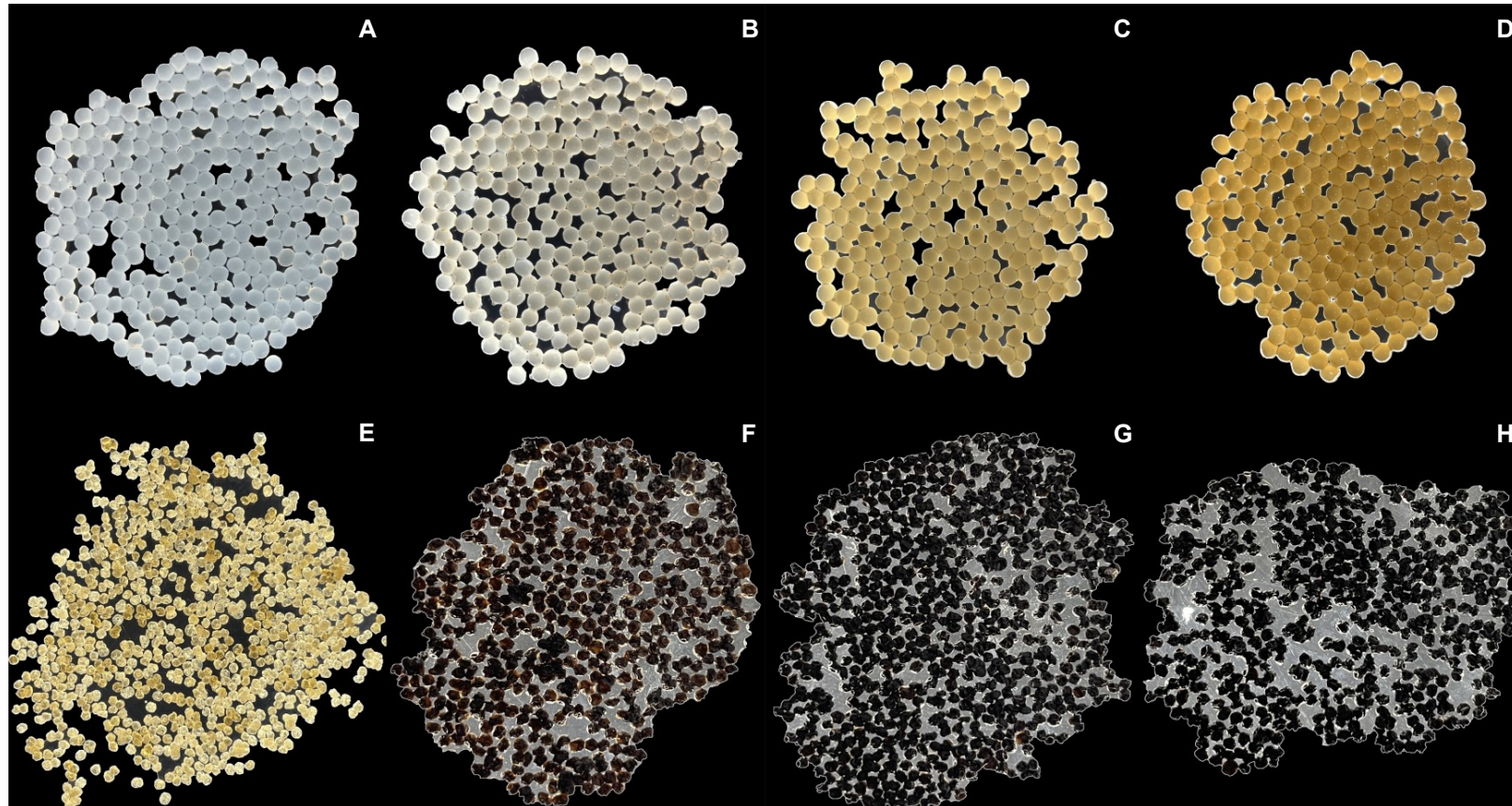


Figura 3. Características visuais das cápsulas de alginato contendo *H. seropedicae* estirpe RAM10 enriquecidas com diferentes concentrações de substâncias húmicas antes e após a desidratação. (A, E) Hbs-0, (B, F) Hbs-50, (C, G) Hbs-100, (D, H) Hbs-150. Hbs-0, Hbs-50, Hbs-100 e Hbs-150 representam as cápsulas enriquecidas com 0, 50, 100 e 150 mg de C L⁻¹ de substâncias húmicas. As imagens foram obtidas com câmera integrada de um smartphone (iPhone 15, Apple) sob iluminação laboratorial.

Tabela 4. Morfologia das cápsulas de alginato enriquecidas com substâncias húmicas obtidas e eficiência de encapsulação inicial (EY) de *H. seropedicae* estirpe RAM10.

Tratamento	Peso (mg)	Diâmetro (mm)	EY (%)
Hbs-0	23,3 a	3,0 a	92,1 a
Hbs-50	21,8 a	2,9 a	91,1 a
Hbs-100	21,7 a	2,9 a	77,1 c
Hbs-150	22,0 a	3,0 a	89,4 b

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem pelo teste de LSD ($p < 0,05$). Hbs-0, Hbs-50, Hbs-100 e Hbs-150 representam as cápsulas de alginato contendo *H. seropedicae* estirpe RAM10 enriquecidas com 0, 50, 100 e 150 mg C L⁻¹ de substâncias húmicas, respectivamente, (Hbs). Diâmetro determinado pelo software ImageJ.

Sobrevivência das células bacterianas encapsuladas

A sobrevivência de células de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe RAM10 encapsuladas em AlgNa suplementadas com diferentes concentrações de SH foi monitorada durante 270 dias de armazenamento à temperatura ambiente (Figura 4). Todos os tratamentos iniciaram o armazenamento com concentrações semelhantes de células bacterianas viáveis ($\sim 10^8$ UFC g⁻¹), mas apresentaram padrões distintos de queda na sobrevivência das células ao longo do tempo.

Nos tratamentos Hbs-0 e Hbs-50 (Figura 4), a perda de viabilidade ocorreu de forma mais gradual, caracterizada por uma curva de decaimento exponencial suave e consistente durante todo o período de avaliação. Em contrapartida, Hbs-100 e Hbs-150 apresentaram uma queda abrupta da sobrevivência nos primeiros 60 dias, saindo de 8,00 para 5,6 log UFC g⁻¹, seguida por uma estabilização a partir de aproximadamente 90 dias. Essa diferença de comportamento sugere que a presença de SH em

concentrações intermediárias a elevadas pode comprometer a integridade das células bacterianas e a estrutura da matriz polimérica em estágios iniciais de armazenamento. Contudo, após o período inicial crítico de 60 dias, ocorre um equilíbrio que permite a manutenção de uma fração estável (57,5 a 76,9%) do total de células viáveis do início do encapsulamento (Tabela 6).

O ajuste matemático das curvas de sobrevivência (Tabela 5) apresentou elevado coeficiente de determinação ($R^2 > 0,91$), evidenciando que os modelos utilizados descrevem adequadamente a dinâmica de sobrevivência bacteriana nas diferentes formulações ($p < 0,001$). De maneira geral, ainda que a taxa de decaimento da sobrevivência das bactérias tenha variado entre os tratamentos, as formulações apresentaram, aos 270 dias, média de sobrevivência de $4,15 \pm 0,5 \log \text{ UFC g}^{-1}$, aproximadamente 10^4 UFC g^{-1} , não apresentando diferenças significativas (Figura 4).

No presente estudo, a encapsulação de *H. seropedicae* estirpe RAM10 em AlgNa suplementado com SH, após 270 dias, apresentou taxa de sobrevivência variando de 48,0 a 58,2% (Tabela 6), com Hbs-150 apresentando a maior taxa, seguida por Hbs-0, Hbs-50 e Hbs-100. Esses resultados evidenciam que, apesar do declínio progressivo da sobrevivência bacteriana ao longo do tempo, todas as formulações avaliadas foram capazes de preservar populações viáveis de *H. seropedicae* estirpe RAM10 por até 270 dias, demonstrando o potencial de eficácia do encapsulamento como uma estratégia promissora para ampliar a estabilidade e sobrevivência de inoculantes microbianos.

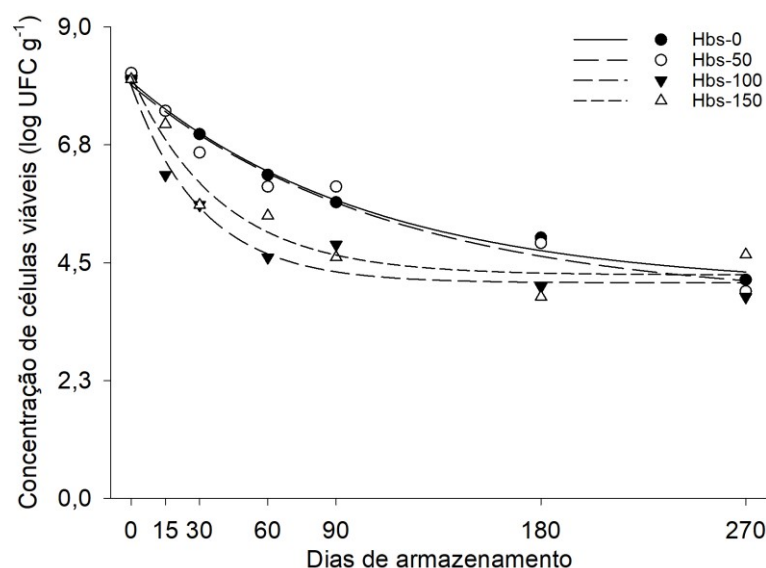


Figura 4. Modelagem matemática das curvas de estabilidade de sobrevivência ao armazenamento prolongado de *H. seropedicae* estirpe RAM10 (Hbs) encapsulada em alginato enriquecido com 0, 50, 100 e 150 mg C L⁻¹ de substâncias húmicas, respectivamente. UFC: unidade formadora de colônias.

Tabela 5. Análise de regressão da variável estabilidade de sobrevivência em função dos dias de armazenamento das cápsulas de acordo com os tratamentos avaliados.

Tratamentos	Modelo de regressão	R ² (%)	P	P dos coeficientes		
				y ₀	a	b
Hbs-0	$Y = 4,0246 + 3,9328 e^{(-0,0095x)}$	98,7	<0,0001**	<0,0001	<0,0001	0,0036
Hbs-50	$Y = 3,7673 + 4,1233 e^{(-0,0087x)}$	94,7	0,0012**	0,0035	0,0018	0,0498
Hbs-100	$Y = 4,1163 + 3,7638 e^{(-0,0320x)}$	94,7	0,0013**	<0,0001	0,0005	0,0124
Hbs-150	$Y = 4,2661 + 3,7948 e^{(-0,0256x)}$	91,7	0,0031**	0,0001	0,0012	0,0283

** significativo a 1%. Hbs-0, Hbs-50, Hbs-100 e Hbs-150 representam as cápsulas de alginato contendo *H. seropedicae* estirpe RAM10 enriquecidas com 0, 50, 100 e 150 mg C L⁻¹ de substâncias húmicas, respectivamente.

Tabela 6. Eficiência de encapsulação (EY) de *H. seropedicae* estirpe RAM10 em cápsulas de alginato enriquecido com substância húmica ao longo do período de armazenamento.

Tratamentos	EY (%)					
	15	30	60	90	180	270
Hbs-0	92±0,69 a	87±0,65 a	77±0,58 a	70±0,53 b	62±0,47 a	52±0,39 b
Hbs-50	91±0,59 ab	81±0,52 b	73±0,47 b	73±0,47 a	60±0,39 b	49±0,31 c
Hbs-100	77±0,32 c	70±0,29 c	58±0,24 d	61±0,25 c	51±0,21 c	48±0,20 c
Hbs-150	89±0,55 b	70±0,43 c	68±0,41 c	58±0,35 d	48±0,29 d	58±0,36 a

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem pelo teste de LSD ($p < 0,05$). Hbs-0, Hbs-50, Hbs-100 e Hbs-150 representam as cápsulas de alginato contendo *H. seropedicae* estirpe RAM10 enriquecidas com 0, 50, 100 e 150 mg C L⁻¹ de substâncias húmicas, respectivamente.

Deteção da estirpe RAM10 por microscopia de fluorescência em raízes e quantificação molecular de *H. seropedicae*

Após a inoculação no solo das cápsulas de alginato com 180 dias de armazenamento o milho foi cultivado por 40 dias. Após esse período, segmentos de raízes foram obtidos para a observação da presença da estirpe RAM10 por microscopia de fluorescência.

Com a observação das imagens coletadas pelo microscópio em diferentes regiões anatômicas do material vegetal tratado com as cápsulas contendo a bactéria, a intensidade de fluorescência da RAM10 foi facilmente distinguida da autofluorescência das células das raízes e os resultados encontram-se descritos nas Figuras 6, 7, 8 e 9.

De modo geral, a colonização bacteriana pela RAM10 foi intensa e predominou em regiões meristemáticas (Figuras 7E, 7F), na base dos pelos radiculares e das raízes laterais (Figuras 6E, 6F, 7A, 7B, 8C, 8D, 8E, 8F, 9C, 9D), nas junções das paredes celulares epidérmicas (Figuras 7E, 7F, 9E, 9F) e em cavidades formadas a partir da ruptura de células epidérmicas

decorrente da emergência das raízes laterais, constituindo uma abertura natural por meio da qual ocorre a penetração passiva e a colonização endofítica (Figuras 6C, 6D, 9A e 9B). Na Figura 7C e 7D, observa-se a colonização predominante nas regiões de emergência de raízes laterais, a qual resultou na infecção endofítica do feixe vascular da raiz.

