

**AVANÇOS NA PRODUÇÃO E FORMULAÇÃO DE INOCULANTES MICROBIANOS VISANDO UMA AGRICULTURA MAIS SUSTENTÁVEL****Camila Florencio<sup>a</sup>, Ricardo Bortoletto-Santos<sup>a,b</sup>, Camila P. Favaro<sup>a,c</sup>, Mariana G. Brondi<sup>a,c</sup>, Camila C. V. Velloso<sup>a,c</sup>, Rodrigo Klaic<sup>a</sup>, Caue Ribeiro<sup>a</sup>, Cristiane S. Farinas<sup>a,c,\*</sup> e Luiz H. C. Mattoso<sup>a</sup>**<sup>a</sup>Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio, Embrapa Instrumentação, 13561-206 São Carlos – SP, Brasil<sup>b</sup>Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 14800-900 Araraquara – SP, Brasil<sup>c</sup>Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, 13565-905 São Carlos – SP, Brasil

Recebido em 11/02/2022; aceito em 25/04/2022; publicado na web em 01/06/2022

ADVANCES IN THE PRODUCTION AND FORMULATION OF MICROBIAL INOCULANTS FOR A MORE SUSTAINABLE AGRICULTURE. The wide application of beneficial microorganisms in agriculture as inoculants to combat pests and diseases and/or to improve soil fertility and the nutrients availability for plants has been considered as an effective and more sustainable alternative than chemical fertilizers and agricultural defensives. However, it is necessary to examine all processing steps of these bio-based products under a more integrated view including the type of microorganisms and the whole production process in order to reduce dependence on synthetic chemical inputs. Here, recent developments on the production and formulation technologies of microbial inoculants and the main types of inoculants currently applied in agriculture are addressed. The different types of microbial formulations are compared with emphasis on the encapsulation technology. Moreover, the application of biofertilizers in seed coating and a new approach to apply biocomposites as fertilizers are discussed, presenting the main challenges and future perspectives to promote more sustainable agriculture practices.

Keywords: biofertilizer; microbial inoculant; microbial formulation; biopesticide; biocomposite.

**INTRODUÇÃO**

A população mundial vem crescendo a cada ano, demandando um aumento da produtividade agrícola de cerca de 50% até o ano de 2050.<sup>1</sup> Porém, a expansão da agricultura no Brasil é limitada a poucas novas áreas cultiváveis, dada a necessidade de preservação ambiental. Nesse contexto, os fertilizantes químicos desempenham um papel fundamental para promover o aumento da produtividade dos alimentos. Estudos mostram uma correlação direta entre o aumento do consumo de fertilizantes químicos na agricultura e o aumento da produtividade.<sup>2,3</sup> No Brasil, a produção de grãos, sementes e cereais entre 1970 e 2020 aumentou em aproximadamente 650%, enquanto a abertura de novas áreas de plantio cresceu 160%.<sup>4</sup> Já segundo a FAO, o consumo de fertilizantes no Brasil cresceu em 440% nos últimos 50 anos, enquanto a produtividade cresceu em 350% e a área plantada em 150%.<sup>5</sup>

O aumento do consumo de fertilizantes químicos também está associado a impactos ambientais. Fertilizantes fosfatados e nitrogenados têm gerado problemas relacionados à lixiviação, como eutrofização de rios e lagos.<sup>6</sup> A ureia, principal fertilizante nitrogenado em uso no mundo, pode apresentar emissões consideráveis de gases como o óxido nitroso (N<sub>2</sub>O), um gás do efeito estufa e catalisador da degradação do ozônio estratosférico.<sup>7</sup> Além dos problemas relacionados à aplicação direta desses fertilizantes, os seus processos de produção também geram impactos significativos.<sup>8</sup> Esses problemas têm motivado a adoção de práticas agrônômicas mais sustentáveis, passando pela utilização de biofertilizantes e inoculantes microbianos.<sup>9</sup> O consumo desses bioinsumos vem crescendo nos últimos 15 anos, com um mercado no Brasil de aproximadamente 45 milhões de doses de inoculante líquido e 10 milhões de doses de inoculante sólido.<sup>10</sup> Existem algumas associações nacionais que fazem o acompanhamento anual desses produtos disponíveis no mercado,

realizam análises estatísticas quanto a utilização de inoculantes microbianos e que possuem informações bastante abrangentes relacionadas ao uso de diferentes tipos de bioinsumos para nutrição vegetal no Brasil.<sup>11-13</sup>

Atualmente, diversos tipos de microrganismos são aplicados na agricultura com diferentes funções. Os gêneros de bactérias *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* são os mais utilizados para a fixação de nitrogênio atmosférico, aplicados principalmente em soja.<sup>10,14-16</sup> Aproximadamente 78% da área plantada no Brasil (36,5 milhões de hectares) utiliza inoculante microbiano para fixação de N, substituindo assim a aplicação da ureia.<sup>10</sup> Microrganismos como o fungo *Aspergillus niger* e a bactéria *Bacillus subtilis* podem ser utilizados como inoculantes para solubilização de fósforo e outros nutrientes presentes no solo.<sup>17-20</sup> O fungo *Trichoderma harzianum* tem sido amplamente utilizado para promover o biocontrole de fitopatógenos presentes no solo.<sup>21-26</sup> No entanto, a ampliação do uso dos inoculantes microbianos é limitada por questões relacionadas à reduzida viabilidade e tempo de prateleira desses produtos. Um levantamento feito para produtos comerciais a base de agentes de biocontrole de doenças de plantas no Brasil, realizado em 2012, apontou apenas 135 produtos disponíveis no mercado.<sup>27</sup> Atualmente, o número desse tipo de produto registrado chega a um total de 411, sendo 95 registrados no ano de 2020.<sup>28</sup>

O desenvolvimento de estratégias de formulação abre possibilidades de melhorar a qualidade e a preservação das cepas, além de propor novas formas de aplicação do inoculante no campo. Recentemente, estudos demonstram diferentes rotas para o desenvolvimento de novos sistemas de biofertilizantes a partir de biocompósitos, num conceito de *biorreator em grânulos*.<sup>29</sup> Essa nova estratégia permite fornecer nutrientes a partir da solubilização de fontes de baixa reatividade,<sup>30,31</sup> ou melhorar a qualidade de inoculantes aplicados em sementes, buscando maiores tempo de prateleira.<sup>32,33</sup> Esta revisão, cujo período de levantamento da literatura ocorreu de 1990 a 2021, sumariza o desenvolvimento recente de

\*e-mail: cristiane.farinas@embrapa.br

novas tecnologias para produção e formulação de biofertilizantes e inoculantes microbianos, além dos últimos avanços na utilização de insumos biológicos para nutrição de plantas visando contribuir para o desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável.

## INOCULANTES MICROBIANOS

Inoculantes microbianos são bioprodutos com microrganismos vivos que, quando aplicados ao solo, sementes ou folhas, são capazes de aumentar o crescimento e o desenvolvimento de plantas.<sup>10</sup> Sua aplicação na agricultura tem se mostrado efetiva para o aumento da produtividade agrícola e redução dos impactos ambientais causados pela aplicação exacerbada de herbicidas, pesticidas e fertilizantes químicos. Os inoculantes microbianos possuem diversas formas de ação, tais como: (i) por meio da liberação de compostos químicos que podem estimular o crescimento de plantas ou aumentar sua resistência em situações de estresse;<sup>34</sup> (ii) como agentes de biocontrole, reduzindo a incidência de doenças causadas por fitopatógenos nas plantas;<sup>25,35</sup> (iii) atuando como biofertilizantes, por meio da solubilização e aumentando a disponibilidade de nutrientes vitais para as plantas, como nitrogênio, fósforo, potássio, enxofre, entre outros.<sup>36,37</sup> Muitos dos microrganismos reportados podem atuar em mais de um mecanismo de ação,<sup>38</sup> que inclui promotores do crescimento e desenvolvimento de plantas, tais como bactérias (*Rhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*), fungos micorrizas (que associam-se simbioticamente com as raízes de plantas) e fungos filamentosos dos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Metarhizium*, entre outros.<sup>39-42</sup> Esses microrganismos podem viver livres no solo ou em relação simbiótica com as plantas, além de poderem ser aplicados separadamente ou co-inoculados (quando mais de um microrganismo está presente na formulação).<sup>43</sup>

Um dos usos mais consolidados de inoculantes está na fixação biológica de nitrogênio, aumentando a disponibilidade desse nutriente para as plantas.<sup>10,44</sup> O nitrogênio é o nutriente mais requerido pelas plantas, sendo vital para a síntese de biomoléculas como as proteínas. Embora abundante na atmosfera da Terra, as plantas apenas conseguem assimilá-lo como nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou amônio ( $\text{NH}_4^+$ ).<sup>45</sup> A fixação biológica do nitrogênio consiste na redução do nitrogênio atmosférico em amônio por meio da ação de um complexo de enzimas nitrogenase. Os microrganismos capazes de realizar este processo são divididos em dois grupos principais: fixadores simbióticos e não simbióticos.<sup>45,46</sup> As bactérias do grupo dos Rizóbios (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium* e *Sinorhizobium*, etc.) são as mais reportadas na literatura. Por meio de uma relação de simbiose com as raízes das plantas, essas bactérias são capazes de suprir até 90% da demanda de nitrogênio de plantas leguminosas.<sup>44,46</sup> Há também um grupo de fungos, denominados micorrizas, capazes de adquirir nitrogênio a partir de materiais orgânicos e transferi-lo para a planta hospedeira através de uma associação mutualística.<sup>47,48</sup> A Tabela 1 traz alguns estudos recentes com inoculantes microbianos e suas principais descobertas quanto ao crescimento e desenvolvimento de plantas.

Outro macronutriente importante para as plantas é o fósforo (P). No entanto, uma grande parte do P encontrado no solo brasileiro é insolúvel, ou seja, indisponível para as plantas.<sup>65,66</sup> Assim, a fertilização periódica do solo se faz necessária de modo a se aumentar a produtividade agrícola. Inoculantes microbianos capazes de solubilizar o fósforo presente no solo podem, a princípio, reduzir o uso de fertilizantes químicos e aumentar a produção das lavouras pela recuperação do fósforo legado ou residual. Esses microrganismos podem converter o P imobilizado em formas orgânicas e inorgânicas ( $\text{FePO}_4$ ,  $\text{AlPO}_4$ ,  $\text{CaPO}_4$ ), e em compostos que podem ser facilmente

**Tabela 1.** Inoculantes microbianos reportados, cultura agrícola de aplicação e efeitos no crescimento/desenvolvimento das plantas

Inoculante Microbiano	Espécie	Cultura	Efeito	Ref.
Bactéria	<i>Azospirillum brasiliense</i>	Milho	Produção de fitormônios; Crescimento das plantas; Tolerância em condições de estresse;	49
	<i>Azotobacter chroococcum</i>	Milho	Aumento do rendimento das plantas e dos grãos em solos com metais pesados; Secreção de fitormônios;	50
	<i>Bacillus megaterium</i>	Tomate	Aumento do crescimento e da absorção de nutrientes pelas plantas em condição de estresse salino;	51
	<i>Bacillus subtilis</i>	Milho	Aumento do rendimento dos grãos e a captação e eficiência no uso do P;	52
	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Soja	Aumento do crescimento da planta e do rendimento de grãos e da captação de N	53
	<i>Mesorhizobium spp</i>	Grão de bico	Aumento da solubilização de P e Zn de fontes inorgânicas;	54
			Aumento da fixação de N;	55
			Síntese de fitormônios; Biorremediação de Cr(VI);	56
	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Feijão	Aumento da fixação e do teor de N no solo e captação pelas plantas, aumento do rendimento dos grãos;	57
	<i>Aspergillus flavus</i>	Soja	Tolerância da planta ao estresse salino; crescimento e produção de fitormônios	58
<i>Aspergillus terreus</i>	Tomate	No crescimento da planta; na resistência contra a infecção por <i>Pseudomonas syringae</i> ;	59	
Fungo	<i>Penicillium funiculosum</i>	Soja	Resistência da planta ao estresse por metais; redução do teor de metais pesados na planta; secreção de fitormônios;	60
	<i>Rhizophagus clarus</i>	Soja e algodão	Rendimento das plantas e nos teores de P e N.	61
	<i>Trichoderma asperellum</i>	Tomate	Redução da infecção causada por fitopatógeno; Liberação de fitormônios, enzimas líticas e sideróforos; captação de nutrientes pelas plantas;	62
	<i>Trichoderma harzianum</i>	Tomate	Crescimento das raízes, produção de metabólitos secundários; resistência da planta ao estresse por metais;	63
	<i>Trichoderma virens</i>	Alface e Rúcula	Desenvolvimento das plantas e da captação de N pelas plantas;	64

assimilados pelas plantas.<sup>65,67</sup> Bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium* e *Enterobacter* e fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são reportados como agentes solubilizadores de P.<sup>16,65,68,69</sup>

O principal mecanismo de solubilização do P inorgânico ocorre pela produção e liberação de ácidos orgânicos pelos microrganismos. Esses ácidos reduzem o pH local ou aumentam a quelação dos cátions ligados ao fósforo, resultando na liberação de formas assimiláveis pelas plantas.<sup>65</sup> Em relação ao fósforo contido em material orgânico, ele pode ser liberado por meio da ação de diferentes grupos de enzimas, tais como as fitases e fosfatases.<sup>18,65</sup> Um biofertilizante comercial desenvolvido pela EMBRAPA e pela empresa BIOMA, chamado BiomaPhos, tem apresentado resultados interessantes no aumento da solubilização de fósforo e da produtividade agrícola.<sup>70</sup> Esse produto é feito com as bactérias *Bacillus subtilis* e *Bacillus megaterium* e, em plantações de milho, possibilitou um aumento de 10% na produtividade de grãos.

