



MOACIR CAETANO DO COUTO JUNIOR

**BIONANOPARTÍCULAS E BIONANOCOMPÓSITO EM
MATRIZ BIOLÓGICA E SEUS EFEITOS NO CRESCIMENTO
IN VITRO DE BATATA-DOCE**

**LAVRAS-MG
2026**

MOACIR CAETANO DO COUTO JUNIOR

**BIONANOPARTÍCULAS E BIONANOCOMPÓSITO EM MATRIZ BIOLÓGICA E
SEUS EFEITOS NO CRESCIMENTO *IN VITRO* DE BATATA-DOCE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Joyce Doria
Orientadora

Profa. Dra. Tatiana Cardoso e Bufalo
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2026**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Couto Junior, Moacir Caetano do.

Bionanopartículas e bionanocompósito em matriz biológica e
seus efeitos no crescimento *in vitro* de batata-doce / Moacir
Caetano do Couto Junior. - 2026.

99 p.: il.

Orientador(a): Joyce Dória.

Coorientador(a): Tatiana Cardoso e Bufalo.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2026.

Bibliografia.

1. Cultura de tecidos. 2. Nanopartículas. 3. Biossíntese. 4.
Microrganismos promotores de crescimento. I. Doria, Joyce Dória.
II. Cardoso e Bufalo, Tatiana. III. Título.

MOACIR CAETANO DO COUTO JUNIOR

BIONANOPARTÍCULAS E BIONANOCOMPÓSITO EM MATRIZ BIOLÓGICA E SEUS EFEITOS NO CRESCIMENTO *IN VITRO* DE BATATA-DOCE

BIO-NANOPARTICLES AND BIO-NANOCOMPOSITES IN A BIOLOGICAL MATRIX AND THEIR EFFECTS ON THE *IN VITRO* GROWTH OF SWEET POTATO.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA, em 20 de março de 2026.

Dra. Franscinely Aparecida de Assis UNICERRADO

Dr. Dr. Adriano Bortolotti da Silva UNIFENAS

Dra. Claudineia Nunes. UFMG

Prof. Dra. Joyce Doria
Orientador

Profa. Dra. Tatiana Cardoso e Bufalo
Coorientadora

LAVRAS-MG
2026

*Ao Moacir Junior de 5 anos de idade, por me
mostrar que a vida não é uma busca incessante
por validação e aprovação.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado todas as oportunidades e condições de chegar até aqui e viver esses momentos de grande aprendizado pessoal e intelectual e conhecer tantas pessoas e histórias, que certamente nunca mais esquecerei.

A minha família, em especial à minha noiva Thaís Prado por todo incentivo, apoio e reconhecimento. Aos meus pais Rosangela e Moacir e ao meu irmão Eduardo, pelo apoio que sempre me proporcionaram.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Agricultura, por me proporcionarem a oportunidade e a estrutura necessária para realizar um mestrado de excelência.

As minhas orientadoras Professora Joyce Doria e Professora Tatiana Cardoso e Bufalo, pela amizade, pela confiança, pela orientação e disponibilidade, por todos os conhecimentos transmitidos, por todas as oportunidades e por todo incentivo durante esse processo de aprendizagem, além do auxílio financeiro para que meu mestrado pudesse ser realizado.

Aos meus amigos do LCT/LABIMP, agradeço imensamente a parceria e a troca de conhecimentos.

Aos técnicos do laboratório, Anita, Camila, Josi e Vantuil, muito obrigado pela disponibilidade e paciência por compartilhar tempo e conhecimento para me ajudar sempre que eu precisei.

A Dra. Mariana Ribeiro, por me ajudar e ensinar a base da cultura de tecidos e por me acompanhar durante toda minha pesquisa, muito obrigado pela amizade e pelo seu companheirismo. Aos doutores Amanda Vilela, Leandro Israel da Silva e Tainá Torres, muito obrigado pela amizade, pela disponibilidade de me ajudar sempre que precisei, pela troca de conhecimentos e por todos os momentos que compartilhamos. Ao Dr. Filipe Almendagna, por toda gentileza e por todo o conhecimento compartilhado, meu sincero muito obrigado! Aos colegas de trabalho, Andrêssa Cardozo, Dra. Aline Bastos de Paiva e Dra. Caroline Dambroz e aos ICs Laís Braga, Júlia Bastos e Gustavo Lopes, vocês foram fundamentais!