O rendimento total da bactéria *H. seropedicae* associadas às raízes de plântulas de milho, estimado por meio da quantificação molecular via PCR em tempo real, foi semelhante entre os tratamentos. Não foram observadas diferenças significativas entre a comunidade bacteriana nativa presente no controle (NI) e as plantas inoculadas com a estirpe RAM10, tanto na forma encapsulada (Hbs-0, Hbs-50, Hbs-100 e Hbs-150) quanto como inoculante líquido (Hbs-Liq), em ambos os solos (Figura 5).

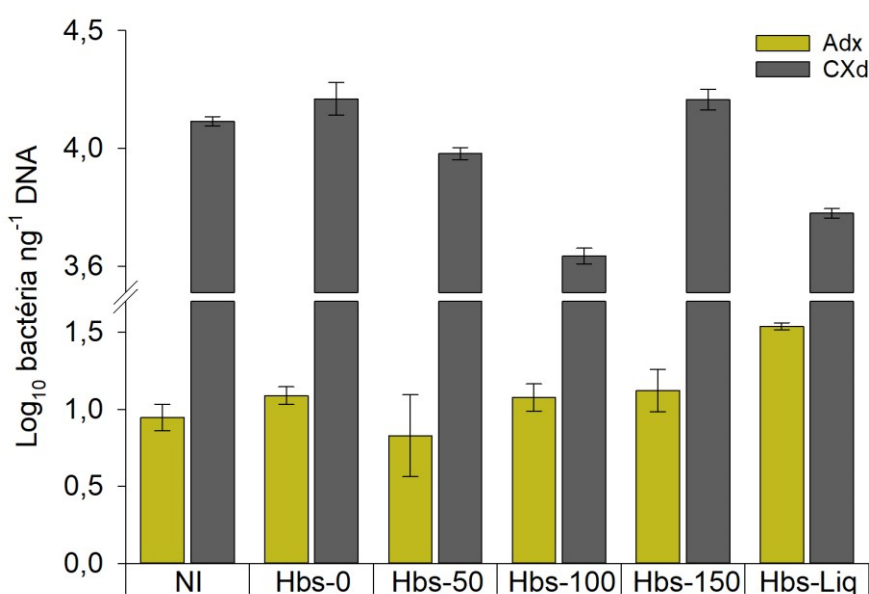


Figura 5. Valores de quantificação de bactérias (expressos como log₁₀) associados às raízes de milho cultivado em solos contrastantes submetido aos tratamentos: plantas não inoculadas (NI); cápsulas de alginato contendo *H. seropedicae* estirpe RAM10 enriquecidas com 0, 50, 100 e 150 mg C L⁻¹ de substâncias húmicas (Hbs-0, Hbs-50, Hbs-100 e Hbs-150, respectivamente), e inoculação direta com estirpe RAM10 (Hbs-Liq). Quantificação molecular de *H. seropedicae* via PCR em tempo real (n=4). As barras representam a média ± o erro-padrão.

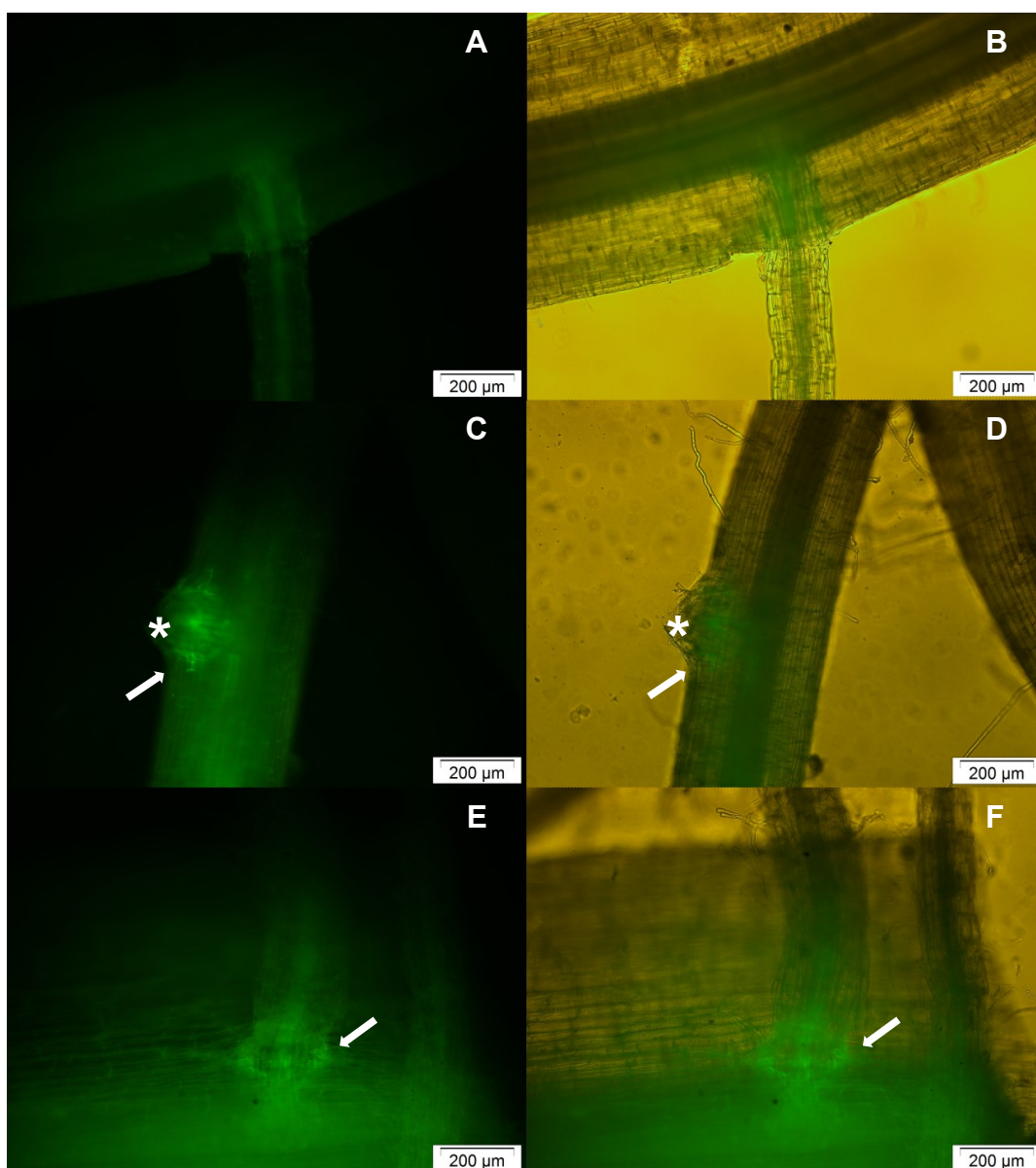


Figura 6. Microscopia de fluorescência (A, C, E) e microscopia de campo claro (B, D, F) da interação entre *H. seropedicae* estirpe RAM10 e raízes de plantas de milho cultivadas em Argissolo Amarelo distrocoeso (Adx) submetido aos tratamentos: (A, B) plantas não inoculadas (NI); (C, D) cápsulas de alginato contendo *H. seropedicae* estirpe RAM10 sem adição de substâncias húmicas (Hbs-0); (E, F) cápsulas de alginato contendo *H. seropedicae* estirpe RAM10 enriquecidas com 50 mg C L⁻¹ de substâncias húmicas (Hbs-50). (C, D) Infecção bacteriana por meio da cavidade (setas) resultante da ruptura de células epidérmicas durante a emergência de raízes laterais (asterisco). (E, F) Colonização predominante das regiões de emergência de raízes laterais (setas).

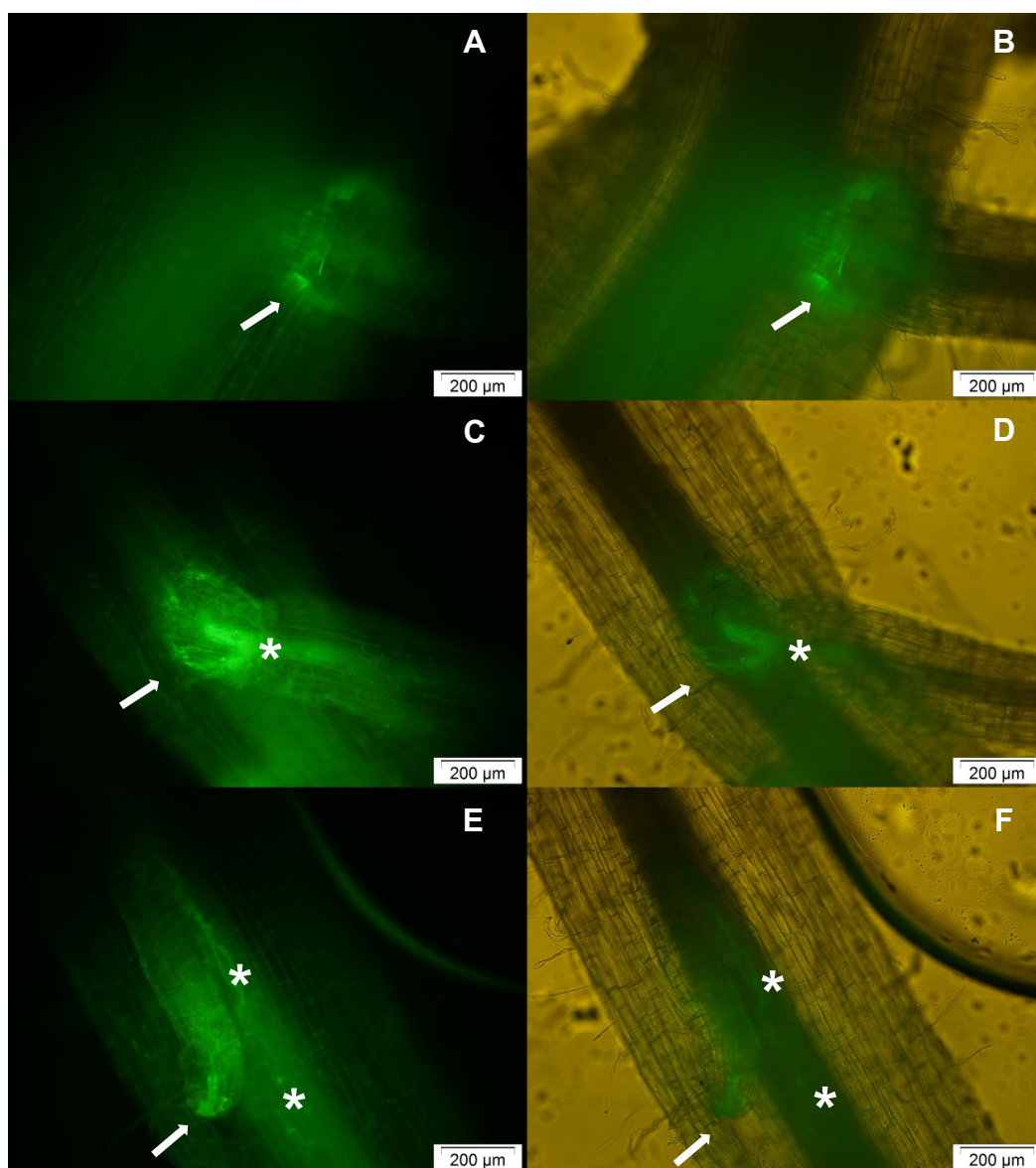


Figura 7. Microscopia de fluorescência (A, C, E) e microscopia de campo claro (B, D, F) da interação entre *H. seropedicae* estirpe RAM10 e raízes de plantas de milho cultivadas em Argissolo Amarelo distrocoeso (Adx) submetido aos tratamentos: (A, B) cápsulas de alginato contendo *H. seropedicae* estirpe RAM10 enriquecidas com 100 mg C L^{-1} de substâncias húmicas (Hbs-100); (C, D) cápsulas de alginato contendo *H. seropedicae* estirpe RAM10 enriquecidas com 150 mg C L^{-1} de substâncias húmicas (Hbs-150); (E, F) inoculação direta com estirpe RAM10 (Hbs-Liq). (A, B, C, D) Colonização predominante nas regiões de emergência de raízes laterais (setas) resultando na infecção endofítica do feixe vascular (asterisco). (E, F) Colonização na zona meristemática de raízes laterais (seta) e nas junções das paredes das células epidérmicas (asteriscos).