Potássio (K) e enxofre (S) são outros macronutrientes também muito importantes para o desenvolvimento das plantas. Microrganismos solubilizadores de K podem liberá-lo a partir de minerais insolúveis, pela produção local de ácidos orgânicos.<sup>71,72</sup> Bactérias do gênero *Bacillus* e *Pseudomonas*, assim como fungos do gênero *Aspergillus* são reportados pelos seus efeitos no aumento da disponibilidade de potássio para plantas.<sup>71,73</sup> Alguns inoculantes microbianos podem realizar a oxidação do S, uma vez que plantas somente assimilam esse elemento em sua forma oxidada. Microrganismos como *A. niger* e *Thiobacillus spp.* são exemplos desse tipo de inoculante.<sup>30,74</sup> Além dos principais macronutrientes descritos acima, micronutrientes como Zn, Mn, Cu e Fe também podem ser solubilizados por microrganismos.<sup>75-77</sup>

Alguns inoculantes microbianos podem produzir ou estimular a produção de compostos bioestimulantes/fitormônios, tais como o ácido indol-3-acético, giberelinas, citocininas e etileno, que podem contribuir para aumentar o crescimento e o desenvolvimento de plantas, além de atenuar o efeito de condições de estresse e melhorar a defesa do vegetal.<sup>78</sup> Aproximadamente 80% das bactérias podem produzir o ácido indol-3-acético, um hormônio fundamental na regulação do crescimento das plantas, estando relacionado ao alongamento celular e ao desenvolvimento do tecido vascular.<sup>78,79</sup> Um outro efeito positivo está relacionado à atenuação do efeito de condições de estresse sofridos pelas plantas. Algumas bactérias do gênero *Bacillus* aumentam a resistência das plantas em condições de seca, salinidade e presença de metais pesados no solo. Isso ocorre por

meio de mecanismos que incluem um aumento no transporte de água pelos tecidos do vegetal, aumento na disponibilidade e distribuição de nutrientes, regulação da abertura dos estômatos, estímulo ou produção de compostos antioxidantes, indução de respostas específicas pelas plantas por meio da liberação de bioestimulantes, entre outros.<sup>49,58,60,78</sup>

## TECNOLOGIAS PARA PRODUÇÃO DE BIOINSUMOS

Os bioinsumos se referem a todos os produtos, processos e tecnologias que possuam agentes biológicos em sua composição destinados ao uso na produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agropecuários, e surgem como alternativa aos fertilizantes químicos convencionais.<sup>80</sup> Um dos entraves no avanço da indústria de bioinsumos está na produção em larga escala. A produção de um biofertilizante/inoculante microbiano<sup>81</sup> deve passar pelas seguintes etapas: (a) isolamento e seleção de microrganismo efetivo e competitivo para um sistema específico ou uma variedade de culturas; (b) caracterização do microrganismo selecionado no meio de crescimento otimizado e nos parâmetros do processo de fermentação; (c) desenvolvimento de um método de formulação para garantir a persistência microbiana no solo, inclusive sob condições estressantes; (d) estudos de aplicações no campo; (e) produção a nível comercial (aumento de escala); (f) desenvolvimento de um sistema de controle de qualidade para a produção e armazenamento; (g) desenvolvimento de métodos de aplicação em campo para garantir os benefícios reivindicados. Dentre todas essas fases, a produção dos microrganismos é uma das cruciais, sendo realizada principalmente por cultivo submerso (CSm) ou em estado sólido (CES).<sup>82</sup> O desenvolvimento e otimização desses processos requer ajuste de muitos parâmetros como o tipo de substrato (meio de cultivo), temperatura, agitação, aeração, pH, relação C/N, tempo de cultivo, umidade, tamanho de partícula, e design do biorreator.

Etapas fundamentais que antecedem e sucedem o cultivo microbiano são denominadas respectivamente de “upstream” e “downstream”. A Figura 1 ilustra as principais etapas na produção de um biofertilizante/inoculante microbiano. Os processos ligados ao upstream são importantes para garantir a pureza dos bioinsumos, e evitar a contaminação por cepas de microrganismos indesejados. A contaminação do processo pode inviabilizar a utilização do produto ou gerar a perda completa da produção. Já o downstream está relacionado às fases posteriores ao cultivo dos microrganismos, como a separação dos microrganismos, a formulação e o tratamento dos resíduos da produção microbiana.

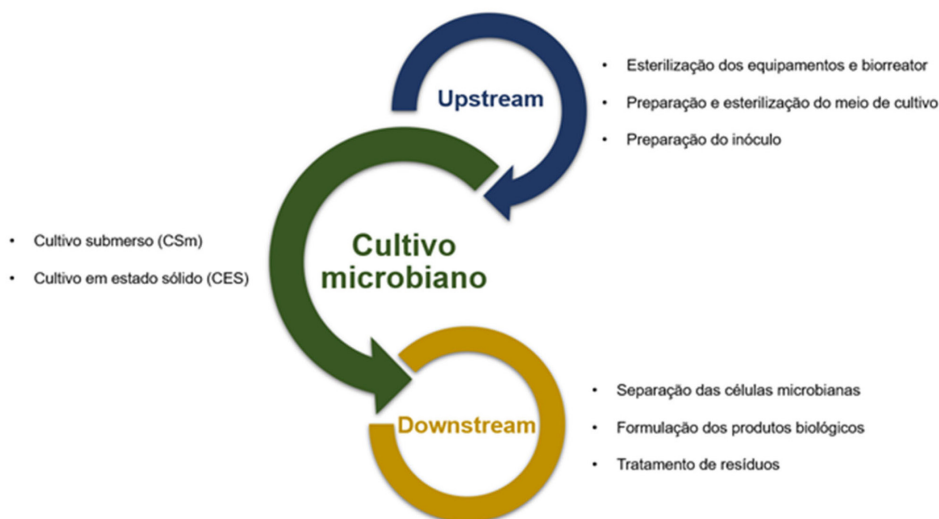


Figura 1. Esquema dos processos envolvidos na produção de bioinsumos: biofertilizante e/ou inoculante microbiano

### Cultivo submerso (CSm)

No cultivo submerso as células microbianas são cultivadas dispersas e de forma homogênea em um biorreator com meio líquido suplementado com nutrientes sob agitação/aeração.<sup>82,83</sup> Os modos de operação mais comumente utilizados são os cultivos em batelada simples e batelada alimentada (a operação contínua é raramente utilizada industrialmente para a produção de microrganismos).<sup>84</sup> O cultivo em batelada simples possui menores custos de implementação, configuração e controle dos biorreatores, sendo mais fácil e comum. Porém, apesar de a batelada alimentada demandar maior monitoramento, ela fornece melhores resultados na concentração de biomassa, além de melhor controle da inibição de substrato, produtos e outros metabólicos.<sup>84,85</sup> Por exemplo, no cultivo em batelada simples com glicose como fonte de carbono, para o crescimento de *Bacillus subtilis*, houve formação de acetato, inibindo o crescimento bacteriano. Na batelada alimentada, que fornece os nutrientes de forma gradual, evita-se a formação de produtos inibitórios, estendendo a fase exponencial e estacionária e aumentando o rendimento de biomassa e produtos.<sup>86</sup> A maior parte dos trabalhos que adotam o CSm para a produção de inoculantes microbianos são utilizados para reprodução de bactérias (Tabela 2),<sup>87</sup> sendo comum estudos em bancada para otimização de processos. Por exemplo, ajustes no coeficiente de transferência de massa conseguiram aumentar a escala de produção do *Azospirillum brasiliense* de frascos de Erlenmeyer para reatores de 10 e 1000 L, sem diminuir a produção de biomassa, com um ligeiro aumento na quantidade final no reator piloto de 1000 L.<sup>88</sup>

A maior parte dos CSm são realizados em meio líquido com nutrientes sintéticos, pela maior facilidade de controle e reprodutibilidade na produção microbiana, ainda que estudos com resíduos complexos, com ou sem suplementação, sejam identificados.<sup>90,92,95</sup> Quantidades excessivas de glicose no meio de cultivo podem reduzir ou retardar a produção de esporos pelo aumento da fase de crescimento vegetativo,<sup>95</sup> já que a produção de esporos é comumente observada após a depleção da glicose.<sup>98,99</sup> No entanto,

componentes adicionais podem auxiliar no aumento de produtividade do sistema ou controle da atividade do metabólito. Por exemplo, a adição de biochar, biomassa de origem vegetal, aumentou a dissolução de fosfato por *Aspergillus niger*,<sup>100,101</sup> através da remoção parcial do fluoreto, encontrado na rocha fosfática, e do aumento da produção de ácidos orgânicos.

### Cultivo em estado sólido (CES)

O cultivo em estado sólido consiste no crescimento de microrganismos em um substrato sólido, sem água livre, com umidade suficiente para manter o crescimento e metabolismo do microrganismo.<sup>102,103</sup> O CES vem sendo cada vez mais utilizado pela possibilidade do aproveitamento de resíduos agroindustriais e alimentos como fontes de carbono e energia para o crescimento dos microrganismos.<sup>104–107</sup> O depósito de patentes relacionadas ao CES tem aumentado desde 2001 com tendência de alta.<sup>108</sup>

O CES é mais utilizado para o crescimento de fungos filamentosos, pois simula o seu habitat natural<sup>109</sup> e apresenta taxas de crescimento superiores comparadas ao CSm.<sup>81,87,110</sup> O uso de resíduos agrícolas pode levar a produção de esporos de alta qualidade, mais eficientes do que os cultivados por CSm por possuírem maior adesão às raízes das plantas e maior resistência ao intemperismo.<sup>81</sup> Outro fator vantajoso no CES é a possibilidade de utilizar os próprios substratos de cultivo na formulação dos inoculantes como suporte físico ou carreadores, facilitando o processo de formulação.<sup>82</sup> Além de fungos filamentosos, algumas bactérias também podem crescer nesse sistema, como *Bacillus* spp.<sup>111</sup> e *Streptomyces* spp.<sup>112</sup> entre outras que crescem na rizosfera. O CES também é superior em produtividade enzimática devido à maior transcrição de genes biossintéticos, com enzimas mais estáveis a efeitos de pH, temperatura, e menos susceptíveis a inibição pelo substrato,<sup>107,109</sup> além de não gerar resíduos líquidos.<sup>87</sup>

Apesar das vantagens, o CES ainda não é tão utilizado como o CSm, que possui vantagens notáveis em relação ao escalonamento, instrumentação, controle de parâmetros (monitoramento de pH, oxigênio dissolvido, temperatura, concentração de moléculas solúveis

**Tabela 2.** Estratégias e métodos de produção de alguns biofertilizantes e inoculantes microbianos via cultivo submerso (CSm) e cultivo em estado sólido (CES). \*SRT (reator de tanque agitado)