Aos professores Dr. Eduardo Alves, Dr. Thiago Pires e Dr. Sérgio Henriques por disponibilizarem o laboratório e os equipamentos para a realização das análises.

Ao CNPq, CAPES e FAPEMIG, pelo apoio financeiro aos projetos de pesquisas e concessão de bolsas aos membros da equipe. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - código de financiamento 001, pela concessão da bolsa de Mestrado.

Muito obrigado!

*“Emancipate yourself from mental slavery,
none but ourselves can free our minds!”
(Bob Marley, 1979)*

RESUMO

A batata-doce (*Ipomea batatas* L.) é uma hortaliça tuberosa da família Convolvulaceae, com grande importância para pequenos produtores. Pode ser facilmente cultivada em condições controladas, com crescimento rápido e manipulação simples, se tornando uma excelente ferramenta para pesquisa. Insumos e defensivos químicos sintéticos foram responsáveis pela evolução da agricultura a qual temos conhecimento. Os bioinsumos e a nanotecnologia se apresentam como estratégias inovadoras que podem complementar os manejos atuais, gerando economia, resultados satisfatórios e sustentabilidade. Objetivou-se investigar a utilização/integração entre microrganismos e nanomateriais no crescimento e nutrição de batata-doce *in vitro*. Realizou-se a ativação do microrganismo promotor de crescimento (*Gluconacetobacter diazotrophicus*), a síntese de nanopartículas pelo microrganismo e a inoculação em batata-doce *in vitro*, para verificar o efeito da bactéria, das nanopartículas e da interação da bactéria com a nanopartícula no crescimento e na nutrição das plantas. A interação entre a bactéria e a planta foi negativa em todas as condições avaliadas. A utilização de nanopartículas não apresentou diferença significativa em relação aos controles no comprimento da parte aérea, de raiz e na massa seca, diferente da absorção de nutrientes, que foi equivalente aos controles com zinco (Zn) e cobre (Cu). Os tratamentos não se mostraram eficientes no que diz respeito ao conteúdo de pigmentos fotossintéticos (clorofila total e carotenoides). A bactéria *G. diazotrophicus* se mostrou promissora como matriz para a produção de nanopartículas de Zn e Cu de forma sustentável. A utilização da bactéria *G. diazotrophicus* não foi uma boa alternativa para utilização *in vitro* nas condições testadas. A utilização *in vitro* de nanopartículas de Zn, Cu e do composto Zn/Cu biossintetizadas se apresenta como uma alternativa a ser mais bem compreendida para futuras aplicações.

Palavras-chave: Cultura de tecidos. *Ipomea batatas* L.. Nanotecnologia. Microrganismos promotores de crescimento.

ABSTRACT

Sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) is a tuberous vegetable of the family Convolvulaceae and is of great importance to smallholder farmers. It can be easily cultivated under controlled conditions, with rapid growth and simple handling, making it an excellent model for research. Synthetic chemical inputs and pesticides have driven the development of modern agriculture as we know it. Bioinputs and nanotechnology have emerged as innovative strategies that can complement current management practices, promoting cost savings, satisfactory outcomes, and sustainability. The objective of this study was to investigate the use and integration of microorganisms and nanomaterials in the *in vitro* growth and nutrition of sweet potato. The plant growth-promoting microorganism (*Gluconacetobacter diazotrophicus*) was activated, nanoparticles were synthesized by the microorganism, and *in vitro* sweet potato cultures were inoculated to assess the effects of the bacterium, the nanoparticles, and the interaction between the bacterium and the nanoparticles on plant growth and nutrition. The interaction between the bacterium and the plant was negative under all conditions evaluated. The use of nanoparticles showed no significant differences compared with the controls in shoot length, root length, or dry mass; however, nutrient uptake was equivalent to that observed in the zinc (Zn) and copper (Cu) control treatments. The treatments were not effective in terms of photosynthetic pigment content (total chlorophyll and carotenoids). The bacterium *G. diazotrophicus* proved promising as a matrix for the sustainable production of Zn and Cu nanoparticles. However, the use of *G. diazotrophicus* was not a suitable alternative for *in vitro* application under the conditions tested. The *in vitro* use of biosynthesized Zn, Cu, and Zn/Cu composite nanoparticles appears to be an approach that warrants further investigation for future applications.