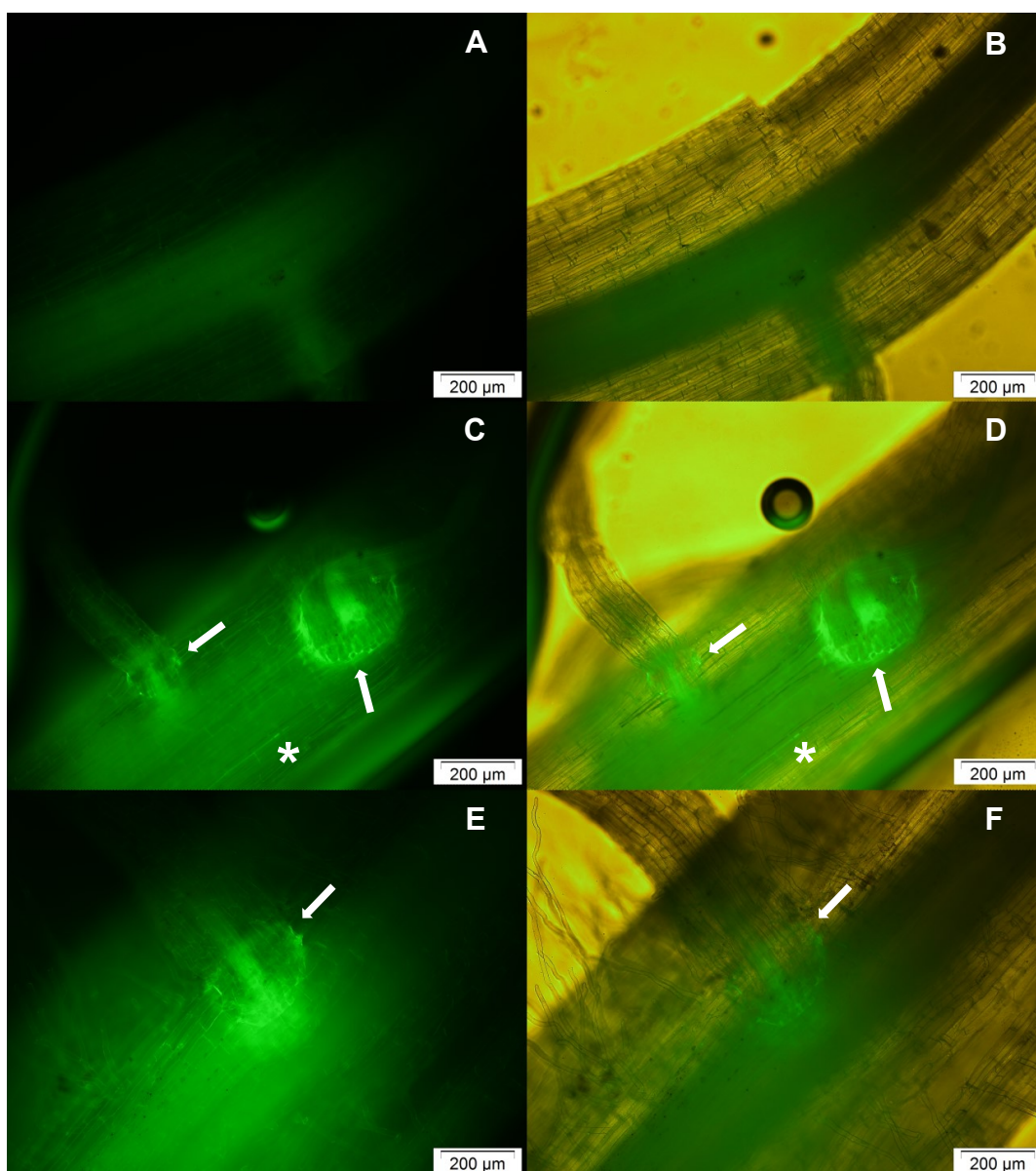


Figura 8. Microscopia de fluorescência (A, C, E) e microscopia de campo claro (B, D, F) da interação entre *H. seropedicae* estirpe RAM10 e raízes de plantas de milho cultivadas em Cambissolo Flúvico distrófico (CXd) submetido aos tratamentos: (A, B) plantas não inoculadas (NI); (C, D) cápsulas de alginato contendo *H. seropedicae* estirpe RAM10 sem adição de substâncias húmicas (Hbs-0); (E, F) cápsulas de alginato contendo *H. seropedicae* estirpe RAM10 enriquecidas com 50 mg C L⁻¹ de substâncias húmicas (Hbs-50). (C, D, E, F) Colonização preferencial nas regiões de emergência de raízes laterais (setas) e nas junções das paredes das células epidérmicas (asteriscos).

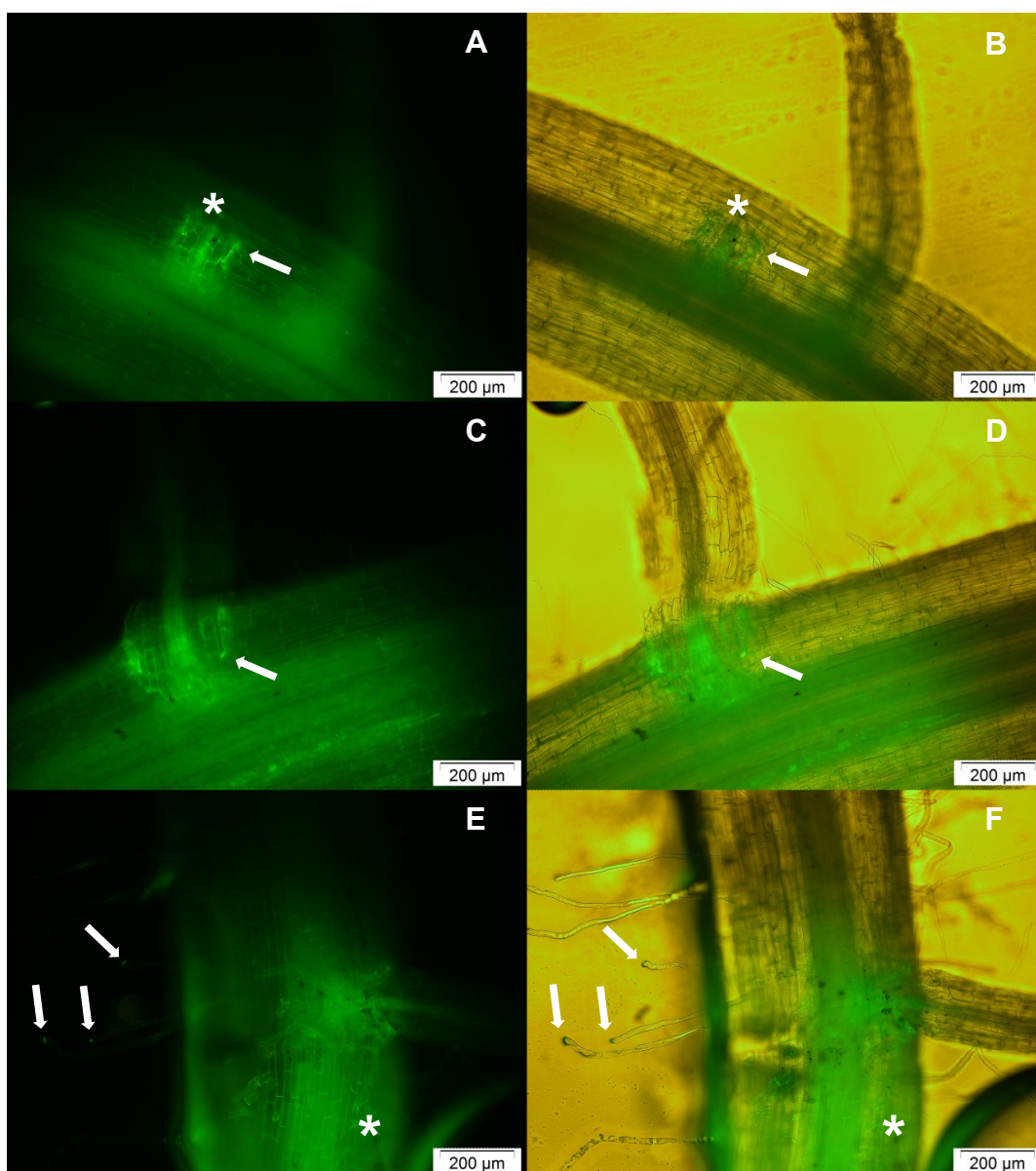


Figura 9. Microscopia de fluorescência (A, C, E) e microscopia de campo claro (B, D, F) da interação entre *H. seropedicae* estirpe RAM10 e raízes de plantas de milho cultivadas em Cambissolo Flúvico distrófico (CXd) submetido aos tratamentos: (A, B) cápsulas de alginato contendo *H. seropedicae* estirpe RAM10 enriquecidas com 100 mg C L^{-1} de substâncias húmicas (Hbs-100); (C, D) cápsulas de alginato contendo *H. seropedicae* estirpe RAM10 enriquecidas com 150 mg C L^{-1} de substâncias húmicas (Hbs-150); (E, F) inoculação direta com estirpe RAM10 (Hbs-Liq). (A, B) Infecção bacteriana por meio da cavidade (setas) resultante da ruptura de células epidérmicas durante a emergência de raízes laterais (asterisco). (C, D) Colonização preferencial nas regiões de emergência de raízes laterais (setas). (E, F) Bactérias colonizando

preferencialmente as junções das paredes das células epidérmicas (asteriscos) e as extremidades dos pelos radiculares (setas).

Parâmetros biométricos e atividade enzimática da nitrato redutase e da malato desidrogenase

Após 40 dias de cultivo, as plântulas de milho cultivadas nos solos inoculados com as cápsulas de alginato e com inoculante líquido não apresentaram alterações significativas no diâmetro do colmo (DC), altura de planta (AP) e massa fresca do sistema radicular (MFSR), independentemente do tipo de solo (Tabela 7). O DC apresentou média geral de $15,6 \pm 0,20$ mm (Adx) e $14,4 \pm 0,12$ mm (CXd), a AP de $118,1 \pm 2,18$ cm (Adx) e $111,3 \pm 1,42$ cm (CXd) e a MFSR de $38,1 \pm 1,61$ g (Adx) e $36,8 \pm 1,43$ g (CXd). Já a massa fresca da parte aérea (MFPA) nas plantas cultivadas no solo CXd e o comprimento do sistema radicular (CSR) em ambos os solos apresentaram diferenças estatísticas relevantes entre os tratamentos.

No solo CXd, plantas tratadas com o inoculante líquido (Hbs-Liq) apresentaram maior acúmulo de MFPA ($162,3 \pm 7,00$ g) em comparação aos demais tratamentos, que oscilaram entre $132,0 \pm 6,56$ e $142,0 \pm 4,65$ g. O mesmo resultado é observado para o CSR no solo Adx, onde as plantas tratadas com Hbs-Liq apresentaram comprimento de raiz significativamente maior ($77,3 \pm 2,84$ cm). Por outro lado, no solo CXd o comprimento do sistema radicular nas plantas não inoculadas (NI) foi significativamente menor do que nas plantas inoculadas com *H. seropedicae* estirpe RAM10 encapsuladas (Hbs-0, Hbs-50, Hbs-100 e Hbs-150) ou como inoculante líquido (Hbs-Liq). O aumento no CSR na média geral dos demais tratamentos foi de aproximadamente 28% frente ao controle NI ($75,8 \pm 4,41$ cm vs $59,3 \pm 5,02$ cm). Em ambos os solos, a superioridade no CSR não se refletiu no aumento da massa fresca do sistema radicular (MFSR).

Ao final do ensaio, segmentos foliares foram coletados e as atividades da nitrato redutase (NR) e malato desidrogenase (MDH) foram analisados. A

aplicação das cápsulas contendo *H. seropedicae* estirpe RAM10 enriquecida com substâncias húmicas, promoveu significativamente a atividade da NR e MDH em ambos os solos. Os resultados são mostrados na Figura 10.

No solo Adx, a atividade na NR nas plantas não inoculadas foi de $0,06 \mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1} \text{N-NO}_2^-$. A inoculação com Hbs-150 e Hbs-Liq promoveu as maiores atividades da enzima, atingindo $0,16$ e $0,15 \mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1} \text{N-NO}_2^-$ correspondendo a aumentos de 2,7 e 2,5 vezes em relação ao controle, enquanto Hbs-50 e Hbs-100 aumentaram 1,8 vezes e Hbs-0 1,5 vezes. No solo CXd, por outro lado, a maior atividade da NR foi observada em plantas inoculação com as cápsulas Hbs-50 e Hbs-100 em relação aos demais tratamento, partindo de $0,14 \mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1} \text{N-NO}_2^-$ no controle NI para $0,21$ e $0,20 \mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1} \text{N-NO}_2^-$, respectivamente. Nos demais inoculantes (Hbs-0, Hbs-150 e Hbs-Liq) a atividade permaneceu próxima à do controle (Figura 10a).

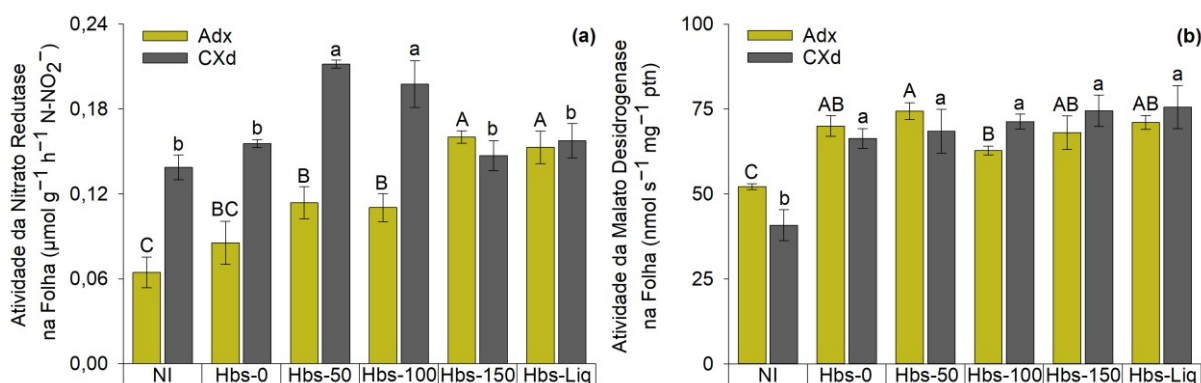


Figura 10. Resposta da atividade enzimática da nitrato redutase (a) e malato desidrogenase (b) em folhas de milho cultivado em solos contrastantes submetido aos tratamentos: plantas não inoculadas (NI); cápsulas de alginato contendo *H. seropedicae* estirpe RAM10 enriquecidas com 0, 50, 100 e 150 mg C L⁻¹ de substâncias húmicas (Hbs-0, Hbs-50, Hbs-100 e Hbs-150, respectivamente), e inoculação direta com estirpe RAM10 (Hbs-Liq). Barras com erro-padrão seguidas pela mesma letra maiúscula ou minúscula não diferem entre si, respectivamente para o Argissolo Amarelo distrocoeso (Adx) e para o Cambissolo Flúvico distrófico (CXd), conforme o teste de LSD ($p < 0,05$).