Microrganismo	Cultivo	Substrato	Reator/Estratégia	Condições	Produção	Ref.	
<i>Azospirillum brasiliense</i> Calf e Start	CSm	Sintético	Frascos, 500 mL/Batelada	30°C; 220 rpm; 24 h	5,5 e 4,6×10 <sup>8</sup> CFU mL <sup>-1</sup>	88	
<i>Azospirillum brasiliense</i> Calf e Start		Sintético	SRT*, 10 L/Batelada	30 °C; 205 rpm; 24 h	5,7 e 4,8×10 <sup>8</sup> CFU mL <sup>-1</sup>	88	
<i>Azospirillum brasiliense</i> Calf e Start misturados		Sintético	SRT, 1000 L/Batelada	30 °C; 52 rpm; 24 h	7,5×10 <sup>8</sup> CFU mL <sup>-1</sup>	88	
<i>Sphingomonas</i> sp. DC-6		Sintético	SRT, 7,5 L/Batelada alimentada	30°C; 180 rpm; 48 h	2,8×10 <sup>9</sup> CFU mL <sup>-1</sup>	89	
<i>Bacillus licheniformis</i>		Melaço de cana	SRT, 3 L/Batelada	30°C; 200 rpm; 38 h	Não se aplica	90	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> B128		Sintético	SRT, 3 L/Batelada	30°C; 200 rpm; 48 h	4,6×10 <sup>8</sup> esporos mL <sup>-1</sup>	91	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> B128		Sintético	Airlift, 20 L/Batelada	30°C; 200 rpm; 48h	5,6×10 <sup>8</sup> esporos mL <sup>-1</sup>	91	
<i>Bacillus thuringiensis</i>		Lodo hidrolisado	SRT, 10 L/Batelada	30°C; 700 rpm; 48 h	9,4×10 <sup>8</sup> CFU mL <sup>-1</sup>	92	
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>Galleriae</i>		Sintético	SRT, 1,5 L/Batelada alimentada	30°C; 500 rpm; 24h	90,7×10 <sup>13</sup> esporos mL <sup>-1</sup>	93	
<i>Bacillus thuringiensis</i> A3-4		Sintético	Airlift, 20 L/Batelada	30°C; 2,5 vvm; 33h	2,5×10 <sup>9</sup> esporos mL <sup>-1</sup>	94	
<i>Bacillus thuringiensis</i> Yim303		Sintético	Airlift, 20 L/Batelada	30°C; 2,5 vvm; 33h	2×10 <sup>9</sup> esporos mL <sup>-1</sup>	94	
<i>Trichoderma viride</i>		H <sub>2</sub> O residual de trigo	Frascos, 500 mL/Batelada	28°C; 250 rpm; 96 h	3,0-4,2×10 <sup>10</sup> CFU mL <sup>-1</sup>	95	
<i>Beauveria bassiana</i>		CES	Casca de arroz	Leito empacotado, 0,5 L/Batelada	25°C; 12 dias	1,6×10 <sup>9</sup> esporos g <sup>-1</sup>	96
<i>Metarhizium anisopliae</i>			Arroz	Saco de polipropileno/Batelada	26°C; 15 dias	6,2×10 <sup>10</sup> esporos g <sup>-1</sup>	97
<i>Trichoderma harzianum</i>			Casca de arroz	Leito empacotado, 0,5 L/Batelada	25°C; 12 dias	2,0×10 <sup>9</sup> esporos g <sup>-1</sup>	96

em água) e separação da biomassa.<sup>107</sup> Os principais problemas a serem superados pelo CES são a falta de processos padronizados e a reprodutibilidade limitada dos resultados experimentais,<sup>108</sup> dificultando o escalonamento principalmente devido ao calor metabólico residual e heterogeneidade do sistema.<sup>87</sup> O crescimento microbiano em condições aeróbias resulta em considerável liberação de calor, indesejável especialmente aos inóculos mais sensíveis, e demandando resfriamento.<sup>87</sup> Em CSm, a retirada de calor ocorre mais facilmente devido à maior condutividade térmica dos líquidos, ao contrário dos substratos sólidos, que ficam expostos ao ar.

Inerente à remoção de calor, o processo de mistura do meio tem um papel fundamental na transferência de calor e massa, no aumento da superfície de contato e distribuição dos nutrientes. O tipo de reator determina as condições de aeração, assim como a sensibilidade do microrganismo à agitação do cultivo. Os sacos de polipropileno amplamente utilizados na produção de inoculantes microbianos são sistemas sem aeração forçada, resultando em troca de gases e transferência de calor limitados. Nesses casos, esse tipo de CES é usado apenas se a troca gasosa natural com o meio ambiente for suficiente. Por exemplo, em sistemas de produção de conídios em sacos, foi possível obter  $6,2 \times 10^{10}$  esporos  $g^{-1}$  de substrato de *Metarhizium anisoplia*, um microrganismo utilizado no controle biológico de pragas.<sup>97</sup> Biorreatores de maior escala também são reportados, como os modelos com tanque principal encamisado em condições assépticas. Nesses modelos, quando na posição vertical, o reator é considerado de leito compactado, com entrada de ar pela parte inferior cônica. Por exemplo, na produção de *A. niger* obteve-se com esse sistema  $3,1 \times 10^{12}$  esporos  $lote^{-1}$  de *A. niger*, mostrando que o modelo de biorreator testado com CES pode ser uma opção potencial para a utilização no crescimento de fungos filamentosos.<sup>96</sup> O CES não deve ser encarado como um processo de substituição do CSm, mas uma metodologia complementar, promissora e desafiadora. Sua possível implementação em larga escala ajudaria a contornar e minimizar os problemas ambientais associados a alta geração de resíduos sólidos dando origem a produtos com alto valor agregado.

Cada processo se torna único devido a uma diversidade de parâmetros envolvidos (tipos de cultivo (CSm ou CES), microrganismos, substratos, biorreatores, fatores de trabalho (temperatura, umidade, pH, aeração, etc.)), sendo que esses parâmetros precisam estar em conexão para que haja sucesso no cultivo e na formação do produto de interesse. Do ponto de vista econômico, é importante visar a busca de substratos disponíveis localmente, com características sazonais estáveis e de preços acessíveis. A escolha do processo de cultivo deve ser personalizada, levando em consideração todos esses parâmetros, relacionando a capacidade de crescimento do microrganismo em quantidade e qualidade, associado à sobrevivência celular no período de armazenamento dos bioinsumos.<sup>82</sup>

## FORMULAÇÃO DE BIOINSUMOS

A etapa *downstream* de um bioprocessamento de cultivo microbiano envolve a separação e purificação de produtos e subprodutos, ao tratamento de efluentes e ao processo de formulação do biofertilizante ou inoculante (Figura 1). Após a produção do agente microbiano, cultivado por CSm ou CES, pode ser realizada a separação e purificação celular para a obtenção da cultura pura. Porém, alguns autores evitam essa etapa e utilizam o meio de cultivo na sua forma integral, já que ele pode conter metabólitos desejáveis no produto final, embora o tempo de prateleira e a eficiência do agente microbiano aplicado desse modo ainda seja considerada baixa.<sup>113-115</sup> Existe a necessidade de otimizar o tempo de prateleira e a eficiência do agente microbiano para obter um biofertilizante/inoculante microbiano com maior potencial de ação, principalmente quando aplicado ao campo.

A etapa de formulação e a associação de microrganismos a um veículo (carreador) adequado com aditivos, surgem como estratégias e alternativas para melhorar o tempo de prateleira e a eficiência do biofertilizante, entre outras características.

O uso bem-sucedido de biofertilizantes requer a conservação de um número adequado de microrganismos promotores de crescimento de planta, já que eles devem sobreviver no ambiente rizosférico oxidativo, colonizar a superfície da raiz da planta, multiplicar e competir com a microbiota original do solo. Assim, a formulação deve ser elaborada a fim de garantir a viabilidade a longo prazo dos microrganismos durante a produção, armazenamento, transporte, aplicação e no local da inoculação, deve ser estável sob diversas condições ambientais e ser adequada para diferentes microrganismos.<sup>77,116</sup> Por essas razões, a formulação é um fator chave no sucesso de um biofertilizante e pode influenciar na comercialização bem-sucedida do produto final. A eficiência de uma formulação pode ser comprovada pelo crescimento significativo de parâmetros como: biomassa fresca e seca, alterações na morfologia radicular e na parte aérea da planta, incremento nutricional do vegetal, rendimento e produtividade.<sup>117</sup>

Os principais desafios no desenvolvimento de uma formulação eficiente são: aumentar a vida útil do agente microbiano, encontrar um material transportador e aditivo adequados e contornar problemas no transporte, armazenamento e aplicação do biofertilizante.<sup>116,118</sup>

### Tipo de formulação

Um microrganismo pode ser eficiente em condições de laboratório e/ou em casa de vegetação, mas formular esse organismo em um transportador adequado para eficiente aplicação em campo é um passo laborioso e complexo.<sup>98</sup> Existem diversos tipos de tecnologias para o desenvolvimento de formulações que incluem produtos líquidos (como emulsões, óleo e água), secos (como grânulos, pós e pós molháveis), e bioimobilizados (encapsulamento). O desenvolvimento de uma formulação adequada tem por objetivo aumentar a eficácia dos inoculantes quando aplicado ao campo e prolongar o tempo de prateleira mantendo sua atividade. Pós e grânulos secos são as melhores opções para microrganismos formadores de endósporos e são geralmente aplicados aos sulcos das sementes ou misturados ao solo, enquanto pós molháveis e líquidos contêm microrganismos metabolicamente ativos e são aplicados às sementes pré-inoculadas ou através de sistemas de fertirrigação.<sup>98,116,119</sup> Já a tecnologia de bioimobilização pode ser utilizada em células vegetativas ou esporos e pode ser aplicada no solo e em sementes, incluindo na forma de revestimento.

O transportador é geralmente um material inerte, barato e acessível, capaz de liberar lentamente células viáveis em boas condições fisiológicas, contendo um ou mais microrganismos.<sup>116</sup> Algumas características para um bom transportador incluem: (1) ser facilmente esterilizado, química e fisicamente uniforme, tendo alta capacidade de retenção de água e adequado para muitos microrganismos; (2) possuir baixo custo, ser facilmente fabricado e manipulado pela indústria; (3) a matéria-prima deve ser amplamente disponível e consistente; (4) deve permitir a adição de nutrientes e o ajuste do pH; (5) deve ser não tóxico, biodegradável, não poluente; e (6) ter prazo de validade suficiente (pelo menos 1 a 2 anos à temperatura ambiente).<sup>99,120</sup> Um transportador esterilizado tem vantagens por fornecer o microrganismo correto na concentração necessária, evitando competição com outros microrganismos. Os aditivos, juntamente com o transportador, atuam na estabilização da formulação, proteção dos microrganismos contra o stress ambiental durante o armazenamento e o transporte, além de melhorar as propriedades físico-químicas do produto final. Aditivos como

gomos, sílica, glicose, sacarose, maltose, trealose, melaço, glicerol, carboximetilcelulose e amido são frequentemente utilizados.<sup>119,121</sup> A escolha do transportador e dos aditivos depende da necessidade fisiológica do microrganismo, do tipo de aplicação (líquido, sólido ou imobilizado) e das características desejáveis no produto final.<sup>122</sup> Devido à importância dos carreadores na formulação de biofertilizantes/inoculantes microbianos, investigações sobre transportadores alternativos<sup>123-125</sup> para formulações líquidas e sólidas têm sido realizadas. Nenhum transportador pode atuar como um carreador universal em razão do desempenho de um transportador variar de acordo com a linhagem utilizada, assim como em consórcios microbianos.

As formulações líquidas são geralmente baseadas em meios nutritivos contendo aditivos como o alginato, glicerol, glicose, trealose e óleo hortícola,<sup>126-130</sup> e são tipicamente à base de água, óleos minerais ou orgânicos e polímeros, com ou sem protetores adicionais. Esses aditivos são utilizados para aumentar a adesão, a estabilidade, a nutrição, dispersão e a capacidade surfactante. As sementes são mergulhadas no inoculante líquido antes da semeadura, ou um aplicador pulveriza uniformemente esse produto sobre as mesmas.<sup>116</sup> As formulações líquidas são mais fáceis de produzir, podem ser aplicadas com facilidade pelos agricultores, poucas células são perdidas durante a formulação e utilizam materiais de baixo custo.<sup>99,126,127</sup> No entanto, o inóculo líquido tem uma liberação instantânea e muito rápida após ser introduzido no solo. Os microrganismos são entregues no solo apenas na fase inicial do crescimento das plantas e o número de microrganismos distribuídos em cada semente é heterogêneo.<sup>131</sup> Outra desvantagem são as taxas de sobrevivência bacteriana nessas formulações, que tendem a diminuir com o tempo, uma vez que esse tipo de formulação usualmente não fornece um ambiente protetor para os microrganismos, há grandes riscos de contaminação e requer baixas temperaturas de armazenamento a longo prazo para manter sua eficiência e viabilidade celular.<sup>99,116</sup> Estudos têm mostrado que formulações líquidas com a presença de aditivos estão em maior uso, uma vez que eles melhoram a proteção, desempenho e eficácia dos microrganismos.<sup>129,132-134</sup>

A formulação sólida é uma preparação na qual o microrganismo é misturado a um veículo sólido na proporção adequada,<sup>85,99,135</sup> e a qual podem ser adicionados aglutinantes, dispersantes, agentes umectantes.<sup>98</sup> Alguns materiais transportadores sólidos são resíduos agroindustriais, vermiculita, argilas, lignite, perlita, talco, fosfato de rocha, sulfato de cálcio, polissacarídeos e, principalmente, a turfa.<sup>98,130,136,137</sup> Geralmente as formulações sólidas de inoculantes são aplicadas diretamente no solo, o que demanda de melhores mecanismos de competição e sobrevivência na rizosfera. Em comparação aos produtos líquidos, possuem maior vida útil, além de serem mais fáceis de armazenar e transportar.<sup>98,99</sup> No entanto, esses produtos são propensos à contaminação, influenciando na eficiência do inoculante.<sup>135</sup> Materiais de baixo custo como resíduos agroindustriais são frequentemente estudados para esse tipo de formulação em substituição à turfa, como farelo de trigo,<sup>136</sup> cortiça, perlita,<sup>138</sup> talco,<sup>139</sup> bagaço de cana.<sup>140</sup> O material mais adequado como transportador depende do microrganismo utilizado e da finalidade do inoculante.