Keywords: Tissue culture. *Ipomea batatas* L. Nanotechnology. Growth-promoting microorganisms

INDICADORES DE IMPACTOS

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o uso de bactéria promotora de crescimento vegetal na biossíntese de bionanopartículas de Zn e Cu e do bionanocompósito de Zn/Cu, bem como os efeitos das nanopartículas como nanofertilizantes além dos efeitos da bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* no crescimento de batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) *in vitro*, contribuindo para a geração de conhecimento científico aplicado às áreas de biotecnologia, nanotecnologia e crescimento vegetal. Os resultados obtidos indicam impactos tecnológicos e ambientais relevantes, ao demonstrar a viabilidade da síntese biológica de nanopartículas como alternativa a rotas físicas e químicas convencionais, reduzindo o uso de reagentes tóxicos, o consumo energético e a geração de resíduos. Considerando os impactos tecnológicos, o estudo contribui para o avanço de estratégias inovadoras para produção e utilização de nanofertilizantes e bioinsumos, com potencial aplicação em sistemas de produção vegetal, tornando-os mais sustentáveis com o menor uso de fertilizantes convencionais, reduzindo custos e aumentando a produtividade. Os impactos econômicos são potenciais na redução da utilização de fertilizantes convencionais, além da adoção de processos biológicos para a síntese de nanopartículas pode reduzir custos de produção e agregar valor a tecnologias nacionais voltadas ao setor agroindustrial, beneficiando, em médio e longo prazo, produtores rurais e cadeias produtivas associadas. Sob a perspectiva ambiental e social os impactos se relacionam com a utilização racional de insumos, além da diminuição da exposição humana a produtos convencionais que podem trazer risco à saúde humana. Esta pesquisa mantém um caráter extensionista, envolvendo a participação de docentes, técnicos e alunos da pós-graduação de diferentes áreas da UFLA, oferecendo uma solução inovadora para o setor agrícola e ambiental, beneficiando diretamente produtores rurais, indústrias de fertilizantes e a sociedade. O trabalho se enquadra, principalmente, nas áreas temáticas de extensão “Meio Ambiente” e “Tecnologia e Produção”, ao desenvolver fertilizantes inovadores e bioinsumos, conforme a Política Nacional de Extensão Universitária, e apresenta alinhamento com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da ONU, especialmente os ODS 2 (Fome Zero e Agricultura Sustentável), 9 (Indústria, Inovação e Infraestrutura), 12 (Consumo e Produção Responsáveis) e 13 (Ação contra a Mudança Global do Clima). Embora desenvolvido em ambiente laboratorial, os impactos gerados possuem caráter potencial e indireto, com possibilidade de desdobramentos futuros em ações extensionistas, transferência de tecnologia e aplicações em escala produtiva, contribuindo para a sociedade e para o desenvolvimento científico e tecnológico nacional.

IMPACT INDICATORS

The present study aimed to evaluate the use of a plant growth-promoting bacterium in the biosynthesis of Zn and Cu bionanoparticles and a Zn/Cu bionanocomposite, as well as the effects of these nanoparticles as nanofertilizers, in addition to the effects of the bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* on the *in vitro* growth of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.), thereby contributing to the generation of applied scientific knowledge in the fields of biotechnology, nanotechnology, and plant growth. The results obtained indicate relevant technological and environmental impacts by demonstrating the feasibility of biological nanoparticle synthesis as an alternative to conventional physical and chemical routes, reducing the use of toxic reagents, energy consumption, and waste generation. From a technological standpoint, the study contributes to the advancement of innovative strategies for the production and use of nanofertilizers and bioinputs, with potential application in plant production systems, making them more sustainable through reduced use of conventional fertilizers, lower costs, and increased productivity. Potential economic impacts include the reduction in the use of conventional fertilizers, as well as the adoption of biological processes for nanoparticle synthesis, which may reduce production costs and add value to national technologies aimed at the agroindustrial sector, benefiting, in the medium and long term, rural producers and associated production chains. From an environmental and social perspective, the impacts are related to the rational use of inputs and the reduced human exposure to conventional products that may pose risks to human health. This research maintains an extension-oriented character, involving the participation of faculty members, technical staff, and graduate students from different areas at UFLA, offering an innovative solution for the agricultural and environmental sectors and directly benefiting rural producers, fertilizer industries, and society. The study is primarily aligned with the extension thematic areas of “Environment” and “Technology and Production,” as defined by the National Policy for University Extension, through the development of innovative fertilizers and bioinputs. It is also aligned with the United Nations Sustainable Development Goals (SDGs), particularly SDG 2 (Zero Hunger and Sustainable Agriculture), SDG 9 (Industry, Innovation and Infrastructure), SDG 12 (Responsible Consumption and Production), and SDG 13 (Climate Action). Although developed in a laboratory environment, the impacts generated are potential and indirect, with the possibility of future developments in extension activities, technology transfer, and applications at a productive scale, thereby contributing to society and to national scientific and technological development.