Tabela 7. Parâmetros biométricos de desenvolvimento do milho em resposta à aplicação das cápsulas.

Tratamento	DC (mm)	AP (cm)	MFPA (g)	CSR (cm)	MFSR (g)
Argissolo Amarelo distrocoeso (Adx)					
NI	15,6 ±0,18	120,3 ±3,45	153,5 ±7,24	64,3 ±4,29 B	32,5 ±1,66
Hbs-0	15,5 ±0,70	116,8 ±5,68	155,3 ±6,98	57,5 ±2,96 B	34,5 ±5,48
Hbs-50	15,8 ±0,65	116,8 ±8,50	160,0 ±2,27	61,0 ±3,67 B	42,8 ±1,75
Hbs-100	15,7 ±0,39	121,3 ±3,38	168,5 ±4,50	57,0 ±3,08 B	44,3 ±3,47
Hbs-150	15,7 ±0,55	113,8 ±5,60	147,8 ±1,49	64,5 ±4,29 B	41,5 ±4,44
Hbs-Liq	15,2 ±0,63	120,0 ±6,82	159,0 ±6,65	77,3 ±2,84 A	33,0 ±2,04
Cambissolo Flúvico distrófico (CXd)					
NI	14,1 ±0,41	107,0 ±1,47	132,0 ±6,56 b.	59,3 ±5,02 b	31,0 ±5,49
Hbs-0	14,1 ±0,35	114,0 ±4,76	139,8 ±6,51.b	70,5 ±4,19 ab	37,0 ±2,74
Hbs-50	14,3 ±0,06	110,0 ±3,74	142,0 ±4,65.b	80,3 ±5,79 a	37,5 ±0,29
Hbs-100	14,6 ±0,23	112,5 ±4,01	137,5 ±5,68.b	79,5 ±6,09 a	41,8 ±2,29
Hbs-150	14,9 ±0,35	109,8 ±4,48	138,3 ±5,09.b	79,8 ±3,09 a	38,3 ±3,94
Hbs-Liq	14,4 ±0,27	114,5 ±2,10	162,3 ±7,00 a	68,8 ±2,90 ab	35,3 ±3,84

DC: diâmetro de colmo foi determinado utilizando paquímetro digital de aço 150 mm/6" (Starrett®, Itu/SP, Brasil); AP e CSR: altura de planta e comprimento do sistema radicular mensurados com fita métrica de 5 m x 25 mm (Fertak Tools, Serra/ES, Brasil); MFPA e MFSR: massa fresca da parte aérea e do sistema radicular foram obtidos por meio de balança eletrônica digital (Wellmix®, São Paulo/SP, Brasil). Todos os resultados são apresentados como média acompanhada do erro-padrão. Médias com erro-padrão seguidas pela mesma letra maiúscula ou minúscula, dentro de cada coluna, não diferem entre si, respectivamente para o Argissolo Amarelo distrocoeso (Adx) e para o Cambissolo Flúvico distrófico (CXd), conforme o teste de LSD ($p < 0,05$).

Na atividade da MDH, no solo Adx, o maior aumento foi observado nas plantas inoculadas com as cápsulas Hbs-50 ($74,4 \text{ nmol s}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ ptn}$) em comparação ao controle NI ($52,2 \text{ nmol s}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ ptn}$). Os demais tratamentos (Hbs-0, Hbs-100, Hbs-150 e Hbs-Liq) apresentaram valores intermediários,

variando de 62,8 a 71,1 $\text{nmol s}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{ptn}$, não diferindo estatisticamente entre si. Por outro lado, no solo CXd, o aumento promovido na atividade da MDH pela inoculação das cápsulas não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, apenas em relação ao controle NI que obteve a menor média (40,8 $\text{nmol s}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{ptn}$) enquanto no solo tratado a atividade variou de 66,4 a 75,6 $\text{nmol s}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{ptn}$, aumento expressivo de 62,7% a 85,3% (Figura 10b).

Nível de transcrição diferencial dos genes avaliados

Os genes *ZmNR* (Redutase do Nitrato), *ZmNAR2* (Assimilação de Nitrato Relacionada 2), *ZmNTR1.2* (Transportador de Nitrato 1.2), *ZmMDH2* (Malato Desidrogenase 2) e *ZmMHA2* (H^+ -ATPase 2) foram utilizados para verificar a resposta genética do metabolismo de plântulas de milho inoculadas com Hbs-0, Hbs-50, Hbs-100, Hbs-150 e Hbs-Liq, e sua expressão relativa é demonstrada na Figura 11.

A análise dos níveis de transcrição diferencial dos genes por RT-qPCR evidencia que a inoculação de plântulas de milho com *H. seropedicae* estirpe RAM10 encapsuladas em alginato, em associação ou não a substâncias húmicas, promoveu o aumento no acúmulo de transcritos nas folhas das plantas avaliadas, com respostas distintas entre o Argissolo Amarelo distrocoeso (Adx) e o Cambissolo Flúvico distrófico (CXd).

Os genes *ZmNR*, *ZmNAR2* e *ZmNRT1.2* estão diretamente relacionados aos processos de assimilação do nitrogênio. Na figura 11, é observado que, no solo Adx, apenas o gene *ZmNR* em plantas inoculadas com Hbs-50 apresentou aumento significativo ($p < 0,05$) no nível de transcrição dos genes em relação ao controle não inoculado (NI). Já no solo CXd, o nível de transcrição permaneceu significativamente ($p < 0,05$) maior do que o controle NI em Hbs-100 e Hbs-Liq para o gene *ZmNR* e Hbs-0 para o gene *ZmNAR2*.

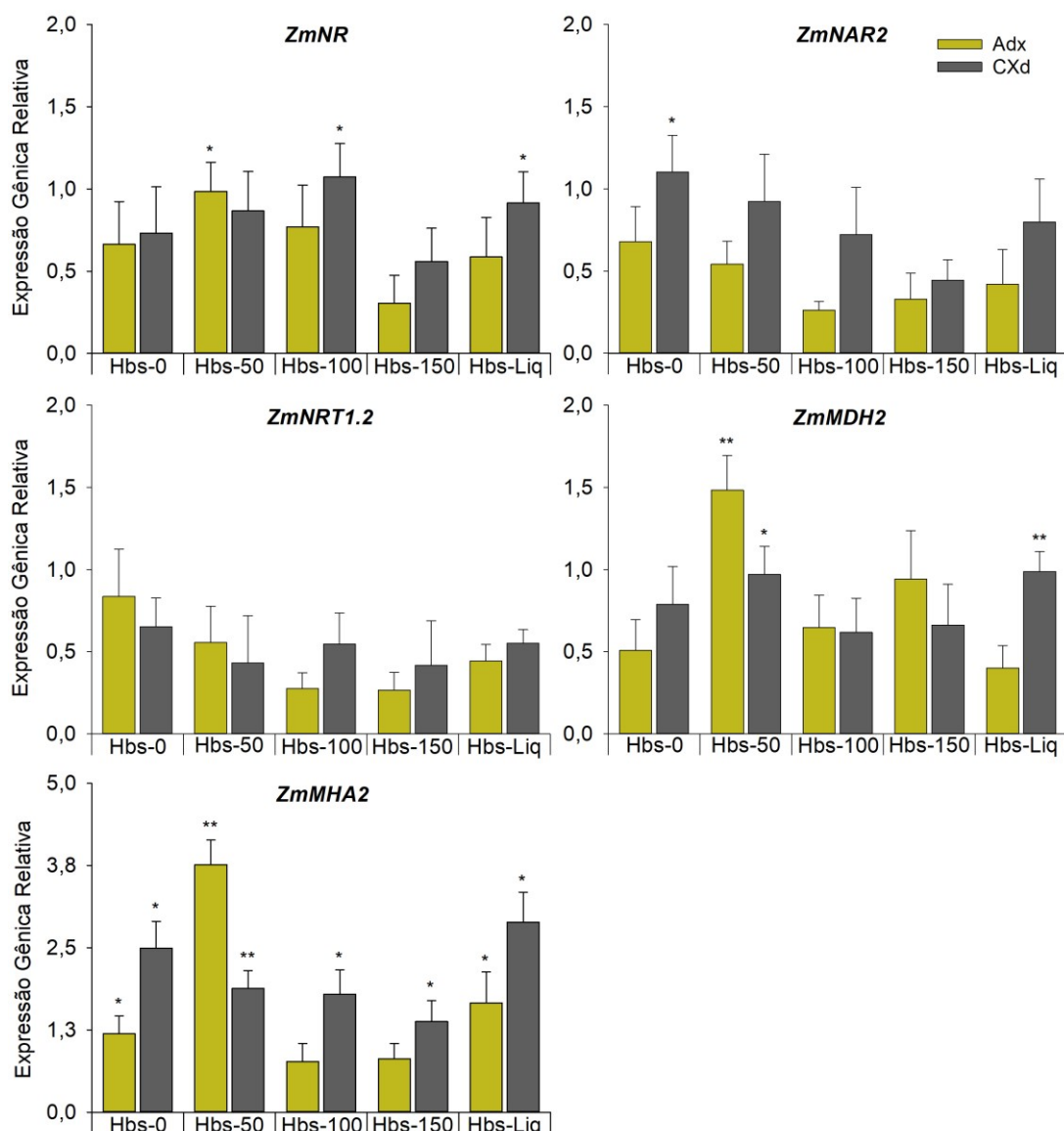


Figura 11. Transcrição diferencial dos genes *ZmNR* (Redutase do Nitrato), *ZmNAR2* (Assimilação de Nitrato Relacionada 2), *ZmNTR1.2* (Transportador de Nitrato 1.2), *ZmMDH2* (Malato Desidrogenase 2) e *ZmMHA2* (H⁺-ATPase 2), avaliada por RT-qPCR em folhas de milho cultivado em solos contrastantes submetido aos tratamentos: plantas não inoculadas (controle); cápsulas de alginato contendo *H. seropedicae* estirpe RAM10 enriquecidas com 0, 50, 100 e 150 mg C L⁻¹ de substâncias húmicas (Hbs-0, Hbs-50, Hbs-100 e Hbs-150), e inoculação direta com estirpe RAM10 (Hbs-Liq). A expressão foi normalizada em relação ao tratamento NI (NI=1). Barras com erro-padrão da média, seguidas por * e ** apresentam diferenças significativas em $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente pelo teste t de Student. Argissolo Amarelo distrocoeso (Adx) e Cambissolo Flúvico distrófico (CXd).

O gene *ZmMDH2*, responsável por codificar a enzima malato desidrogenase, que integra o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), apresentou forte indução nos níveis de transcrição do gene no solo Adx inoculado com Hbs-50 ($p < 0,01$). Já no solo CXd, o aumento foi menor sendo significativamente maior que o controle NI em Hbs-50 ($p < 0,05$) e Hbs-Liq ($p < 0,01$).

Por fim, o gene *ZmMHA2*, que codifica a bomba de prótons da membrana plasmática, apresentou a resposta mais expressiva frente aos tratamentos, quando comparado aos demais genes avaliados. No solo CXd, todos os tratamentos promoveram aumento significativo ($p < 0,05$ e $p < 0,01$) no nível de transcrição do gene *ZmMHA2*, com o tratamento Hbs-Liq apresentando o maior nível de expressão, aproximadamente 3,0 vezes maior que o controle NI. No solo Adx, entretanto, a inibição do gene *ZmMHA2* foi observada em Hbs-100 e Hbs-150, enquanto Hbs-50 apresentou aumento significativo ($p < 0,01$) nos níveis de transcrição do gene, de aproximadamente 4 vezes em relação ao controle NI.

DISCUSSÃO

O uso combinado de substâncias húmicas (SH) e bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) como um veículo transportador para promover a aptidão do microrganismo no contínuo solo-rizosfera-plantas ainda é pouco explorado. O objetivo deste trabalho foi avaliar a sobrevivência durante o tempo de armazenamento de uma bactéria diazotrófica endofítica, isto é, de vida obrigatória no interior do hospedeiro. Para aumentar a sobrevivência, foi realizada a encapsulação de *H. seropedicae* estirpe RAM10 em alginato de sódio enriquecido com SH. As cápsulas de alginato podem preservar as bactérias e liberar células viáveis no solo por mais tempo, uma vez que a meia-vida da bactéria encapsulada no interior do alginato é de 14 anos, de acordo com Bashan e Gonzalez (1999).