O uso de microrganismos como biofertilizante aplicados por métodos convencionais nas plantas na forma de pó e líquido, pode ter sua eficácia comprometida, uma vez que grande parte é perdida no ar (deriva) durante a aplicação. Ainda, são suscetíveis às alterações nas condições ambientais e podem escoar superficialmente, aumentando os custos de aplicação para o agricultor.<sup>116,131,141,142</sup> O encapsulamento, pode ser usado como uma ferramenta versátil e eficiente para proteger os microrganismos, de forma a aumentar a vida útil e dispersão na formulação, com uma liberação gradual e controlada, permitindo

impactos positivos a longo prazo.<sup>98,141</sup> Geralmente, os benefícios das formulações baseadas em encapsulamento incluem: (1) aumentar a eficácia devido à maior área superficial; (2) melhorar a atividade sistêmica devido ao menor tamanho de partícula e maior mobilidade; (3) reduzir a competição natural com microrganismos presentes nos solos; (4) proteção de estresse mecânico e das condições adversas do ambiente externo; (5) liberação controlada, constante, e direcionamento preciso e (6) a atividade metabólica e fisiológica dos microrganismos pode ser mantida por longos períodos de tempo.<sup>141-143</sup> Materiais poliméricos, como o amido, ágar, metoxi-pectina, quitosana, gomas gelana, xantana e alfarroba, proteínas do leite, poliacrilamida e álcool polivinílico, são amplamente empregados como transportadores, porém o alginato e a carragenina são os mais utilizados.<sup>130,131,144,145</sup> O alginato, polímero natural proveniente de macroalgas marinhas, é considerado o biomaterial mais comum no encapsulamento de células microbianas, devido à sua simplicidade de manipulação, flexibilidade, biodegradação e biocompatibilidade, melhorando a sobrevivência dos microrganismos. No entanto, essa abordagem precisa ser otimizada, especialmente quanto ao tipo de gel de alginato e o diâmetro das esferas. Além disso, a presença de poros na matriz de alginato facilita a difusão de moléculas hidrofílicas, sendo que a incorporação de um material de enchimento, como amido, é considerada uma boa estratégia para resolver esta limitação. A presença desse composto reduz o conteúdo de água nas esferas de alginato resultando em uma menor velocidade de secagem e maior sobrevivência, além de ser uma fonte de carbono para o microrganismo.<sup>120,142</sup>

Apesar dos benefícios evidentes para uso amplo, existem desafios no encapsulamento dos microrganismos como, a baixa sobrevivência celular durante o processo de secagem e custo de produção maior do que formulações convencionais.<sup>131,141,143</sup> Acredita-se que uma das soluções dos problemas descritos acima é o desenvolvimento de revestimentos com nanopartículas poliméricas naturais e biodegradáveis (nanoformulações), formulações microencapsuladas, assim como a utilização de nano-aditivos que podem aumentar a estabilidade de produtos microbianos encapsulados no que diz respeito às condições ambientais ou quanto ao fornecimento de substâncias necessários para o inóculo.<sup>131</sup>

Características fisiológicas das células microbianas, como tolerância ao pH e temperatura, capacidade de esporulação, produção de exopolissacarídeos, atividade antimicrobiana e tolerância a dessecação, afetam diretamente sua sobrevivência durante e após o processo de encapsulamento. Alguns estudos mostram a influência da variação de temperatura na concentração de conídios durante o período de estocagem,<sup>121,146</sup> como o encapsulamento do *Trichoderma asperellum* em grânulos de alginato, onde foi observada uma diminuição considerável de  $6 \times 10^7$  para  $1 \times 10^4$  conídios/g à 35 °C quando comparado a temperaturas menores como 8 °C e 25 °C.<sup>147</sup> Além disso, as propriedades do material (densidade, cristalinidade, solubilidade, reticulação, polaridade, degradação química e biodegradabilidade), as propriedades físicas (tamanho, razão casca/núcleo, sistema de reservatório ou matriz) e os parâmetros externos (temperatura, pH, umidade, diferença de pressão parcial, luminosidade) influenciam na liberação do microrganismo da cápsula.<sup>148</sup> Em geral, a formulação pode ser liofilizada ou transformada em uma emulsão/suspensão líquida para a assimilação dos componentes. A formulação também pode ser micronizada, microemulsificada ou revestida para modificação posterior e, finalmente, polimerizada, gelificada, seca por pulverização ou coacervada para produzir micropartículas estabilizadas.

Há estratégias para o encapsulamento de microrganismos por métodos químicos e físicos. Os métodos químicos envolvem fortes forças intermoleculares (interação eletrostática ou

hidrofóbica e ligações de hidrogênio) ou reações químicas, são utilizados principalmente três: coacervação, inclusão molecular e cocristalização.<sup>149</sup> O encapsulamento físico também conhecido como mecânico não envolve reação de polimerização, mesmo quando o material de partida são polímeros, de modo geral, ocorre apenas a ordenação da forma ou estrutura.<sup>150</sup> Secagem por pulverização, extrusão, secagem por congelamento e secagem a vácuo, revestimento em leito fluidizado, são os principais métodos de encapsulamento físico.<sup>149</sup> As tecnologias de encapsulamento mais amplamente utilizadas com suas particularidades estão representadas na Figura 2. Os métodos de encapsulamento que mais se destacam, entre todos os descritos na Figura 2, são extrusão, secagem por pulverização e gelificação iônica. A Tabela 3 traz alguns exemplos recentes da aplicação desses.<sup>144,151-157</sup>

O processo de extrusão é geralmente realizado pela mistura do microrganismo com hidrocolóides, seguido pela extrusão em uma solução de endurecimento sob pressão de imersão. O tamanho e a forma das cápsulas podem variar com base na distância da queda livre e no tamanho do poro da agulha.<sup>158</sup> Essa técnica é simples, eficaz e comumente usada para encapsulamento bacteriano. Inicialmente, os microrganismos são misturados em uma solução aquosa de biopolímero, que em seguida é extrudada. Posteriormente, métodos de gelificação e/ou revestimento podem ser aplicados para estabilizar as gotículas de biopolímero contra a dissociação ou agregação. As partículas de hidrogel criadas são coletadas, lavadas e secas para produzir microcápsulas em pó contendo células microbianas.<sup>159</sup> A pressão de extrusão deve ser regulada com base na viscosidade do fluido para um melhor encapsulamento e para a formação de pellets estáveis.<sup>141</sup>

A secagem por pulverização é um processo de desidratação que envolve a dispersão homogênea do microrganismo em um transportador, formando uma emulsão ou dispersão, seguida de atomização e pulverização em altas temperaturas.<sup>142,143</sup> Essa técnica funciona em um processo contínuo, com baixo custo operacional, bom rendimento, rápida solubilidade, tamanho pequeno e cápsulas de alta estabilidade. No entanto, apresenta baixa uniformidade no tamanho da microcápsula, limitações na seleção do material da parede e alta temperatura, o que pode impactar na integridade física da membrana dos microrganismos durante a secagem e consequente

redução em sua sobrevivência durante a imobilização.<sup>142,160</sup> O uso de alguns polímeros: alginato, goma arábica, carboximetilcelulose, gelatina, entre outros, no processo de secagem por pulverização tem resultado positivo e proporcionam ação protetora eficiente sobre os microrganismos durante o processo de encapsulamento.<sup>160,161</sup> O método de gelificação iônica é um dos mais utilizados atualmente devido a sua simplicidade e baixo custo. É um método baseado em interações iônicas entre compostos com carga oposta que interagem formando gel, sendo sua principal vantagem a biocompatibilidade. Assim como no método de secagem por pulverização, os aditivos têm complementado o encapsulamento por gelificação iônica.<sup>162,163</sup>

## INOVAÇÃO NA APLICAÇÃO DE BIOINSUMOS

Independentemente do tipo da formulação do inoculante, a semente é um dos carreadores mais comuns, levando os inóculos como revestimentos. O processo consiste em aplicar diferentes materiais na superfície da semente, geralmente em camadas, permitindo modificar as propriedades físicas (por exemplo, processo de pelletização ou granulação).<sup>32,170</sup> A tecnologia de revestimento de sementes influencia na absorção de água e nutrientes, bem como melhora o manuseio e desempenho das sementes, incluindo, por exemplo, aumento do tempo de prateleira, resistência às pragas e estresses abióticos (osmótico, salinos e de temperatura) (Figura 3).<sup>33,171,172</sup>

A incorporação de diferentes componentes benéficos no revestimento que atuarão mais próximo da semente, como fertilizantes e/ou microrganismos,<sup>33</sup> também permite proteger as culturas e os microrganismos de estresse biótico (como fitopatógenos), assim como promove um microambiente que melhora a taxa de sobrevivência dos microrganismos.<sup>172,173</sup>

Os principais processos para aplicação em sementes se baseiam na: (i) imersão em uma suspensão contendo o inoculante, por um período pré-determinado e com posterior secagem da semente; (ii) deposição do inoculante na superfície da semente, com o auxílio de uma matriz/ligante adesiva, tal como polissacarídeos e/ou gomas; (iii) revestimento de filme e (iv) pelletização. É importante destacar que a maioria dos estudos relatam de maneira genérica o tratamento de semente via revestimento (uso de filmes finos), uma vez que os estudos/experimentos são na sua maioria especificamente

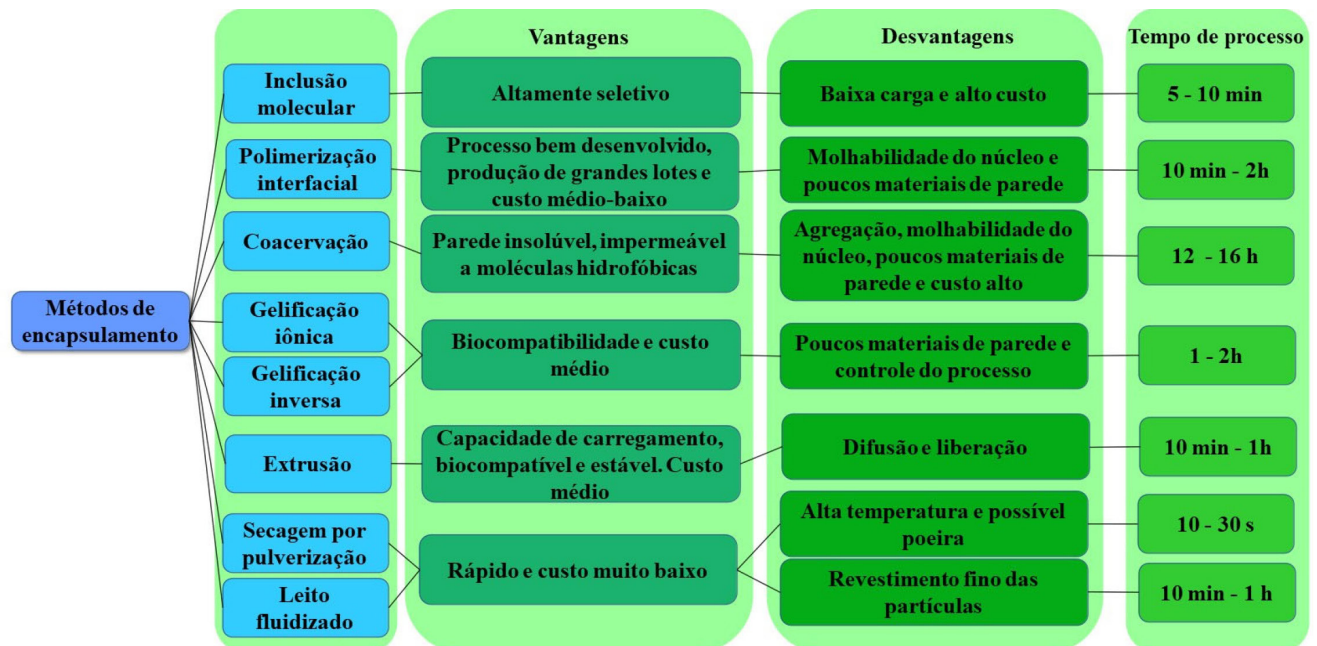
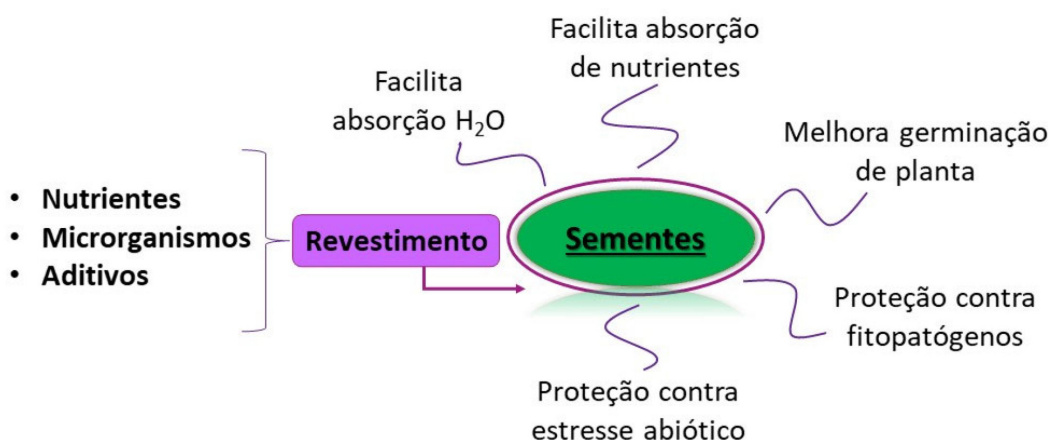


Figura 2. Esquema comparativo de diferentes estratégias de encapsulamento de microrganismos

**Tabela 3.** Exemplos de aplicação dos três métodos de encapsulamento mais utilizados descritos na literatura

Método	Microorganismo	Efeito Positivo	Ref.
Extrusão	<i>Azospirillum brasiliense</i>	Viabilidade de 120 dias, aumento do volume da raiz	164
	<i>Raoultella planticola</i>	Aumento da liberação celular, maiores teores de biodegradabilidade	165
	<i>Bacillus cereus</i>	Aumento da taxa de sobrevivência para 81%	166
Secagem por pulverização	<i>Enterobacter</i> sp	Aumento da taxa de sobrevivência em 78%	160
	Bactérias gram-negativas	Aumento da taxa de sobrevivência em até 85%	161
	<i>Streptomyces fulvissimus</i>	Liberação gradativa, com maior quantidade de bactérias no 50º dia e eficiência de 90% no controle da doença	167
Gelificação iônica	<i>Raoultella planticola</i>	Fluxo contínuo de liberação e taxa de sobrevivência de 89% durante 6 meses	163
	<i>Pseudomonas putida</i>	Aumento da biomassa, teor de proteínas solúveis, concentração de clorofila e betacarotenóides	162
	<i>Azospirillum brasiliense</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Taxa de sobrevivência preservada por 3 meses, aumento da biomassa das raízes e da parte aérea.	168
Gelificação iônica e Extrusão	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	Aumento da eficiência do encapsulamento em 71% do grânulo de alginato/amido em relação ao grânulo apenas com alginato.	169

**Figura 3.** Ações positivas nas plantas com a aplicação do revestimento de sementes, na presença de nutrientes, microrganismos e aditivos

direcionados para a área agrônômica.<sup>174,175</sup> O direcionamento quanto ao processo e aos materiais para a tecnologia de revestimento é muitas vezes negligenciado, apresentando falta de detalhes e maiores informações sobre a forma e técnica de preparo/aplicação das sementes revestidas. Os trabalhos sobre o tema implicam em sua grande maioria na imersão ou deposição do inoculante (com ou sem uma matriz) na superfície da semente, destacando a aplicação em sacos plásticos fechados e agitados até que as sementes estejam uniformemente revestidas.<sup>176</sup>

Estudos recentes voltados para a aplicação do revestimento em sementes na presença de inoculantes microbianos têm buscado novas alternativas de sistemas/formulações que sejam eficazes na germinação e desempenho das plantas, assim como economicamente e ambientalmente viáveis no sistema solo-planta-inoculante.<sup>140,177,178</sup> O desenvolvimento de formulações com materiais específicos ou multifuncionais e o entendimento de como esses materiais/polímeros afetam o sistema, são desafios para melhorar a eficiência do revestimento microbiano de sementes no campo. Empresas agroquímicas e de sementes sempre estão em busca de novas tecnologias, processos e materiais, embora os avanços nessa área sejam pouco publicados/divulgados (“conhecimento interno” ou “segredos comerciais”), nota-se a necessidade de novas tendências/abordagens direcionadas para a tecnologia de revestimento de sementes que se ajustem às condições locais de cultivo e às práticas agrícolas.<sup>176</sup>

A aplicação do revestimento microbiano em sementes e seu efeito positivo têm sido demonstrados em estudos recentes contendo diferentes espécies de bactérias e fungos, em culturas como soja e trigo.<sup>14,179</sup> Os principais resultados observados são em termos de crescimento das plantas, rendimento e teor de nutrientes das sementes,<sup>179</sup> chegando a alcançar aumentos de 40% de N total em grãos de soja.<sup>180</sup> O desenvolvimento de inoculantes para pré-inoculação, ou seja, aplicados como revestimento em sementes é viável e pode trazer muitos benefícios aos agricultores, dando flexibilidade para organizar a operação de semeadura e aumentando o uso de inoculantes.

Uma outra abordagem que vem sendo aplicada na área de biofertilizantes é desenvolvimento de biocompósitos de liberação controlada/lenta. Essa tecnologia visa promover um aumento na solubilidade de fontes de nutrientes de baixa reatividade, como rochas fosfáticas (fosfatos naturais), rochas de potássio, enxofre elementar, silicatos/carbonatos minerais, fonte de nutrientes, óxidos micronutrientes, entre outras fontes de interesse orgânico ou mineral para o setor de fertilizantes,<sup>30,31,181</sup> através da dispersão de suas partículas em uma matriz e encapsulamento simultâneo de microrganismos promotores de solubilização.

Nos biocompósitos, a solubilização dos nutrientes de baixa reatividade é garantida pelos microrganismos encapsulados na matriz. Essa estratégia mecânica-biológica está relacionada ao uso de microrganismos acidulantes naturais capazes de promover a



solubilização de nutrientes e esse processo que ocorre naturalmente no solo é potencializado pela ação de microrganismos encapsulados em biocompósito. *Aspergillus niger* (*A. niger*) e *Acidithiobacillus thiooxidans* (*A. thiooxidans*) são os microrganismos mais amplamente estudados no desenvolvimento dos biocompósitos.<sup>19,30,181</sup> A linhagem *A. niger* é capaz de promover a solubilização mineral semelhante aos microrganismos solubilizadores de fósforo e esse mecanismo está relacionado ao potencial que o *A. niger* tem de produzir ácidos orgânicos.<sup>182</sup> Por outro lado, *A. thiooxidans* produz acidez por oxidação de S<sup>0</sup> a SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>.<sup>183,184</sup>

O desenvolvimento de um biocompósito com base na dispersão de rocha fosfática nanoparticulada em uma matriz de amido, foi reportado como uma estratégia integrada para facilitar a aplicação e fornecer um substrato de suporte para um microrganismo acidulante, neste caso o fungo *A. niger*.<sup>30,31</sup> O primeiro estudo<sup>31</sup> resultou em uma notável solubilização de até 70% do fosfato total disponível em rochas fosfáticas de baixíssima solubilidade (Bayóvar e Itafós) e 100% do fosfato total disponível em um mineral de referência (hidroxiapatita), em apenas 96 h. Tal abordagem empregando bioativação de nanocompósitos de rocha fosfática e amido contribuiu significativamente para melhorar a solubilização de P, abrindo novas rotas para o desenvolvimento de biofertilizantes inteligentes baseados em matriz polissacarídica. Um segundo estudo<sup>30</sup> também avaliou a solubilização biológica da rocha fosfática a partir do desenvolvimento de um biofertilizante com base em uma matriz de amido e S<sup>0</sup>. Tal biocompósito foi preparado por extrusão a baixa temperatura e reforçado por partículas de fosfato de origem rochosa, atuando como fertilizante P. Essa estrutura mostrou ser eficaz em aumentar significativamente a oxidação de S<sup>0</sup>, enquanto fornece P por dissolução de fosfato de rocha em um ambiente ácido.

Além desses, outros biocompósitos inovadores vêm sendo avaliados, como uma ureia revestida com matriz de amido / S<sup>0</sup> e inoculada com *A. niger*. Esse modelo de biorrevestimento foi eficiente para reduzir a volatilização da ureia, a partir da acidificação produzida pelo microrganismo.<sup>185</sup> Recentemente outro estudo desenvolveu um biocompósito à base de uma matriz de amido biodegradável contendo óxidos minerais e S<sup>0</sup> em uma dispersão que permitiu o encapsulamento do *A. niger*.<sup>29</sup> Essa estratégia melhorou efetivamente a solubilidade do nutriente final, com o biofertilizante composto de amido / S<sup>0</sup> / óxido, apresentando resultados notáveis para a solubilização dos óxidos. Os resultados confirmaram um efeito sinérgico da oxidação do S<sup>0</sup> e da solubilização microbiana. Outro sistema semelhante fez uso da bactéria *A. thiooxidans* a fim de fornecer enxofre e zinco às plantas através de um biofertilizante granular.<sup>181</sup> A eficiência desse material foi avaliada em dois tipos de solos, ácido e alcalino, e foi observada redução significativa do pH no solo alcalino com o tratamento utilizando o biofertilizante com *A. thiooxidans*. Em resumo, esse trabalho demonstra que os biofertilizantes granulares desenvolvidos podem ser eficazes para aplicação no solo, uma vez que tanto as concentrações de S quanto de Zn aumentaram no solo ao longo do tempo.

Outra estratégia inovadora é o estudo de biofertilizantes baseados em nanotecnologia. Assim como os biocompósitos, esses nanobiofertilizantes têm potencial de liberação lenta, são de fácil absorção pelas plantas, minimizam a perda de nutrientes e atuam para evitar a ação indesejada de microrganismos patogênicos.<sup>186,187</sup> Estudos mostraram a aplicação de nanopartículas de silício como revestimento na forma de filmes como forma de proteger a superfície da planta. Os resultados revelaram a capacidade da nanopartícula de prevenir infecções e melhorar a resistência da planta a doenças, à seca, às altas temperaturas e à umidade.<sup>188,189</sup> A incorporação de nanopartículas nos produtos agroquímicos e junto aos biofertilizantes na presença dos microrganismos *B. subtilis*, *P. fluorescens* e *P. elgii*, mostraram

aumento no crescimento da planta em condições *in vitro*.<sup>190</sup> Acredita-se que com as características positivas apresentadas, as nanopartículas também podem ser usadas como nanobiofertilizantes, sendo uma alternativa eficaz para o setor agrícola.<sup>191,192</sup>

Todos esses estudos têm demonstrado que a aplicação de biocompósitos como fertilizantes é uma estratégia interessante que pode reduzir os impactos ambientais quando comparados aos fertilizantes processados quimicamente. Por exemplo, o processo químico para produzir fertilizantes fosfatados, como MAP (fosfato monoamônico) e DAP (fosfato diamônio) a partir de rocha fosfática, produz impactos mais negativos ao meio ambiente quando comparados aos biocompósitos.<sup>31</sup> O desenvolvimento de biocompósitos também é uma alternativa aos inoculantes microbianos que visam aumentar a solubilidade de nutrientes imobilizados no solo, como o fosfato.<sup>19,30,31</sup> Inoculantes microbianos não têm efeito significativo quando o solo não possui reservas de fosfato imobilizadas, portanto, apenas a aplicação do inoculante não atenderá à demanda de nutrientes da planta. Por outro lado, os biocompósitos carregam em sua estrutura o nutriente e os microrganismos solubilizadores, isso garante que a quantidade de nutrientes exigida pela planta seja fornecida.