Neste estudo, foi utilizada a técnica de encapsulação por gelificação iônica, um método de aplicação simples e rápido, que permite a formação imediata das cápsulas. Foram obtidos encapsulados homogêneos, com tamanho aproximado de 3 mm, formato esférico e com coloração variando de branco-acinzentado até tons de marrom-claro, de acordo com o aumento da concentração de SH. Após a secagem, as cápsulas apresentaram formato irregular, superfície enrugada, coloração variando de levemente amarelada a marrom-escuro e eficiência de encapsulamento (EY) superior a 77% (Figura 3; Tabela 4). De modo geral, as EY obtidas foram superiores às relatadas anteriormente (Zago et al., 2019), estando dentro da faixa recomendada de 10^7 a 10^9 UFC g⁻¹ (Malusá e Vassilev, 2014). O encapsulamento ocorre em milissegundos após a matriz ser gotejada sobre uma solução endurecedora de cloreto de cálcio, quando os íons de Ca²⁺ reagem com o AlgNa, originando uma rede tridimensional rígida de hidrogéis (Chan et al., 2011; Vemmer e Patel, 2013; Wu et al., 2014; Berninger et al., 2015). A forma e o tamanho das cápsulas obtidas podem estar atribuídos ao fato de que a adição de SH à formulação não alterou a viscosidade da solução de gotejamento, como observado anteriormente por He et al. (2015) e Rohman et al. (2020), uma vez que suas características morfológicas dependem diretamente de fatores como a composição e a viscosidade da formulação, a

concentração e a velocidade de agitação da solução de cloreto de cálcio, o diâmetro e a vazão no bico de gotejamento e a distância do bico ao banho de gelificação (Ouwerx et al. 1998; Blandino et al., 1999; Gouin, 2004; Shima et al., 2006). Tais parâmetros foram padronizados e adequadamente ajustados à metodologia empregada.

Os resultados revelaram que, apesar do declínio progressivo da sobrevivência bacteriana ao longo do tempo, todas as formulações avaliadas foram capazes de preservar populações viáveis de *H. seropedicae* estirpe RAM10 a uma concentração média de 10^4 UFC g⁻¹ aos 270 dias. Com isso, as cápsulas de AlgNa enriquecidas com SH preservaram a sobrevivência dos microrganismos encapsulados a uma taxa de eficiência variando entre 48% e 58% aos 270 dias de armazenamento. Yu et al. (2010), ao estudar a microencapsulação de bactérias gram-negativas pelo método de secagem por atomização, encontraram taxa de sobrevivência de bactérias dentro do alginato variando entre 57,8% e 84,6% aos 180 dias, resultados convergem com os obtidos neste estudo, uma vez que, neste mesmo intervalo, a taxa de sobrevivência encontrada variou entre 48% e 62%.

Em contraposição aos resultados de sobrevivência obtidos neste estudo, Young et al. (2006) e Mousa et al. (2024) relataram que, ao encapsular bactérias do gênero *Bacillus* spp em cápsulas de AlgNa suplementadas com SH, observou-se mínima perda de sobrevivência celular após cinco meses de armazenamento, evidenciando maior estabilidade desse sistema. Essa perda mínima pode estar ligada à capacidade das bactérias deste gênero em formar estruturas de sobrevivência (endósporos), que lhes conferem maior sobrevivência natural. Por outro lado, Zago et al. (2019), ao avaliar a encapsulação de *Azospirillum brasilense* AbV5 em formulações semelhantes, observaram que, após 90 dias, a concentração de células viáveis foi reduzida para cerca de 10^5 UFC g⁻¹, resultado que corrobora as tendências de sobrevivência de *H. seropedicae* estirpe RAM10 registradas pela formulação utilizada na produção das cápsulas neste estudo, uma vez que aos 90 dias a concentração de células viáveis encontradas no encapsulado atingiu valores similares.

Por meio de técnicas de microscopia de fluorescência, foi verificada a viabilidade da bactéria *H. seropedicae* estirpe RAM10 encapsulada por 180 dias em alginato enriquecido com SH, comparando-a com a colonização das raízes de milho de um inoculante recém-preparado em laboratório. A partir da observação das imagens, constatou-se que as cápsulas preservaram a viabilidade da estirpe RAM10 encapsulada, visto que, sua capacidade de fluorescência foi facilmente distinguida, equiparando-se ao inoculante recentemente preparado. A colonização bacteriana pela RAM10 foi intensa e predominou em regiões meristemáticas, na base dos pelos radiculares e raízes laterais, em junções das paredes celulares epidérmicas e em cavidades formadas a partir da ruptura de células epidérmicas decorrente da emergência das raízes laterais, resultando na penetração passiva e colonização endofítica do feixe vascular da raiz. Tais regiões são amplamente descritas na literatura como sítios preferenciais de infecção por *H. seropedicae* em associação com plantas da família Poaceae (James e Olivares, 1997; James et al., 2002; Roncato-Maccari et al., 2003; Monteiro et al., 2008). Essa preferência pode ser explicada pela presença de elevados teores de pectina e cálcio, que favorecem a adesão bacteriana, uma vez que íons Ca^{2+} formam uma película positiva sobre a superfície da raiz, facilitando o contato com bactérias carregadas negativamente (Baldotto et al., 2011b).

A expressão relativa de *ZmMHA2* nas plantas de milho tratadas com as cápsulas apresentou transcrição aumentada em todos os tratamentos avaliados, chegando a valores até quatro vezes superiores em plantas tratadas com cápsulas de AlgNa enriquecidas com 50 mg C L⁻¹. O gene *ZmMHA2* é responsável por codificar a síntese da enzima H^+ -ATPase, que desempenha um papel central no metabolismo vegetal, uma vez que sua atividade gera um gradiente eletroquímico nas membranas celulares necessário para a translocação de íons, sendo fundamental para a absorção de macro e micronutrientes, fornecendo força motriz para a absorção e efluxo de íons e metabólitos através da membrana plasmática (Sze, 1985; James e Olivares, 1998; Quaggiotti et al., 2004). As SH podem favorecer o aumento da atividade da H^+ -ATPase da membrana plasmática, modulando um ambiente elétrico celular que promove maior eficiência na translocação de nutrientes, decorrente da capacidade de otimizar a atividade da H^+ -

ATPase, contribuindo para regular o pH do apoplasto e, assim, afetar a absorção de nutrientes (Zandonadi et al., 2016). Com isso, a estimulação do bombeamento de H^+ para o exterior da membrana plasmática promovida pela inoculação das cápsulas cria um ambiente eletroquímico que favorece a absorção de nitrato para o interior da célula, visto que sua translocação ocorre por simporte ($2H^+ : 1NO_3^-$) (Nardi et al., 2009).

Além disso, verificou-se um aumento expressivo na transcrição do gene *ZmMDH2* nas plantas tratadas com cápsulas, enriquecidas ou não com SH, resultando em maior atividade da enzima malato desidrogenase (MDH). Essa enzima catalisa a formação de malato no metabolismo via ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), que atua como fonte de carbono e energia para a redução de N_2 à amônia pela fixação biológica e na subsequente conversão do malato em oxaloacetato permitindo que a continuidade do TCA (Prell e Poole, 2006).

Por fim, evidenciou-se que as cápsulas contendo *H. seropedicae* estirpe RAM10, suplementadas ou não com SH, favoreceram a colonização bacteriana das raízes de milho, exercendo efeito positivo sobre o metabolismo das plântulas, mesmo após 180 dias de armazenamento, demonstrando o potencial de preservação da sobrevivência e viabilidade celular promovidas pela encapsulação em alginato. Contudo, esse efeito não se refletiu no desempenho biométrico das plantas de milho, não sendo observadas diferenças significativas nos parâmetros avaliados. Tal resultado pode ser atribuído ao ambiente de crescimento limitado pelos vasos ou à adubação de plantio e cobertura rica em N, fatores que possivelmente limitaram a função bioestimuladora e promotora de crescimento do inoculante.

CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo demonstraram que a técnica de encapsulamento por gelificação iônica, com a concentração de alginato de sódio a 1,5% enriquecido com substâncias húmicas, apresentou alta eficiência de encapsulação inicial variando de 77% a 92%, gerando cápsulas homogêneas capazes de sustentar a viabilidade celular de *H. seropedicae* estirpe RAM10 por 270 dias.

O estudo evidenciou que, mesmo com as maiores perdas iniciais da sobrevivência bacteriana ao longo do tempo, após 90 dias a densidade populacional microbiana estabilizou em aproximadamente $5,6 \log \text{UFC g}^{-1}$ de cápsula ($3,6 \times 10^5 \text{ UFC g}^{-1}$) em todos os tratamentos avaliados e, aos 270 dias de armazenamento, a taxa de sobrevivência bacteriana variou de 48,0% a 58,2%, com Hbs-150 apresentando a maior taxa, seguida por Hbs-0, Hbs-50 e Hbs-100.

A microscopia ótica de fluorescência das raízes de milho inoculadas via solo com cápsulas armazenadas por 180 dias revelou que as substâncias húmicas foram eficientes em melhorar a viabilidade celular da estirpe RAM10 durante o armazenamento, sendo possível observar o aumento da intensidade de fluorescência emitida pela RAM10 com o aumento da concentração de SH adicionada à formulação, o que favoreceu a colonização de regiões que são amplamente descritas na literatura como sítios preferenciais de infecção por *H. seropedicae* em associação com plantas da família Poaceae. Entretanto, não foi observado por RT-PCR aumento da comunidade bacteriana colonizando as raízes das plantas inoculadas com as cápsulas contendo a estirpe RAM10, em relação à comunidade microbiana nativa de *H. seropedicae* no controle não inoculado (NI).

De maneira geral, nenhum dos tratamentos apresentou diferenças significativas nos parâmetros biométricos avaliados após 40 dias de cultivo do milho, com exceção do comprimento do sistema radicular, em ambos os solos avaliados, e da massa fresca da parte aérea, para o Cambissolo Flúvico distrófico. Além disso, o milho apresentou alterações metabólicas

significativas nos níveis de transcrição dos diferentes genes avaliados, em especial o gene de codificação da H^+ -ATPase, e na promoção da atividade das enzimas nitrato redutase e malato desidrogenase, de maneira distinta entre os solos.

Esses resultados indicam que a combinação de BPCV com SH na encapsulação apresenta grande potencial para aumentar a sobrevivência microbiana imobilizada, preservando sua viabilidade, evidenciando ainda o papel da SH como um bioestimulante vegetal, mesmo em pequenas concentrações, o que favorece a adaptação microbiana ao ambiente competitivo onde será aplicada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adesemoye, A. O.; Torbert, H. A.; Kloepper, J. W. (2009) **Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers.** Microbial Ecology, 58:921–9. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9531-y>
- do Amaral, F. P.; Bueno, J. C. F.; Hermes, V. S.; Arisi, A. C. M. (2014) **Gene expression analysis of maize seedlings (DKB240 variety) inoculated with plant growth promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae*.** Symbiosis, 62:41–50. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13199-014-0270-6>
- do Amaral, F. P.; Pankievicz, V. C. S.; Arisi, A. C. M.; de Souza, E. M.; Pedrosa, F.; Stacey, G. (2016) **Differential growth responses of *Brachypodium distachyon* genotypes to inoculation with plant growth promoting rhizobacteria.** Plant Molecular Biology, 90:689–697. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0449-8>
- Aguirre, E.; Leménager, D.; Bacaicoa, E.; Fuentes, M.; Baigorri, R.; Zamarreño, A. M.; García-Mina, J. M. (2009) **The root application of a purified leonardite humic acid modifies the transcriptional regulation of the main physiological root responses to Fe deficiency in Fe-sufficient cucumber plants.** Plant Physiol. Biochem., 47:215–223. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.06.004>
- Amine, K. M.; Champagne, C. P.; Salmieri, S.; Britten, M.; St-Gelais, D.; Fustier, P.; Lacroix M. (2014) **Effect of palmitoylated alginate microencapsulation on viability of *Bifidobacterium longum* during freeze-drying.** LWT Food Science and Technology, 56(1):111–117. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.11.003>

ANPII Bio. (2025) **Painel interno de inoculantes e biodefensivos ANPII Bio 2025**. Disponível online em: <<https://anpiibio.org.br/estatisticas/>> Acesso em: 10 de junho de 2025.