## CONCLUSÕES E DESAFIOS

A compreensão de que a aplicação de bioinsumos (biofertilizantes e/ou inoculantes microbianos) podem efetivamente aumentar o crescimento e o desenvolvimento das plantas, elevando a produtividade agrícola tem sido comprovada através de inúmeras pesquisas. As principais características para se obter uma boa formulação de inoculante microbiano são amplamente conhecidas: ter facilidade de processamento e baixo custo, ser biodegradável e de fácil aplicação, fornecer proteção às células para armazenamento a longo prazo, durante o transporte e aplicação no solo (o portador deve manter os microrganismos viáveis, estáveis e protegidos) e oferecer ao microrganismo ferramentas para sobreviver contra a competição de outro organismo (ou seja, disponibilidade de nutrientes). No entanto, o uso comercial desses bioinsumos ainda apresenta alguns desafios e dificuldades técnicas a serem enfrentados de forma a garantir seu uso otimizado no campo. A maioria dessas questões está relacionada a como proteger o microrganismo e mantê-lo viável frente aos estresses bióticos e abióticos, aos métodos de entrega e a adaptação após a aplicação no solo. Mais importante ainda, um biofertilizante comercial deve ter um custo acessível e ser ambientalmente correto para ser bem aceito pelos agricultores. Ainda que, de uma forma geral, a produção de bioinsumos esteja sendo estudada frente as diferentes etapas do processo, com avanços na obtenção de microrganismos mais resistentes ou geneticamente modificados, na escolha de bons transportadores e no uso de microencapsulamento e biocompósitos, a inconsistência na aplicação em campo é ainda uma das principais dificuldades encontrada. O pH do solo, a temperatura, a disponibilidade de água, nutrientes e a diversidade microbiana podem causar diferenças no desempenho dos biofertilizantes, impactando negativamente os interesses dos agricultores em utilizá-los. Diversos avanços têm sido alcançados, tanto no acúmulo de informações quanto aos principais microrganismos envolvidos, quanto em relação ao desenvolvimento de formulações mais estáveis para a aplicação em campo. Porém, a busca por materiais com baixo custo, biodegradáveis, resistentes e que atendam a todas as questões anteriormente relatadas para a aplicação dos biofertilizantes e inoculantes microbianos no campo ainda é muito importante para ampliar as perspectivas de emprego destes sistemas.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP (2016/10636-8, 2019/05159-4 e 2020/03259-9), ao CNPq (141690/2018-6, 141303/2019-0 e 442.575/2019-0), à CAPES (código de financiamento 001 e processo 88887.498022/2020-00) pelo apoio financeiro à pesquisa e pelas bolsas concedidas, e agradecem à Rede AgroNano e ao SISNANO/MCTI.

## REFERÊNCIAS

- Arora, N. K.; *Environ. Sustainability* **2018**, *1*, 217. [Crossref]
- Ali, S. S.; Kornaros, M.; Manni, A.; Al-Tohamy, R.; El-Shanshoury, A. E.-R. R.; Matter, I. M.; Elsamahy, T.; Sobhy, M.; Sun, J.; Em *Biofertilizers*; Rakshit, A.; Meena, V. S.; Parihar, M.; Singh, H. B.; Singh, A. K., Eds.; Woodhead Publishing, 2021; cap.28.
- Yousaf, M.; Li, J.; Lu, J.; Ren, T.; Cong, R.; Fahad, S.; Li, X.; *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1. [Crossref]
- <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>, acessada em maio 2022.
- <http://www.fao.org/3/a-i6583e.pdf>, acessada em maio 2022.
- Conley J. D.; Paerl, W. H.; Howarth, R. W.; Boesch, D. F.; Seitzinger, S. P.; Havens, K. E.; Lancelot, C.; Likens, G. E.; *Science* **2009**, *323*, 1014. [Crossref]
- Bortoletto-Santos, R.; Cavigelli, M. A.; Montes, S. E.; Schomberg, H. H.; Le, A.; Thompson, A. I.; Kramer, M.; Polito, W. L.; Ribeiro, C.; *J. Cleaner Prod.* **2020**, *249*, 119329. [Crossref]
- Chen, Y.; Zhang, X.; Yang, X.; Lv, Y.; Wu, J.; Lin, L.; Zhang, Y.; Wang, G.; Xiao, Y.; Zhu, X.; Yu, X.; Peng, H.; *J. Cleaner Prod.* **2020**, *260*, 121095. [Crossref]
- Basu, A.; Prasad, P.; Das, S. N.; Kalam, S.; Sayyed, R. Z.; Reddy, M. S.; el Enshasy, H.; *Sustainability* **2021**, *13*, 1140. [Crossref]
- Santos, M. S.; Nogueira, M. A.; Hungria, M.; *AMB Express* **2019**, *9*, 205. [Crossref]
- <https://anpii.org.br>, acessada em maio de 2022.
- <https://www.anda.org.br>, acessada em maio de 2022.
- <https://www.abisol.com.br>, acessada em maio 2022.
- Hungria, M.; Campo, R. J.; Mendes, I. C.; *Biol. Fertil. Soils* **2003**, *39*, 88. [Crossref]
- Zahran, H. H.; *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1999**, *63*, 968. [Crossref]
- Chibeba, A. M.; Kyei-Boahen, S.; Guimaraes, M. de F.; Nogueira, M. A.; Hungria, M.; *Agric., Ecosyst. Environ.* **2017**, *246*, 291. [Crossref]
- Babalola, O. O.; Glick, B. R.; *J. Food, Agric. Environ.* **2012**, *10*, 540. [Crossref]
- Sharma, S. B.; Sayyed, R. Z.; Trivedi, M. H.; Gobi, T. A.; *SpringerPlus* **2013**, *2*, 587. [Crossref]
- Klaic, R.; Plotegher, F.; Ribeiro, C.; Zangirolami, T. C.; Farinas, C. S.; *Int. J. Miner. Process.* **2017**, *161*, 50. [Crossref]
- Verma, J. P.; Yadav, J.; Tiwari, K. N.; Jaiswal, D. K.; *Soil Biol. Biochem.* **2014**, *70*, 33. [Crossref]
- Eke, P.; Wakam, L. N.; Fokou, P. V. T.; Ekounda, T. V.; Sahu, K. P.; Kamdem Wankeu, T. H.; Boyom, F. F.; *Rhizosphere* **2019**, *12*, 100172. [Crossref]
- Ganuza, M.; Pastor, N.; Bocolini, M.; Erazo, J.; Palacios, S.; Oddino, C.; Reynoso, M. M.; Rovera, M.; Torres, A. M.; *J. Appl. Microbiol.* **2019**, *126*, 608. [Crossref]
- Ganuza, M.; Pastor, N.; Erazo, J.; Andrés, J.; Reynoso, M. M.; Rovera, M.; Torres, A. M.; *Eur. J. Plant Pathol.* **2018**, *151*, 257. [Crossref]
- Stummer, B. E.; Zhang, Q.; Zhang, X.; Warren, R. A.; Harvey, P. R.; *J. Appl. Microbiol.* **2020**, *129*, 971. [Crossref]
- Ramírez-Cariño, H. F.; Guadarrama-Mendoza, P. C.; Sánchez-López, V.; Cuervo-Parra, J. A.; Ramírez-Reyes, T.; Dunlap, C. A.; Valadez-Blanco, R.; *Antonie van Leeuwenhoek* **2020**, *113*, 1247. [Crossref]
- Sumida, C. H.; Daniel, J. F. S.; Araujod, A. P. C. S.; Peitl, D. C.; Abreu, L. M.; Dekker, R. F. H.; Canteri, M. G.; *Biocontrol Sci. Technol.* **2018**, *28*, 142. [Crossref]
- Bettiol, W.; Morandi, M. A. B.; Pinto, Z. v.; Paula Júnior, T. J. de; Corrêa, É. B.; Moura, A. B.; Lucon, C. M. M.; Costa, J. de C. do B.; Bezerra, J. L.; *Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas*, 1<sup>st</sup> ed., Embrapa Meio Ambiente: Jaguariúna; 2012.
- <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/Mapa-registra-recorde-de-95-defensivos-biologicos-em-2020>, acessada em maio de 2022.
- Klaic, R.; Guimaraes, G. G. F.; Giroto, A. S.; Bernardi, A. C. C.; Zangirolami, T. C.; Ribeiro, C.; Farinas, C. S.; *Curr. Microbiol.* **2021**, *78*, 1529. [Crossref]
- Guimaraes, G. G. F.; Klaic, R.; Giroto, A. S.; Majaron, V. F.; Avansi, W.; Farinas, C. S.; Ribeiro, C.; *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2018**, *6*, 12187. [Crossref]
- Klaic, R.; Giroto, A. S.; Guimaraes, G. G. F.; Plotegher, F.; Ribeiro, C.; Zangirolami, T. C.; Farinas, C. S.; *Miner. Eng.* **2018**, *128*, 230. [Crossref]
- Ma, Y.; *Biotechnol. Adv.* **2019**, *37*, 107423. [Crossref]
- O'Callaghan, M.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*, 5729. [Crossref]
- Egamberdieva, D.; Wirth, S. J.; Alqarawi, A. A.; Abd Allah, E. F.; Hashem, A.; *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1. [Crossref]
- Alori, E. T.; Babalola, O. O.; *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1. [Crossref]
- Seenivasagan, R.; Babalola, O. O.; *Biology* **2021**, *10*, 1111. [Crossref]
- Kour, D.; Rana, K. L.; Yadav, A. N.; Yadav, N.; Kumar, M.; Kumar, V.; Vyas, P.; Dhaliwal, H. S.; Saxena, A. K.; *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2020**, *23*, 101487. [Crossref]
- Nosheen, S.; Ajmal, I.; Song, Y.; *Sustainability* **2021**, *13*, 1868. [Crossref]
- Meena, V. S.; Meena, S. K.; Verma, J. P.; Kumar, A.; Aeron, A.; Mishra, P. K.; Bisht, J. K.; Pattanayak, A.; Naveed, M.; Dotaniya, M. L.; *Ecol. Eng.* **2017**, *107*, 8. [Crossref]
- Pathania, P.; Rajta, A.; Singh, P. C.; Bhatia, R.; *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2020**, *30*, 10184. [Crossref]
- dos Santos, R. M.; Diaz, P. A. E.; Lobo, L. L. B.; Rigobelo, E. C.; *Frontiers in Sustainable Food Systems* **2020**, *4*, 1. [Crossref]
- Antoine, S.; Hériché, M.; Boussageon, R.; Noceto, P. A.; van Tuinen, D.; Wipf, D.; Courty, P. E.; *Mycorrhiza* **2021**, *31*, 637. [Crossref]
- Emmanuel, O. C.; Babalola, O. O.; *Microbiol. Res.* **2020**, *239*, 126569. [Crossref]
- Franché, C.; Lindström, K.; Elmerich, C.; *Plant Soil* **2009**, *321*, 35. [Crossref]
- Moreau, D.; Bardgett, R. D.; Finlay, R. D.; Jones, D. L.; Philippot, L.; *Functional Ecology* **2019**, *33*, 540. [Crossref]
- Mahmud, K.; Makaju, S.; Ibrahim, R.; Missaoui, A.; *Plants* **2020**, *9*, 97. [Crossref]
- Makarov, M. I.; *Eurasian Soil Sci.* **2019**, *52*, 193. [Crossref]
- Bukovská, P.; Bonkowski, M.; Konvalinková, T.; Beskid, O.; Hujšlová, M.; Püschel, D.; Řezáčová, V.; Gutiérrez-Núñez, M. S.; Gryndler, M.; Jansa, J.; *Mycorrhiza* **2018**, *28*, 269. [Crossref]
- Fukami, J.; Ollero, F. J.; Megías, M.; Hungria, M.; *AMB Express* **2017**, *7*, 153. [Crossref]
- Rizvi, A.; Khan, Mohd. S.; *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2018**, *157*, 9. [Crossref]
- Nascimento, F. X.; Hernández, A. G.; Glick, B. R.; Rossi, M. J.; *Biotechnol. Reports* **2020**, *25*, 1. [Crossref]
- Pereira, N. C. M.; Galindo, F. S.; Gazola, R. P. D.; Dupas, E.; Rosa, P. A. L.; Mortinho, E. S.; Filho, M. C. M. T.; *Front. Environ. Sci.* **2020**, *8*, 40. 1. [Crossref]
- Gyoglu, C.; Boahen, S. K.; Dakora, F. D.; *Symbiosis* **2016**, *69*, 81. [Crossref]

54. Brígido, C.; Glick, B. R.; Oliveira, S.; *Microb. Ecol.* **2017**, *73*, 900. [Crossref]
55. Velez, P. A.; Talano, M. A.; Paisio, C. E.; Agostini, E.; González, P. S.; *Environ. Technol.* **2017**, *38*, 2164. [Crossref]
56. Pandey, R. P.; Srivastava, A. K.; Gupta, V. K.; O'Donovan, A.; Ramteke, P. W.; *Environ. Sustainability* **2018**, *1*, 425. [Crossref]
57. Pastor-Bueis, R.; Sánchez-Cañizares, C.; James, E. K.; González-Andrés, F.; *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2724. [Crossref]
58. Lubna; Asaf, S.; Hamayun, M.; Khan, A. L.; Waqas, M.; Khan, M. A.; Jan, R.; Lee, I.-J.; Hussain, A.; *Plant Physiol. Biochem.* **2018**, *128*, 13. [Crossref]
59. Yoo, S.-J.; Shin, D. J.; Won, H. Y.; Song, J.; Sang, M. K.; *Mycobiology* **2018**, *46*, 147. [Crossref]
60. Bilal, S.; Shahzad, R.; Khan, A. L.; Al-Harrasi, A.; Kim, C. K.; Lee, I.-J.; *J. Hazard. Mater.* **2019**, *379*, 120824. [Crossref]
61. Cely, M. V. T.; de Oliveira, A. G.; de Freitas, V. F.; de Luca, M. B.; Barazetti, A. R.; dos Santos, I. M. O.; Gionco, B.; Garcia, G. v; Prete, C. E. C.; Andrade, G.; *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 720. [Crossref]
62. Li, Y.-T.; Hwang, S.-G.; Huang, Y.-M.; Huang, C.-H.; *Crop Prot.* **2018**, *110*, 275. [Crossref]
63. Mona, S. A.; Hashem, A.; Abd\_Allah, E. F.; Alqarawi, A. A.; Soliman, D. W. K.; Wirth, S.; Egamberdieva, D.; *J. Integr. Agric.* **2017**, *16*, 1751. [Crossref]
64. Fiorentino, N.; Ventrino, V.; Woo, S. L.; Pepe, O.; de Rosa, A.; Gioia, L.; Romano, I.; Lombardi, N.; Napolitano, M.; Colla, G.; Roupheal, Y.; *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 743. [Crossref]
65. Billah, M.; Khan, M.; Bano, A.; Hassan, T. U.; Munir, A.; Gurmani, A. R.; *Geomicrobiol. J.* **2019**, *36*, 904. [Crossref]
66. Ribeiro, C.; Carmo, M.; *MRS Energy & Sustainability* **2019**, *6*, 1. [Crossref]
67. Zhao, Y.; Zhang, M.; Yang, W.; Di, H. J.; Ma, L.; Liu, W.; Li, B.; *J. Soils Sediments* **2019**, *19*, 3597. [Crossref]
68. Alori, E. T.; Glick, B. R.; Babalola, O. O.; *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1. [Crossref]
69. de Abreu, C. S.; Figueiredo, J. E. F.; Oliveira, C. A.; dos Santos, V. L.; Gomes, E. A.; Ribeiro, V. P.; Barros, B. A.; Lana, U. G. P.; Marriel, I. E.; *Genet. Mol. Res.* **2017**, *16*, 1. [Crossref]
70. <https://www.embrapa.br/en/busca-de-noticias/-/noticia/45773416/product-with-brazilian-technology-can-reverse-dependence-on-foreign-phosphorus-fertilizers>, acessada em Maio 2022.
71. Sattar, A.; Naveed, M.; Ali, M.; Zahir, Z. A.; Nadeem, S. M.; Yaseen, M.; Meena, V. S.; Farooq, M.; Singh, R.; Rahman, M.; Meena, H. N.; *Appl. Soil Ecol.* **2019**, *133*, 146. [Crossref]
72. Shirale, A. O.; Meena, B. P.; Gurav, P. P.; Srivastava, S.; Biswas, A. K.; Thakur, J. K.; Somasundaram, J.; Patra, A. K.; Rao, A. S.; *J. Plant Nutr.* **2019**, *42*, 2682. [Crossref]
73. Lodi, L. A.; Klaic, R.; Ribeiro, C.; Farinas, C. S.; *Bioresour. Technol. Rep.* **2021**, *15*, 100711. [Crossref]
74. Mohamed, A. A.; Eweda, W. E. E.; Heggo, A. M.; Hassan, E. A.; *Ann. Agric. Sci.* **2014**, *59*, 109. [Crossref]
75. Sunithakumari, K.; Padma Devi, S. N.; Vasandha, S.; *Curr. Sci.* **2016**, *110*, 196. [Crossref]
76. Adak, A.; Prasanna, R.; Babu, S.; Bidyarani, N.; Verma, S.; Pal, M.; Shivay, Y. S.; Nain, L.; *J. Plant Nutr.* **2016**, *39*, 1216. [Crossref]
77. Sammauria, R.; Kumawat, S.; Kumawat, P.; Singh, J.; Jatwa, T. K.; *Arch. Microbiol.* **2020**, *202*, 677. [Crossref]
78. Poveda, J.; González-Andrés, F.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2021**, *105*, 8629. [Crossref]
79. Khalid, A.; Tahir, S.; Arshad, M.; Zahir, Z. A.; *Aust. J. Soil Res.* **2004**, *42*, 921. [Crossref]
80. Goulet, F.; *Technol. Soc.* **2021**, *65*. [Crossref]
81. Vassilev, N.; Vassileva, M.; Lopez, A.; Martos, V.; Reyes, A.; Maksimovic, I.; Eichler-Löbermann, B.; Malusà, E.; *App. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 4983. [Crossref]
82. Vassileva, M.; Malusà, E.; Sas-Paszt, L.; Trzcinski, P.; Galvez, A.; Flor-Peregrin, E.; Shilev, S.; Canfora, L.; Mocali, S.; Vassilev, N.; *Microorganisms* **2021**, *9*, 1254. [Crossref]
83. Fazenda, M. L.; Seviour, R.; McNeil, B.; Harvey, L. M.; *Adv. Appl. Microbiol.* **2008**, *63*, 33. [Crossref]
84. Glick, B. R.; *Beneficial plant-bacterial interactions*; Springer International Publishing, Cham: Switzerland, 2015.
85. Stamenković, S.; Bešković, V.; Karabegović, I.; Lazić, M.; Nikolić, N.; *Spanish J. Agric. Res.* **2018**, *16*, 1. [Crossref]
86. Ona, O.; Van Impe, J.; Prinsen, E.; Vanderleyden, J.; *FEMS Microbiol. Lett.* **2005**, *246*, 125. [Crossref]
87. Ashok, A.; Doriya, K.; Rao, D. R. M.; Kumar, D. S.; *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2017**, *9*, 11. [Crossref]
88. Trujillo-Roldán, M. A.; Valdez-Cruz, N. A.; Gonzalez-Monterrubio, C. F.; Acevedo-Sánchez, E. V.; Martínez-Salinas, C.; García-Cabrera, R. I.; Gamboa-Suasnavart, R. A.; Marín-Palacio, L. D.; Villegas, J.; Blancas-Cabrera, A.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 9665. [Crossref]
89. Wang, H.; Jiang, K.; Zhu, Z.; Jiang, W.; Yang, Z.; Zhu, S.; Qiu, J.; Yan, X.; He, J.; He, Q.; Hong, Q.; *3 Biotech* **2018**, *8*, 294. [Crossref]
90. Mota-Pacheco, L. E.; Guadarrama-Mendoza, P. C.; Salas-Coronado, R.; Escalante, A.; Montville, T. J.; Valadez-Blanco, R.; *Agrociencia* **2019**, *53*, 1183.
91. Tzeng, Y. M.; Rao, Y. K.; Tsay, K. J.; Wu, W. S.; *J. Appl. Microbiol.* **2008**, *104*, 1275. [Crossref]
92. Brar, S. K.; Verma, M.; Barnabé, S.; Tyagi, R. D.; Valéro, J. R.; Surampalli, R.; *Process Biochem.* **2005**, *40*, 2695. [Crossref]
93. Anderson, R. K. I.; Jayaraman, K.; *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *21*, 127. [Crossref]
94. Liu, B. L.; Tzeng, Y. M.; *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *68*, 11. [Crossref]
95. Verma, M.; Brar, S. K.; Tyagi, R. D.; Surampalli, R. Y.; Valéro, J. R.; *Bioresour. Technol.* **2007**, *98*, 2154. [Crossref]
96. Sala, A.; Artola, A.; Sánchez, A.; Barrena, R.; *Bioresour. Technol.* **2020**, *296*, 122322. [Crossref]
97. Bhanu Prakash, G. V. S.; Padmaja, V.; Siva Kiran, R. R.; *Bioresour. Technol.* **2008**, *99*, 1530. [Crossref]
98. Mishra, J.; Arora, N. K. In *Bioformulations: for Sustainable Agriculture*; Arora, N. K., Mehnaz, S., Balestrini, R., eds.; Springer India: New Delhi, 2016, cap. 1.
99. Gopalakrishnan, S.; Sathya, A.; Vijayabharathi, R.; Srinivas, V. In *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity*: Vol. 2: Functional Applications; Singh, D. P., Singh, H. B., Prabha, R., eds.; Springer India: New Delhi, 2016, cap. 15.
100. Oliveira, M. G. de; Bojkov, V. N.; Araújo, B. V. H.; Ribeiro, da S. I.; Ivo, R. J.; Dutra, C. M.; *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 4906. [Crossref]
101. Oliveira, M. G. de; Lopez, Z. D.; Bojkov, V. N.; Ribeiro, S. I.; Ivo, R. J.; Dutra, C. M.; Daniel, C.; *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 3081. [Crossref]
102. Pandey, A.; Soccol, C. R.; Nigam, P.; Soccol, V. T.; *Bioresour. Technol.* **2000**, *74*, 69. [Crossref]
103. Singhania, R. R.; Sukumaran, R. K.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2007**, *142*, 60. [Crossref]
104. Sharma, P.; Gaur, V. K.; Kim, S. H.; Pandey, A.; *Bioresour. Technol.* **2020**, *299*, 122580. [Crossref]
105. Nayak, A.; Bhushan, B.; *J. Environ. Manage.* **2019**, *233*, 352. [Crossref]
106. Sharma, G.; Kaur, M.; Punj, S.; Singh, K.; *Biofuels, Bioprod. Biorefin.* **2020**, *14*, 673. [Crossref]
107. Farinas, C. S.; *Renewable Sustainable Energy Rev.* **2015**, *52*, 179. [Crossref]
108. Soccol, C. R.; Costa, E. S. F. da; Letti, L. A. J.; Karp, S. G.; Woiciechowski, A. L.; Vandenberghe, L. P. de S.; *Biotechnol. Res. Innovation* **2017**, *1*, 52. [Crossref]
109. Barrios-gonzález, J.; *Process Biochem.* **2012**, *47*, 175. [Crossref]