Aquino, A. M.; Canellas, L. P.; da Silva, A. P. S.; Canellas, N. O.; Lima, L. S.; Olivares, F. L. (2019) **Evaluation of molecular properties of humic acids from vermicompost by ¹³C-CPMAS-NMR spectroscopy and thermochemolysis–GC–MS**. J. Anal. Appl. Pyrolysis, 141:104634. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2019.104634>

Arancon, N. Q.; Lee, S.; Edwards, C. A.; Atiyeh, R. M. (2003) **Effects of humic acids and aqueous extracts derived from cattle, food and paper-waste vermicomposts on growth of greenhouse plants**. Pedobiologia, 47: 744-781. DOI: <https://doi.org/10.1078/0031-4056-00253>

Armada, E.; Portela G.; Roldán A.; Azcón R. (2014) **Combined use of beneficial soil microorganism and agrowaste residue to cope with plant water limitation under semiarid conditions**. Geoderma, 232:640–648. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2014.06.025>

Atiyeh, R. M.; Lee, S.; Edwards, C. A.; Arancon, N. Q.; Metzger, J. D. (2002) **The influence of humic acids derived from earthworm-processed organic wastes on plant growth**. Bioresour Technol, 84:7-14. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00017-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00017-2)

Baldani, J. I.; Baldani, V. L. D.; Seldin, L.; Döbereiner, J. (1986) **Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. Nov. a root-associated nitrogen-fixing bacterium**. International Journal of Systematic Bacteriology, 36:86-93. DOI: <https://doi.org/10.1099/00207713-36-1-86>

Baldiviezo, L. V.; Nieva, L. B.; Pedrini, N.; Cardozo, R. M. (2023) **Microencapsulation of a native strain of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and bioinsecticide activity against**

pyrethroid-resistant *Triatoma infestans* to vector control of Chagas disease in the argentine Gran Chaco region. Trop. Med. and Infectious Disease, 8(5):245. DOI: <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8050245>

Baldotto, M. A.; Muniz, R. C.; Baldotto, L. E. B.; Dobbss, L. B. (2011a) **Root growth of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. treated with humic acids isolated from typical soils of Rio de Janeiro state, Brazil.** Revista Ceres, 58(4):504–511. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2011000400015>

Baldotto, L. E. B.; Olivares, F. L.; Bressan-Smith, R. (2011b) **Structural interaction between GFP-labeled diazotrophic endophytic bacterium *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 and pineapple plantlets 'Vitória'.** Brazilian Journal of Microbiology, 42(1), 114–125. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000100015>

Balla, A.; Silini, A.; Cherif-Silini, H.; Chenari Bouket, A.; Alenezi, F.N.; Belbahri, L. (2022) **Recent advances in encapsulation techniques of plant growth-promoting microorganisms and their prospects in the sustainable agriculture.** Appl. Sci., 12(18):9020. DOI: <https://doi.org/10.3390/app12189020>

Bashan, Y. (1986) **Alginate beads as synthetic inoculant carriers for slow release of bacteria that affect plant growth.** Appl Environ Microbiol, 51:1089–1098. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.51.5.1089-1098.1986>

Bashan, Y.; Gonzalez, L. E. (1999) **Long-term survival of the plant growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* in dry alginate inoculant.** Appl. Microbiol. Biotechnol., 51, 262–266. DOI: <https://doi.org/10.1007/s002530051391>

Bashan, Y.; De-Bashan, L. E; Prabhu, S. R.; Hernandez, J.-P. (2014) **Advances in Plant Growth-Promoting Bacterial Inoculant**

Technology: Formulations and Practical Perspectives (1998-2013).

Plant and Soil, 328:1-33. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>

Berg, R.H., Vasil, V. & Vasil, I.K. (1979) **The biology of Azospirillum-sugarcane association II: Ultrastructure.** Protoplasma 101, 143–163. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01281569>

Bergmeyer, H. (1974) **Methods of Enzymatic Analysis.** Volume 1, 2nd ed. 485-486. New York: Academic Press, Inc..e a concentração de proteína do extrato.

Berninger, T.; Mitter, B.; Preininger, C. (2016) **The smaller, the better? The size effect of alginate beads carrying plant growth-promoting bacteria for seed coating.** Journal of Microencapsulation, 33(2):127–136. DOI: <https://doi.org/10.3109/02652048.2015.1134690>

Bhattacharjee, A.; Dubey, S.; Sharma, S. (2023) **“Next-Generation bioformulations” for plant growth promotion and stress mitigation: a promising approach for sustainable agriculture.** J. Plant Growth Regul., 494:1-19. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00344-023-10996-z>

Bhattacharyya, P. N.; Jha, D. K. (2012) **Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture.** World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28(4):1327-1350. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>

Blandino, A.; Macias, M.; Cantero, D. (1999) **Formation of calcium alginate gel capsules: influence of sodium alginate and CaCl₂ concentration on gelation kinetics.** J. Biosci. Bioeng., 88(6):686-689. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)87103-0](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)87103-0)

Burdman, S.; Okon, Y.; Jurkevitch, E. (2000) **Surface characteristics of Azospirillum brasilense in relation to cell aggregation and**

attachment to plant roots. Critical Reviews in Microbiology, 26(2):91–110. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408410091154200>.

Burey, P.; Bhandari, B. R.; Howes, T.; Gidley, M. J. (2008) **Hydrocolloid Gel Particles: Formation, Characterization, and Application.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 48(5):361-377. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408390701347801>

Campos, E. V. R.; Pereira, A. E. S.; Aleksieienko, I.; do Carmo, G.C.; Gohari, G.; Santaella, C.; Fraceto, L. F.; Oliveira, H. C. (2023) **Encapsulated plant growth regulators and associative microorganisms: Nature-based solutions to mitigate the effects of climate change on plants.** Plant Science, 331:111688. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2023.111688>

Canellas, L. P.; Santos, G. A.; Moraes, A. A.; Rumjanek, V. M.; Olivares, F. L. (2000) **Avaliação de características de ácidos húmicos de resíduos de origem urbana: I. métodos espectroscópicos (UV-Vis, IV, RMN ¹³C-CP/MAS) e microscopia eletrônica de varredura.** Revista Brasileira De Ciência Do Solo, 24(4):741–750. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-06832000000400006>

Canellas, L. P.; Santos, G. A.; Rumjanek, V. M.; Moraes, A. A.; Guridi, F. (2001) **Distribuição da matéria orgânica e características de ácidos húmicos em solos com adição de resíduos de origem urbana.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, 36(12):1529–1538. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2001001200010>

Canellas, L. P.; Dantas, D. J.; Aguiar, N. O.; Peres, L. E. P.; Zsögön, A.; Olivares, F. L.; Dobbss, L. B.; Façanha, A. R.; Nebbioso, A.; Piccolo, A. (2011) **Probing the hormonal activity of fractionated molecular humic components in tomato auxin mutants.** Ann Appl Biol., 159(2):202–11. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2011.00487.x>

- Canellas, L. P.; Balmori, D. M.; Médici, L. O. et al. (2013) **A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.).** Plant Soil, 366:119–132. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1382-5>
- Canellas, L. P.; Olivares, F. L. (2014) **Physiological responses to humic substances as plant growth promoters.** Chem. Biol. Technol. Agric., 1:3. DOI: <https://doi.org/10.1186/2196-5641-1-3>
- Canellas, L. P.; Olivares, F. L.; Aguiar, N. O.; Jones, D. L.; Nebbioso, A.; Mazzei, P.; Piccolo, A. (2015a) **Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture.** Scientia Horticulturae, 196:15-27. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.013>
- Canellas, L. P.; Silva, S. F.; Olk, D. C; Olivares, F. L. (2015b) **Foliar application of *Herbaspirillum seropedicae* and humic acid increase maize yields.** Journal of Food Agriculture and Environment, Helsinki, v. 13, p. 146-153.
- Canellas, L. P.; Olivares, F. L. (2017) **Production of border cells and colonization of maize root tips by *Herbaspirillum seropedicae* are modulated by humic acid.** Plant and Soil, 417:403-413. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3267-0>
- Canellas, L. P.; Olivares, F. L.; Canellas, N. O. A.; Mazzei, P; Piccolo, A. (2019) **Humic acids increase the maize seedling's exudation yield.** Chem. Biol. Technol. Agric., 6:3. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40538-018-0139-7>
- Carvalho, T. L. G.; Balsemão-Pires, E.; Saraiva, R. M.; Ferreira, P. C. G.; Hemerly, A. S. (2014) **Nitrogen signalling in plant interactions with associative and endophytic diazotrophic bacteria.** Journal of Experimental Botany, 65(19):5631–5642, DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/eru319>

- Carvalho, T. L. G.; Ballesteros, H. G. F.; Thiebaut, F.; Ferreira, P. C. G.; Hemerly, A. S. (2016) **Nice to meet you: genetic, epigenetic and metabolic controls of plant perception of beneficial associative and endophytic diazotrophic bacteria in non-leguminous plants.** Plant Molecular Biology, 90(6):561–574. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0435-1>
- Chan, E. S.; Wong, S.L.; Lee, P.P.; Lee, J.S.; Ti, T.B.; Zhang, Z.; Poncelet, D.; Ravindra, P.; Phan, S.H.; Yim, Z.H. (2011) **Effects of starch filler on the physical properties of lyophilized calcium–alginate beads and the viability of encapsulated cells.** Carbohydr. Polim., 83:225-232. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.07.044>
- Chen, J.; Gu, B.; Royer, R. A.; Burgos, W. D. (2003) **The roles of natural organic matter in chemical and microbial reduction of ferric iron.** The Science of the total environment vol. 307:167-178. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(02\)00538-7](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(02)00538-7)
- Daisley, B. A.; Chernyshova, A. M.; Thompson, G. J.; Allen-Vercoe, E. (2022) **Deteriorating microbiomes in agriculture - the unintended effects of pesticides on microbial life.** Microbiome Research Reports, 1:6. DOI: <https://doi.org/10.20517/mrr.2021.08>
- Dick, D.P.; Novotny, E.H.; Dieckow, J.; Bayer, C. (2009) **Química da Matéria Orgânica do Solo.** In: Melo, V.F., Alleoni, L.R.F., ed. Química e Mineralogia do Solo: Parte II - Aplicações. Viçosa, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2009. p.1-68.
- Dobbelaere, S.; Croonenborghs, A.; Thys, A.; Ptacek, D. et al. (2001) **Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*.** Australian Journal of Plant Physiology, 28(9):871–879. DOI: <https://doi.org/10.1071/PP01074>

- Dobbss, L. B.; Canellas, L. P.; Olivares, F. L.; Aguiar N. O.; Peres L. E. P.; Azevedo, M.; Spaccini, R.; Piccolo, A.; Façanha, A. R. (2010) **Bioactivity of chemically transformed humic matter from vermicompost on plant root growth.** J Agric Food Chem., 58:3681–8. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf904385c>
- Döbereiner, J.; Baldani, V. L. D.; Reis, V. M. (1995) **Endophytic Occurrence of Diazotrophic Bacteria in Non-Leguminous Crops.** In: Fendrik, I., del Gallo, M., Vanderleyden, J., de Zamaroczy, M. (eds) *Azospirillum* VI and Related Microorganisms. NATO ASI Series, 37:3-14. Springer, Berlin, Heidelberg. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-642-79906-8_1
- Façanha, A. R.; Façanha, A. L. O.; Olivares, F. L.; Guridi, F.; Santos, G. A.; Velloso, A. C. X.; Rumjanek, V. M.; Brasil, F.; Schripsema, J.; Braz-Filho, R.; Oliveira, M. A.; Canellas, L. P. (2002) **Bioatividade de ácidos húmicos: efeitos sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, 37(9):1301–1310. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2002000900014>
- Fasusi, O. A.; Cruz, C.; Babalola, O. O. (2021) **Agricultural sustainability: microbial biofertilizers in rhizosphere management.** Agriculture, 11(2):163. DOI: <https://doi.org/10.3390/agriculture11020163>
- Fischer, F. G.; Dörfel, H. (1955) **Die Polyuronsäuren der Braunalgen (Kohlenhydrate der Algen I).** Biological Chemistry, 302:186-203. DOI: <https://doi.org/10.1515/bchm2.1955.302.1-2.186>
- French, E.; Kaplan, I.; Iyer-Pascuzzi, A.; Nakatsu, C. H.; Enders, L. (2021) **Emerging strategies for precision microbiome management in diverse agroecosystems.** Nature Plants, 7:256-267. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41477-020-00830-9>

- García, A. C.; Santos, L. A.; Izquierdo, F. G.; Sperandio, M. V. L.; Castro, R. N.; Berbara, R. L. L. (2012) **Vermicompost humic acids as an ecological pathway to protect rice plant against oxidative stress.** Ecol. Eng. 47, 203–208. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2012.06.011>
- García, A. C.; Santos, L. A.; Izquierdo, F. G.; Rumjanek, V. M.; Castro, R. N.; Santos, F. S.; Souza, L. G. A.; Berbara, R. L. L. (2014) **Potentialities of vermicompost humic acids to alleviate water stress in rice plants (*Oryza sativa* L.).** J. Geochem. Explor. 136:48–54. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2013.10.005>
- Glick, B. R. (2005) **Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase.** FEMS Microbiol. Lett., 252:1-7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.07.030>
- Glick, B. R. (2012) **Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications.** Scientifica, 2012:963401. DOI: <https://doi.org/10.6064/2012/963401>
- Goodman, R. N. (1982) The infection process. In: **Phytopathogenic Prokaryotes, Vol 1**, ed. M. S. MOUNT & G. H. LACY, p. 31-62. New York: Academic, 541 p.
- Gouin, S. (2004) **Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends.** Trends Food Sci. Technol., 15:330–347. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.10.005>
- Haug, A.; Larsen, B.; Smidsrod, O. (1967) **Studies on the Sequence of uronic acid residues in alginic acid.** Acta Chemica Scandinavica, 21:691-704. DOI: <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.21-0691>

- Hay, I. D.; Rehman, Z. U.; Ghafoor, A.; Rehm, B. H. A. (2010) **Bacterial biosynthesis of alginates**. J. Chem. Technol. Biotechnol., 85: 752-759. DOI: <https://doi.org/10.1002/jctb.2372>
- 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clay.2015.02.001>
- Hossain, M. A.; Hossain, M. S.; Akter, M. (2023) **Challenges faced by plant growth-promoting bacteria in field-level applications and suggestions to overcome the barriers**. Physiol. Mol. Plant Pathol., 102029. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2023.102029>
- Hudson, D.; Margaritis, A. (2013) **Biopolymer nanoparticle production for controlled release of biopharmaceuticals**. Critical Reviews in Biotechnology, 34(2):161–179. DOI: <https://doi.org/10.3109/07388551.2012.743503>
- Hungria, M.; Campo, R. J.; Souza, E. M. E.; Pedrosa, F. O. (2010) **Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil**. Plant and Soil, 331:413-425. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0262-0>
- James, E.K.; Olivares, F.L. (1997) **Infection and colonization of sugarcane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs**. Crit. Rev. Pl. Sci. 17, 77–119. DOI: <https://doi.org/10.1080/07352689891304195>
- James, E.K.; Gyaneshwar, P.; Mathan, N.; Barraquio, W.L.; Reddy, P.M.; Iannetta, P.P.; Olivares, F.L.; Ladha, J.K. (2002). **Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67**. Mol. Plant Microbe Interact. 15, 894-906. DOI: <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.9.894>

- Jiménez-Arias, D.; Morales-Sierra, S.; Borges, A. A.; Díaz, D. (2020) **Biostimulant nanoencapsulation: the new keystone to fight hunger**. J. Agric. Food Chem., 68:7083-7085. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02872>
- Jindo, K.; Martim, S. A.; Navarro, E. C. et al. (2012) **Root growth promotion by humic acids from composted and non-composted urban organic wastes**. Plant Soil, 353:209–220. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1024-3>
- John, R. P.; Tyagi, R.D.; Brar, S.K.; Surampalli, R.Y.; Prévost D. (2011) **Bio-Encapsulation of Microbial Cells for Targeted Agricultural Delivery**. Critical Reviews in Biotechnology, 31(3):211-226. DOI: <https://doi.org/10.3109/07388551.2010.513327>
- Jones, D. L. (1998) **Organic acids in the rhizosphere: a critical review**. Plant and Soil, 205:25-44. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1004356007312>
- Kim, I. Y.; Pusey, P. L.; Zhao, Y.; Korban, S. S.; Choi, H.; Kim, K. K. (2012) **Controlled release of *Pantoea agglomerans* E325 for biocontrol of fire blight disease of apple**. Journal of Controlled Release, 161:109-115. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.028>
- King, A. H. (1983) **Brown seaweed extracts (Alginates)**. In: GLICKSMAN, M. (Ed) Food Hydrocolloids, v. 2, cap 6.
- Kononova, M. (1982) **La materia orgánica del suelo: su naturaleza, propiedades y métodos de investigación**. In: KONONOVA, M. M.; MUNTAN, E. B. Bioquímica del proceso de formación del humus. Vilassar de Mar: OikosTau, 63-109.
- Le Corre, D.; Bras, J.; Dufresne, A. (2010) **Starch nanoparticles: a review**. Biomacromolecules, 11:1139-1153. DOI: <https://doi.org/10.1021/bm901428y>

- Lim, F.; Sun, A. M. (1980) **Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas.** Science, 210:908–910. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.6776628>
- Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. (2001) **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.** Methods, 25(4):402–408. DOI: <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Luz, W. C. (1996) **Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção.** In: Luz, W. C.; Fernandes, J. M. C.; Prestes, A. M. et al. (Ed.). Revisão Anual de Patologia de Plantas. Passo Fundo, 1996, 4:1-49.
- Majerowicz, N.; França, M. G. C.; Peres, L. E. P.; Médici, L. O; Figueiredo, S. A. (2003) **Fisiologia Vegetal: Curso Prático.** Rio de Janeiro: Âmbito Cultural Edições Ltda.
- Malusá, E.; Vassilev, N. (2014) **A contribution to set a legal framework for biofertilisers.** Appl. Microbiol. Biotechnol., 98:6599-6607. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5828-y>
- Martinez-Balmori, D.; Olivares, F. L.; Spaccini, R.; Aguiar, K. P.; Araújo, M. F.; Aguiar, N. O.; Guridi, F.; Canellas, L. P. (2013) **Molecular characteristics of vermicompost and their relationship to preservation of inoculated nitrogen-fixing bacteria.** J. Anal. Appl. Pyrol., 104, 540–550. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2013.05.015>
- Melo, B. A. G.; Motto, F. L.; Santana, M. H. A. (2016) **Humic acids: Structural properties and multiple functionalities for novel technological developments.** Materials Science and Engineering: C, 62:967–974. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.12.001>
- Mobed, J. J.; Hemmingsen, S. L.; Autry, J. L; McGown, L. B. (1996) **Fluorescence Characterization of IHSS Humic Substances: Total**

Luminescence Spectra with Absorbance Correction. Environmental Science & Technology, 30(10):3061-3065. DOI: <https://doi.org/10.1021/es960132l>

Monteiro, R. A.; Schmidt, M. A.; Baura, V. A.; Balsanelli, E.; Wassem, R.; Yates, M. G.; Randi, M. A. F.; Pedrosa, F. O.; Souza, E. M. (2008) **Early colonization pattern of maize (*Zea mays* L. Poales, Poaceae) roots by *Herbaspirillum seropedicae* (Burkholderiales, Oxalobacteraceae).** Genet. Mol. Biol. 31, 932-937. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1415-47572008005000007>

Moradi Pour, M.; Saberi Riseh, R.; Skorik, Y. A. (2022) **Sodium alginate–gelatin nanoformulations for encapsulation of *Bacillus velezensis* and their use for biological control of pistachio gummosis.** Materials, 15(6):2114. DOI: <https://doi.org/10.3390/ma15062114>

Mordor Intelligence. (2025) **Biofertilizer market size & share analysis - growth trends & forecasts up to 2030.** Disponível online em: <<https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/global-biofertilizers-market-industry>> Acesso em: 15 de junho de 2025.

Mousa, E.-S. M.; Elbagory, M.; Mahdy, M. E.; Abo-Koura, H. A.; Omara, A. E.-D. (2024) **Microencapsulation of *Bacillus megaterium* in Humic Acid-Supplied Alginate Beads Enhances Tomato Growth and Suppresses the Root-Knot Nematode *Meloidogyne javanica* Under Greenhouse Conditions.** Horticulturae, 10(12):1284. DOI: <https://doi.org/10.3390/horticulturae10121284>

Nardi, S.; Pizzeghello, D.; Muscolo, A.; Vianello, A. (2002) **Physiological effects of humic substances on higher plants.** Soil Biol Biochem 34:1527–1536. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00174-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00174-8)

Nardi, S.; Carletti, P.; Pizzeghello, D.; Muscolo, A. (2009) **Biological activities of humic substances.** In: Senesi, N., Xing, B., Huang, P.M.,

(Eds.). Biophysico-chemical processes involving natural nonliving organic matter in environmental systems. Vol. 2 (part. 1), Wiley: Hoboken, NJ, USA, p. 305-339. DOI: <https://doi.org/10.1002/9780470494950.ch8>

Nardi, S.; Ertani, A.; Francioso, O. (2016) **Soil–root cross-talking: The role of humic substances**. J. Plant Nutr. Soil Sci., 180:5–13. DOI: <https://doi.org/10.1002/jpln.201600348>

Nehra, V.; Choudhary M. (2015) **A review on plant growth promoting rhizobacteria acting as bioinoculants and their biological approach towards the production of sustainable agriculture**. Journal of Applied and Natural Science, 7(1):540-556. DOI: <https://doi.org/10.31018/jans.v7i1.642>

Oldroyd, G. E. D. (2013) **Speak, friend, and enter: signaling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants**. Nature Reviews Microbiology, 11(4):252–263. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2990>

Olivares, F. L.; Busato, J. G.; de Paula, A. M.; Lima, L. S.; Aguiar, N. O.; Canellas, L. P. (2017) **Plant growth promoting bacteria and humic substances: crop promotion and mechanisms of action**. Chem. Biol. Technol. Agric., 4:30. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40538-017-0112-x>

Olivares, F. L.; James, E. K.; Baldani, J. I.; Döbereiner, J. (1997) **Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum***. New Phytologist., 135(4):723-737. DOI:10.1046/j.1469-8137.1997.00684.x

Ouwerx, C.; Velings, N.; Mestdagh, M.; Axelos, M. A. (1998) **Physico-chemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations**. Polym. Gels Networks, 6(5):393-408. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0966-7822\(98\)00035-5](https://doi.org/10.1016/S0966-7822(98)00035-5)

- Panpatte, D. G.; Jhala, Y. K.; Vyas, R. V.; Shelat, H. N. (eds.) (2017) **Microorganisms for green revolution**. Singapore: Springer, 443p., ISBN 978-981-10-6240-7.
- Pedraza, R. O. (2008) **Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria**. Int. J. Food Microbiol., 125:25–35. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.079>
- Pedrosa, F. O. et al. (2011) **Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses**. PLoS Genetics, 7(5):e1002064. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002064>
- Pereira, T. P.; do Amaral, F. P.; Dall'Asta, P.; Brod, F. C.; Arisi, A. C. (2014) **Real-time PCR quantification of the plant growth promoting bacteria *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 in maize roots**. Mol Biotechnol. 56(7):660-70. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12033-014-9742-4>
- Piccolo, A. (2001) **The supramolecular structure of humic substances**. Soil Science, 166(11),810–832. DOI: <https://doi.org/10.1097/00010694-200111000-00007>
- Piccolo, A. (2002) **The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science**. Adv Agron, 75:57–134. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0065-2113\(02\)75003-7](https://doi.org/10.1016/s0065-2113(02)75003-7)
- Pinton, R.; Cesco, S.; Santi, S; Agnolon, F.; Varanini, Z. (1999) **Water-extractable humic substances enhance iron deficiency responses by Fe-deficient cucumber plants**. Plant and Soil, 210:145–157. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1004329513498>
- Pochon, J; Tardieux, P. (1962) **Techniques d'analyse en microbiologie du sol**. Éditions de la Tourelle, St. Mandé (Seine). 105 p

- Prasad, K.; Kadokawa, J. (2009) **Alginate-Based Blends and Nano/Microbeads**. In: Rehm, B. (eds) *Alginates: Biology and Applications*. Microbiology Monographs, vol 13. Springer, Berlin, Heidelberg. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-540-92679-5_8
- Prell, J.; Poole, P. (2006) **Metabolic changes of rhizobia in legume nodules**. Trends in Microbiology, 14(4):161-168. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.02.005>
- Puglisi, E.; Fragoulis, G.; Ricciuti, P.; Cappa, F.; Spaccini, R.; Piccolo, A.; Trevisan, M.; Crecchio, C. (2009) **Effects of a humic acid and its size-fractions on the bacterial community of soil rhizosphere under maize (*Zea mays* L.)**. Chemosphere, 277:829-837. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.07.077>
- Pukalchik, M.; Kydralieva, K.; Yakimenko, O.; Fedoseeva, E.; Terekhova, V. (2019) **Outlining the potential role of humic products in modifying biological properties of the soil: a review**. Front. Environ. Sci., 7:80. DOI: <https://doi.org/10.3389/fenvs.2019.00080>
- Quaggiotti, S.; Ruperti, B.; Pizzeghello, D.; Francioso, O.; Tugnoli, V.; Nardi, S. (2004) **Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.)**. J Exp Bot., 55:803–13. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/erh085>
- R Core Team (2024) **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>> Acesso em: 20 de janeiro de 2024.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. (1999) **Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation**

decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine, 26, 1231–1237. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)

Reinhold-Hurek, B.; Hurek, T. (2011) **Living inside plants: Bacterial endophytes.** Current Opinion in Plant Biology, 14(4):435–443.