110. Singhanian, R. R.; Patel, A. K.; Soccol, C. R.; Pandey, A.; *Biochem. Eng. J.* **2009**, *44*, 13. [Crossref]
111. Sukumaran, R. K.; Singhanian, R. R.; Mathew, G. M.; Pandey, A.; *Renewable Energy* **2009**, *34*, 421. [Crossref]
112. Olanrewaju, O. S.; Babalola, O. O.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103*, 1179. [Crossref]
113. Gotor-Vila, A.; Usall, J.; Torres, R.; Abadias, M.; Teixidó, N.; *BioControl* **2017**, *62*, 545. [Crossref]
114. Vassilev, N.; Eichler-Löbermann, B.; Flor-Peregrin, E.; Martos, V.; Reyes, A.; Vassileva, M.; *AMB Express* **2017**, *7*, 106. [Crossref]
115. Morel, M. A.; Cagide, C.; Castro-Sowinski, S.; In *Bioformulations: for Sustainable Agriculture*; Arora, N. K., Mehnaz, S., Balestrini, R., eds.; Springer India: New Delhi, 2016, cap. 13.
116. Bashan, Y.; de-Bashan, L. E.; Prabhu, S. R.; Hernandez, J.-P.; *Plant Soil* **2014**, *378*, 1. [Crossref]
117. Soumare, A.; Boubekri, K.; Lyamlouli, K.; Hafidi, M.; Ouhdouch, Y.; Kouisni, L.; *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *7*, 425. [Crossref]
118. Herrmann, L.; Lesueur, D.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 8859. [Crossref]
119. Malusá, E.; Sas-Paszt, L.; Ciesielska, J.; *Sci. World J.* **2012**, *2012*, 491206. [Crossref]
120. Bashan, Y.; de-Bashan, L. E.; Prabhu, S. R. In *Agriculturally Important Microorganisms: Commercialization and Regulatory Requirements in Asia*; Singh, H. B., Sarma, B. K., Keswani, C., eds.; Springer Singapore: Singapore, 2016; cap. 2.
121. Locatelli, G. O.; dos Santos, G. F.; Botelho, P. S.; Finkler, C. L. L.; Bueno, L. A.; *Biol. Control* **2018**, *117*, 21. [Crossref]
122. Nakkeeran, S.; Fernando, W. G. D.; Siddiqui, Z. A.; In *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*; Siddiqui, Z. A., ed.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2006; cap. 10.
123. Sohaib, M.; Zahir, Z. A.; Khan, M. Y.; Ans, M.; Asghar, H. N.; Yasin, S.; Al-Barakah, F. N. I.; *Saudi J. Biol. Sci.* **2020**, *27*, 777. [Crossref]
124. Hardy, K.; Knight, J. D.; *Can. J. Microbiol.* **2020**, *67*, 53. [Crossref]
125. ben Rebah, F.; Prévost, D.; Yezza, A.; Tyagi, R. D.; *Bioresour. Technol.* **2007**, *98*, 3535. [Crossref]
126. Goljanian-Tabrizi, S.; Amiri, S.; Nikaein, D.; Motesharrei, Z.; *Iranian Journal of Microbiology* **2016**, *8*, 377.
127. Lee, S.-K.; Lur, H.-S.; Lo, K.-J.; Cheng, K.-C.; Chuang, C.-C.; Tang, S.-J.; Yang, Z.-W.; Liu, C.-T.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*, 7977. [Crossref]
128. Lobo, C. B.; Juárez Tomás, M. S.; Viruel, E.; Ferrero, M. A.; Lucca, M. E.; *Microbiol. Res.* **2019**, *219*, 12. [Crossref]
129. Gopi, G. K.; Meenakumari, K. S.; Nysanth, N. S.; Subha, P.; *Rhizosphere* **2019**, *11*, 100160. [Crossref]
130. Sahu, P. K.; Brahmaaprakash, G. P.; In *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity: Vol. 2: Functional Applications*; Singh, D. P., Singh, H. B., Prabha, R., eds.; Springer India: New Delhi, 2016; cap. 12.
131. Vassilev, N.; Vassileva, M.; Martos, V.; del Moral, L. F.; Kowalska, J.; Tytkowski, B.; Malusá, E.; *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*, 270. [Crossref]
132. Arora, N. K.; Verma, M.; Mishra, J. In *Rhizotrophs: Plant Growth Promotion to Bioremediation*; Mehnaz, S., ed.; Springer, 2017; cap. 4.
133. Rivera, D.; Obando, M.; Barbosa, H.; Tapias, D. R.; Buitrago, R. B.; *Univ. Sci.* **2014**, *19*, 265. [Crossref]
134. Tittabutr, P.; Payakapong, W.; Teamroong, N.; Singleton, P. W.; Boonkerd, N.; *ScienceAsia* **2007**, *33*, 69. [Crossref]
135. Brahmaaprakash, G. P.; Sahu, P. K.; *J Indian Inst. Sci.* **2012**, *92*, 36.
136. Pandey, P.; Maheshwari, D. K.; *Can. J. Microbiol.* **2007**, *53*, 213. [Crossref]
137. Rose, M. T.; Deaker, R.; Potard, S.; Tran, C. K. T.; Vu, N. T.; Kennedy, I. R.; *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *27*, 1649. [Crossref]
138. Albareda, M.; Rodríguez-Navarro, D. N.; Camacho, M.; Temprano, F. J.; *Soil Biol. Biochem.* **2008**, *40*, 2771. [Crossref]
139. Gupta, M.; Dohroo, N. P.; *Agric. Sci. Dig.* **2014**, *34*, 281. [Crossref]
140. Doni, F.; Isahak, A.; Che Mohd Zain, C. R.; Mohd Ariffin, S.; Wan Mohamad, W. N.; Wan Yusoff, W. M.; *SpringerPlus* **2014**, *3*, 1. [Crossref]
141. John, R. P.; Tyagi, R. D.; Brar, S. K.; Surampalli, R. Y.; Prévost, D.; *Crit. Rev. Biotechnol.* **2011**, *31*, 211. [Crossref]
142. Schoebitz, M.; Belchí, M. D. L. In *Bioformulations: For Sustainable Agriculture*; Arora, N. K., Mehnaz, S., Balestrini, R., eds.; Springer India: New Delhi, 2016, cap. 14.
143. Schoebitz, M.; López, M. D.; Roldán, A.; *Agron. Sustainable Dev.* **2013**, *33*, 751. [Crossref]
144. Liffourrena, A. S.; Lucchesi, G. I.; *J. Biotechnol.* **2018**, *278*, 28. [Crossref]
145. Rathore, S.; Desai, P. M.; Liew, C. V.; Chan, L. W.; Heng, P. W. S.; *J. Food Eng.* **2013**, *116*, 369. [Crossref]
146. Mancera-López, M. E.; Izquierdo-Estévez, W. F.; Escalante-Sánchez, A.; Ibarra, J. E.; Barrera-Cortés, J.; *Biocontrol Sci. Technol.* **2019**, *29*, 107. [Crossref]
147. Lopes, A. R. de O.; Locatelli, G. O.; Barbosa, R. de M.; Lobo Junior, M.; Moura Mascarim, G.; Lamenha Luna Finkler, C.; *J. Microencapsulation* **2020**, *37*, 270. [Crossref]
148. Hack, B.; Egger, H.; Uhlemann, J.; Henriët, M.; Wirth, W.; Vermeer, A. W. P.; Duff, D.; *Chem. Ing. Tech.* **2012**, *84*, 223. [Crossref]
149. Sonawane, S. H.; Bhanvase, B. A.; Sivakumar, M.; Potdar, S. B. In *Encapsulation of Active Molecules and Their Delivery System*; Sonawane, S. H., Bhanvase, B. A., Sivakumar, M., eds.; Elsevier, 2020; cap. 1.
150. Trojanowska, A.; Nogalska, A.; Valls, R. G.; Giamberini, M.; Tytkowski, B.; *Physical Sciences Reviews* **2017**, *2*, 1. [Crossref]
151. Wu, Z.; Zhao, Y.; Kaleem, I.; Li, C.; *Eur. J. Soil Biol.* **2011**, *47*, 152. [Crossref]
152. Rekha, P. D.; Lai, W. A.; Arun, A. B.; Young, C. C.; *Bioresour. Technol.* **2007**, *98*, 447. [Crossref]
153. Perez, J. J.; Francois, N. J.; Maroniche, G. A.; Borrajo, M. P.; Pereyra, M. A.; Creus, C. M.; *Carbohydr. Polym.* **2018**, *202*, 409. [Crossref]
154. Bhise, K. K.; Dandge, P. B.; *Arch. Agron. Soil Sci.* **2019**, *65*, 1955. [Crossref]
155. Trejo, A.; de-Bashan, L. E.; Hartmann, A.; Hernandez, J. P.; Rothballer, M.; Schmid, M.; Bashan, Y.; *Environ. Exp. Bot.* **2012**, *75*, 65. [Crossref]
156. Saberi-Rise, R.; Moradi-Pour, M.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *152*, 1089. [Crossref]
157. Chhetri, T. K.; Subedee, B. R.; Pant, B.; *Nepal J. Biotechnol.* **2019**, *7*, 39. [Crossref]
158. Krasaekoopt, W.; Bhandari, B.; Deeth, H.; *Int. Dairy J.* **2003**, *13*, 3. [Crossref]
159. Vejan, P.; Abdullah, R.; Khadiran, T.; Ismail, S.; *Lett. Appl. Microbiol.* **2019**, *68*, 53. [Crossref]
160. Campos, D. C.; Acevedo, F.; Morales, E.; Aravena, J.; Amiard, V.; Jorquera, M. A.; Inostroza, N. G.; Rubilar, M.; *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *30*, 2371. [Crossref]
161. Yu, C.; Han, D.; Wang, W.; *Int. J. Food Eng.* **2010**, *6*, 1. [Crossref]
162. He, Y.; Wu, Z.; Tu, L.; Shan, C.; *J. Plant Nutr.* **2017**, *40*, 1180. [Crossref]
163. He, Y.; Wu, Z.; Tu, L.; Han, Y.; Zhang, G.; Li, C.; *Appl. Clay Sci.* **2015**, *109–110*, 68. [Crossref]
164. Marcelino, P. R. F.; Milani, K. M. L.; Mali, S.; dos Santos, O. J. A. P.; de Oliveira, A. L. M.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*, 7323. [Crossref]
165. Wu, Z.; Guo, L.; Qin, S.; Li, C.; *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *39*, 317. [Crossref]
166. Chen, K.-N.; Chen, C.-Y.; Lin, Y.-C.; Chen, M.-J.; *J. Agric. Sci.* **2013**, *5*, 153. [Crossref]
167. Saberi-Riseh, R.; Moradi-Pour, M.; *Pest Manage. Sci.* **2021**, *77*, 4357. [Crossref]

168. Meftah Kadmiri, I.; el Mernissi, N.; Azaroual, S. E.; Mekhzoum, M. E. M.; Qaiss, A. E. K.; Bouhfid, R.; *Curr. Microbiol.* **2021**, *78*, 86. [Crossref]
169. Rohman, S.; Kaewtatip, K.; Kantachote, D.; Tantirungkij, M.; *J. Appl. Polym. Sci.* **2021**, *138*, 1. [Crossref]
170. Pedrini, S.; Merritt, D. J.; Stevens, J.; Dixon, K.; *Trends Plant Sci.* **2017**, *22*, 106. [Crossref]
171. Rakesh, P. R.; *Int. J. Pure Appl. Biosci.* **2017**, *5*, 2043. [Crossref]
172. Zvinavashe, A. T.; Lim, E.; Sun, H.; Marelli, B.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2019**, *116*, 25555. [Crossref]
173. Pacheco-Aguirre, J. A.; Ruíz-Sánchez, E.; Ballina-Gómez, H. S.; Alvarado-López, C. J.; *Agrociencia* **2017**, *51*, 173.
174. Halmer, P.; *Acta Hortic.* **2008**, *771*, 17. [Crossref]
175. TeKrony, D. M.; *Crop Sci.* **2001**, *41*, 1636. [Crossref]
176. Rocha, I.; Ma, Y.; Souza-Alonso, P.; Vosátka, M.; Freitas, H.; Oliveira, R. S.; *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, 31. [Crossref]
177. Mastouri, F.; Björkman, T.; Harman, G. E.; *Phytopathology* **2010**, *100*, 1213. [Crossref]
178. Tu, L.; He, Y.; Shan, C.; Wu, Z.; *BioMed Res. Int.* **2016**, *2016*, 1. [Crossref]
179. Erdemci, İ.; *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **2021**, *52*, 792. [Crossref]
180. Hungria, M.; Nogueira, M. A.; Campos, L. J. M.; Menna, P.; Brandi, F.; Ramos, Y. G.; *Agron. J.* **2020**, *112*, 5222. [Crossref]
181. Mattiello, E. M.; da Silva, R. C.; Degryse, F.; Baird, R.; Gupta, V. V. S. R.; McLaughlin, M. J.; *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 1108. [Crossref]
182. Klaic, R.; Gava Junior, M.; Florencio, C.; Ribeiro, C.; Farinas, C. S.; *Pesqui. Agropecu. Bras.* **2021**, *56*, 1. [Crossref]
183. Bevilaqua, D.; Leite, A. L. L. C.; Garcia, O.; Tuovinen, O. H.; *Process Biochem.* **2002**, *38*, 587. [Crossref]
184. Yang, L.; Zhao, D.; Yang, J.; Wang, W.; Chen, P.; Zhang, S.; Yan, L.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103*, 7819. [Crossref]
185. Majaron, V. F.; da Silva, M. G.; Bortoletto-Santos, R.; Klaic, R.; Giroto, A.; Guimarães, G. G. F.; Polito, W. L.; Farinas, C. S.; Ribeiro, C.; *Ind. Crops Prod.* **2020**, *154*, 112717. [Crossref]
186. Madanayake, N. H.; Hossain, A.; Adasooriya, N. M.; *Qual. Assur. Saf. Crops Foods* **2021**, *13*, 20. [Crossref]
187. Sangeetha, J.; Mundaragi, A.; Thangadurai, D.; Maxim, S. S.; Pandhari, R. M.; Alabhai, J. M. In *Nanotechnology for Agriculture: Crop Production & Protection*; Panpatte, D. G., Jhala, Y. K., eds.; Springer, 2019; cap. 1.
188. Strout, G.; Russell, S. D.; Pulsifer, D. P.; Erten, S.; Lakhtakia, A.; Lee, D. W.; *Ann. Bot.* **2013**, *112*, 1141. [Crossref2]
189. Rastogi, A.; Tripathi, D. K.; Yadav, S.; Chauhan, D. K.; Živčák, M.; Ghorbanpour, M.; El-Sheery, N. I.; Brestic, M.; *3 Biotech* **2019**, *9*, 11. [Crossref]
190. Karunakaran, G.; Suriyaprabha, R.; Rajendran, V.; Kannan, N.; *IET Nanobiotechnol.* **2016**, *10*, 171. [Crossref]
191. Fatima, F.; Hashim, A.; Anees, S.; *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2021**, *28*, 1292. [Crossref]
192. Mahapatra, D. M.; Satapathy, K. C.; Panda, B.; *Sci. Total Environ.* **2022**, *803*, 17. [Crossref]