Rekha, P. D.; Lai, W. A.; Arun, A. B.; Young, C. C. (2007) **Effect of free and encapsulated *Pseudomonas putida* CC-FR2-4 and *Bacillus subtilis* CC-pg104 on plant growth under gnotobiotic conditions.** Bioresource Technology, 98:447-451. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.01.009>

Rivera-Cruz, M. C.; Trujillo-Narcía A.; Córdova-Ballona G.; Kohler J.; Caravaca F.; Roldán A. (2008) **Poultry manure and banana waste are effective biofertilizer carriers for promoting plant growth and soil sustainability in banana crops.** Soil Biol Biochem, 40:3092-3095. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.09.003>

Rodriguez, H.; Fraga, R.; Gonzalez, T.; Bashan Y. (2006) **Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria.** Plant and Soil, 287:15-21. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-006-9056-9>

Rohman, S.; Kaewtatip, K.; Kantachote, D.; Tantirungkij, M. (2020) **Encapsulation of *Rhodopseudomonas palustris* KTSSR54 using beads from alginate/starch blends.** Journal of Appl. Poly. Science, 138(12):50084. DOI: <https://doi.org/10.1002/app.50084>

Rojas-Sánchez, B.; Guzmán-Guzmán, P.; Morales-Cedeño, L. R.; Orozco-Mosqueda, M. D. C.; Saucedo-Martínez, B. C.; Sánchez-Yáñez, J. M.; Fadiji, A. E.; Babalola, O. O.; Glick, B. R.; Santoyo, G. (2022) **Bioencapsulation of microbial inoculants: mechanisms, formulation types and application techniques.** Applied Biosciences, 1(2):198-220. DOI: <https://doi.org/10.3390/applbiosci1020013>

- Roncato-Maccari, L.D.B.; Ramos, H.J.O.; Pedrosa, F.O.; Alquini, Y.; Yates, M.G.; Rigo, L.U.; Steffens, M.B.; Chubatsu, L.S.; Souza, E.M. (2003) **Root colonization systemic spreading and contribution of *Herbaspirillum seropedicae* to growth of rice seedling.** Symbiosis. 35, 261-270.
- Rosa, C. M.; Castilhos, R. M. V.; Vahl, L. C.; Castilhos, D. D.; Pinto, L. F. S.; Oliveira, E. S.; Leal, O. A. (2009) **Efeito de substâncias húmicas na cinética de absorção de potássio, crescimento de plantas e concentração de nutrientes em *Phaseolus vulgaris* L..** Revista Brasileira De Ciência Do Solo, 33(4):959–967. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-06832009000400020>
- Saberi Riseh, R.; Skorik, Y. A.; Thakur, V. K.; Moradi Pour, M.; Tamanadar, E.; Noghabi, S. S. (2021) **Encapsulation of plant biocontrol bacteria with alginate as a main polymer material.** Int. J. Mol. Sci., 22(20):11165. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms222011165>
- Safari, M.; Motamedi, E.; Kari Dolatabad, H.; Modarres Sanavy, S. A. M. (2020) **Nano-carriers effects on the viability and efficiency of *Pseudomonas* strains as phosphate solubilizing bacteria.** Heliyon, 6(10):e05076. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05076>
- Santos, H.G.; Jacomine, P. K. T.; Anjos, L. H. C.; Oliveira, V. A. (eds.) (2018) **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos.** 5. ed. Brasília, DF: Embrapa, 531 p. ISBN 978-85-7035-817-2.
- Schnitzer, M.; Gupta, U. C. (1965) **Determination of acidity in soil organic matter.** Soil Science Society of America Journal, 29(3):274-277. DOI: <https://doi.org/10.2136/sssaj1965.03615995002900030016x>
- Schoebitz, M.; López M. D.; Roldán A. (2013) **Bioencapsulation of Microbial Inoculants for Better Soil-Plant Fertilization. A Review.**

Agronomy for Sustainable Development, 33(4):751-65. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13593-013-0142-0>

Schoebitz, M.; Ribaudó, C.; Pardo, M.; Cantore, M.; Ciampi, L.; Curá, J. A. (2009) **Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere.** Soil Biol. Biochem., 41:1768-1774. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.12.031>

Schulten, H. R.; Schnitzer, M. (1995) **Three-dimensional models for humic acids and soil organic matter.** Naturwissenschaften, 82:487–498. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01134484>

Schulten, H. R.; Schnitzer, M. (1997) **Chemical Model Structures for Soil Organic Matter and Soils.** Soil Science 162(2):115-130. DOI: <https://doi.org/10.1097/00010694-199702000-00005>

Scott-Fordsmand, J. J.; Fraceto, L. F.; Amorim, M. J. B. (2022) **Nanopesticides: the lunch-box principle—deadly goodies (semio-chemical functionalised nanoparticles that deliver pesticide only to target species).** Journal of Nanobiotechnology, 20:13. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12951-021-01216-5>

Sein, L. C.; Varnum, J. M.; Jansen, S. A. (1999) **Conformational modeling of a new building block of humic acid: approaches to the lowest energy conformer.** Environmental Science and Technology, 33(4):546-552. DOI: <https://doi.org/10.1021/es9805324>

Shehata, A. A.; Kühnert, M.; Haufe, S.; Krüger, M. (2014) **Neutralization of the antimicrobial effect of glyphosate by humic acid *in vitro*.** Chemosphere, 104:258–261. DOI: <https://doi.org/j.chemosphere.2013.10.064>

- Shima, M.; Morita, Y.; Yamashita, M.; Adachi, S. (2006) **Protection of *Lactobacillus acidophilus* from the low PH of a model gastric juice by incorporation in a W/O/W emulsion.** Food Hydrocoll., 20, 1164–1169. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.01.001>
- Silva, A. C.; Canellas, L. P.; Olivares, F. L.; Dobbss, L. B.; Aguiar, N. O.; Frade, D. Â. R.; Rezende, C. E.; Peres, L. E. P. (2011) **Root growth of tomato seedlings intensified by humic substances from peat bogs.** Revista Brasileira De Ciência Do Solo, 35(5):1609–1617. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-06832011000500015>
- Silva, S. F.; Olivares, F. L.; Canellas, L. P. (2017) **The biostimulant manufactured using diazotrophic endophytic bacteria and humates is effective to increase sugarcane yield.** Chem. Biol. Technol. Agric., 4, 24. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40538-017-0106-8>
- Silva, R. M.; Canellas, N. A.; Olivares, F. L. et al. (2023) **Humic substances trigger plant immune responses.** Chem. Biol. Technol. Agric., 10:123. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40538-023-00468-7>
- Smidsrød, O.; Skjåk-Bræk, G. (1990) **Alginate as immobilization matrix for cells.** Trends in Biotechnology, 1990, 8:71-78. DOI: [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(90\)90139-O](https://doi.org/10.1016/0167-7799(90)90139-O)
- Souza, R.; Ambrosini, A.; Passaglia, L. M. P. (2015) **Plant Growth-Promoting Bacteria as Inoculants in Agricultural Soils.** Genetics and Molecular Biology, 38(4):401-419. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1415-475738420150053>
- Spaepen, S.; Vanderleyden, J.; Remans, R. (2007) **Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling.** FEMS Microbiology Reviews, 31:425-448. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x>

- Spaccini, R.; Piccolo, A.; Conte, P.; Haberhauer, G.; Gerzabek, M. H. (2002) **Increased soil organic carbon sequestration through hydrophobic protection by humic substances.** *Soil Biol Biochem.*, 34(12):1839–1851. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00197-9](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00197-9)
- Spaccini, R.; Piccolo, A.; Haberhauer, G.; Gerzabek, M. H. (2000) **Transformation of organic matter from maize residues into labile and humic fractions of three European soils as revealed by ^{13}C distribution and CPMAS-NMR spectra.** *Eur. J. Soil Sci.*, 51:583–594. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2000.00341.x>
- Stevenson, F. J. (1994) **Humus chemistry: genesis, composition, reactions.** John Wiley & Sons.
- Spence, C.; Bais, H. (2013) **Probiotics for Plants: Rhizospheric Microbiome and Plant Fitness.** *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*, 1:713–721. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781118297674.ch67>
- Sze H. (1985) **H^+ -Translocating ATPases: advances using membrane vesicles.** *Annu Rev Plant Physiol.*, 36:175–208. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.36.060185.001135>
- Teixeira, P. C.; Donagemma, G. K.; Fontana, A.; Teixeira, W. G. (eds.) (2017) **Manual de Métodos de Análise de Solo.** 3. ed. Brasília, DF: Embrapa, 573p., ISBN 978-85-7035-771-7.
- Thapa, S.; Prasanna, R. (2018) **Prospecting the characteristics and significance of the phyllosphere microbiome.** *Ann Microbiol*, 68:229–245. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1331-5>
- Theng, B. (2012) **Formation and properties of clay-polymer complexes.** In: Theng, B. K. G. (ed.). *Capítulo 12: Humic substances.* 2. ed. Amsterdam: Elsevier, 391–456, ISBN: 9780444533548.

- Thurman, E. M. (1985) **Humic substances in soil, sediment, and water: geochemistry, isolation and characterization**. Aiken, G. R.; Mcknight, D. M.; Wershaw, R.L.; Maccarthy, P., eds.; New York: Wiley, 692p. ISBN: 9780471882749.
- Timmusk, S.; El-Daim, I. A. A.; Copolovici, L.; Tanilas, T.; Kännaste, A.; Behers, L.; Niinemets, Ü. (2014) **Drought-tolerance of wheat improved by rhizosphere bacteria from harsh environments: enhanced biomass production and reduced emissions of stress volatiles**. PloS one, 9(5):e96086. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096086>
- Tomaszewski, J. E.; Schwarzenbach, R. P.; Sander M. (2011) **Protein Encapsulation by Humic Substances**. Environmental Science & Technology, 45(14):6003-6010. DOI: <https://doi.org/10.1021/es200663h>
- Tong, M.; Li, X.; Luo, Q.; Yang, C.; Lou, W.; Liu, H.; Du, C.; Nie, L.; Zhong, Y. (2020) **Effects of humic acids on biotoxicity of tetracycline to microalgae *Coelastrella* sp.** Algal Research, 50:101962. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101962>
- Trevisan, S.; Francioso, O.; Quaggiotti, S.; Nardi, S. (2010) **Humic substances biological activity at the plant-soil interface: From environmental aspects to molecular factors**. Plant Signaling & Behavior, 5(6):635–643. DOI: <https://doi.org/10.4161/psb.5.6.11211>
- Umali-Garcia, M.; Hubbell, D. H.; Gaskins, M. H.; Dazzo F. B. (1980) **Association of Azospirillum with Grass Roots**. Appl Environ Microbiol, 39:1. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.39.1.219-226.1980>
- Valero, N. O.; Gómez, L. C.; Melgarejo, L. M. (2018) **Supramolecular Characterization of Humic Acids Obtained through the Bacterial Transformation of a Low Rank Coal**. Journal of the Brazilian Chemical

Society, 29(9):1842–1853. DOI: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20180060>

Vassilev, N.; Vassileva, M.; Azcon, R.; Medina, A. (2001) **Preparation of gel-entrapped mycorrhizal inoculum in the presence or absence of *Yarrowia lipolytica***. Biotechnology Letters, 23:907-909. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1010599618627>

Vassilev, N.; Vassileva, M.; Lopez, A.; Martos, V.; Reyes, A.; Maksimovic, I.; Eichler-Löbermann, B.; Malusá, E. (2015) **Unexploited Potential of Some Biotechnological Techniques for Biofertilizer Production and Formulation**. Applied Microbiology and Biotechnology, 99:4983-4996. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6656-4>

Vassilev, N.; Vassileva, M.; Martos, V.; Garcia del Moral, L. F.; 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**. Front. Plant Sci., 11:270. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00270>

Vejan, P.; Abdullah, R.; Khadiran, T.; Salmah, I.; Boyce, A. N. (2016) **Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability-A Review**. Molecules, 21 (5): 1-17. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules21050573>

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. DOI: <https://doi.org/10.1080/01904167.2019.1659330>

Vemmer, M.; Patel, A. V. (2013) **Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents**. Biological Control, 2013, 67(3):380–389. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.09.003>

- Videira, S. S.; de Oliveira, D. M.; de Moraes, R. F.; Borges, W. L.; Baldani, V. L. D.; Baldani, J. I. (2012) **Genetic diversity and plant growth promoting traits of diazotrophic bacteria isolated from two *Pennisetum purpureum* Schum. genotypes grown in the field.** Plant and Soil, 356(1):51-66. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1082-6>
- Vinceković, M.; Jurić, S.; Đermić, E.; Topolovec-Pintarić, S. (2017) **Kinetics and mechanisms of chemical and biological agents release from biopolymeric microcapsules.** J. Agric. Food Chem., 65(44):9608–9617. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b0407>
- Wilson, K. (2001) **Preparation of genomic DNA from bacteria.** Current protocols in molecular biology, 56(1):2–4. DOI: <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0204s56>
- Wu, Z.; Guo, L.; Qin, S.; Li, C. (2012) **Encapsulation of *R. planticola* Rs-2 from alginate-starch-bentonite and its controlled release and swelling behavior under simulated soil conditions.** J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 39:317–327. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1028-2>
- Wu Z.; He, Y.; Chen, L.; Han, Y.; Li, C.(2014) **Characterization of *Raoultella planticola* Rs-2 microcapsule prepared with a blend of alginate and starch and its release behavior.** Carbohydr. Polym., 110:259-267. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.04.011>
- Yang, J.; Kloepper, J. W.; Ryu, C. M. (2009) **Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress.** Trends in Plant Science, 14:1-4. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.10.004>
- Young, C. C.; Rekha, P. D.; Lai, W. A.; Arun, A. B. (2006) **Encapsulation of plant growth-promoting bacteria in alginate beads enriched with humic acid.** Biotechnol. Bioeng. 95:76–83. DOI: <https://doi.org/10.1002/bit.20957>

- Yu, C.; Han, D.; Wang, W. (2010) **Microencapsulation of gram-negative bacteria by spray drying.** Int. J. Food Eng., 6:1-13. DOI: <https://doi.org/10.2202/1556-3758.1838>
- Zago, S. L.; Dos Santos, M. F.; Konrad, D.; Fiorini, A.; Rosado, F. R.; Missio, R. F.; Vendruscolo, E. C. G. (2019) **Shelf Life of *Azospirillum brasilense* in Alginate Beads Enriched With Trehalose and Humic Acid.** Journal of Agricultural Science, 11:269-280. DOI: <https://doi.org/10.5539/jas.v11n6p269>
- Zaidi, A.; Khan, M. S.; Ahemad, M.; Oves, M. (2009) **Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria.** Acta Microbiol. Immunol. Hung., 56:263-284. DOI: <https://doi.org/10.1556/amicr.56.2009.3.6>
- Zandonadi, D. B.; Canellas, L. P.; Façanha, A. R. (2007) **Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H⁺ pumps activation.** Plant, 225:1583-1595. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0454-2>
- Zandonadi, D. B.; Santos, M. P.; Caixeta, L. S.; Marinho, E. B.; Peres, L. E. P.; Façanha, A. R. (2016) **Plant protons pump as markers of biostimulant action.** Sci. Agric., 73:24-28. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0076>