LISTA DE FIGURAS

Figure 1. Classification of nanomaterials according to their dimensions - length, height, and width: (A) Zero-dimension - 0D, (B) One-dimension - 1D, (C) Two-dimension - 2D, and (D) Three-dimension - 3D.	20
Figure 2. Co-occurrence network of author keywords from 421 articles on nanofertilizers in agriculture (2015–2025) based on data from the Web of Science Core Collection. The map was generated using VOSviewer with fractional counting and a minimum threshold of fi.....	21
Figure 3. Comparison of the area-to-volume (SA/V) ratio of spherical particles of different diameters. As the particle size decreased to the nanoscale, the SA/V ratio increased exponentially, enhancing the chemical reactivity and interaction with plant tissues. T	24
Figure 4. Comparison between conventional fertilizers and nanoencapsulated nutrient structures. (A) Molecular units of potassium chloride (KCl), phosphorus pentoxide (P ₂ O ₅), and urea (CO(NH ₂) ₂) with dimensions smaller than 2 nm. (B) Aggregated P ₂ O ₅ forming unsta.....	25
Figure 5. Overview of green synthesis routes for nanoparticle production. (A) Examples of bioactive compounds used in green synthesis, including phenolic compounds, alkaloids, flavonoids, and enzymes, extracted from plants, fungi, and bacteria. (B) Stages of micr algae-mediated biosynthesis illustrating algal growth, metabolite extraction, nanoparticle formation, and purification. These eco-friendly methods reduce energy consumption and avoid toxic by-products, thus offering a sustainable alternative to conventional nanoparticle synthesis.	26
Figure 6. Pathways of nanoparticle (NP) uptake and transport pathways in plants. (A) Foliar application: NPs penetrated leaf tissues through the stomata, trichomes, cuticular cracks, and aqueous pores. After entering the mesophyll, NPs are translocated via sympla	30
Figure 7. Técnica de espalhamento em superfície da bactéria <i>G. diazotrophicus</i> exposta a concentrações de ZnSO ₄ , CuSO ₄	71
Figure 8. Espectro de absorbância (UV-vis) do meio MS e do caldo nutriente para verificação de síntese de nanopartículas pelos componentes dos meios..	72
Figure 9. Espectro de absorbância (UV-vis) de material biológico para verificação de síntese de nanopartículas.	74
Figura 10. Espectro de absorbância (UV-vis) – Pellet bacteriano tratado em sonicador ultrassônico (Ultrasonique) por 420 segundos com 95% da potência total para dispersão das nanopartículas das células bacterianas.	76
Figura 11. Eletromicrografia de varredura de <i>G. diazotrophicus</i>	77
Figura 12. Análise ultraestrutural de <i>G. diazotrophicu</i> , em microscopia eletrônica de transmissão.	78
Figura 13. Visualização do efeito da bactéria <i>G. diazotrophicus</i> em batata-doce cv. Beuaregard em meio MS com 30 g L ⁻¹ de sacarose.	79
Figura 14. Visualização do efeito da bactéria <i>G. diazotrophicus</i> e de nanopartículas de Zn, Cu e do compósito Zn/Cu em batata-doce cv. Beuaregard em meio MS com 20 g L ⁻¹ de sacarose. ...	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito da bactéria <i>G. diazotrophicus</i> na massa seca de batata-doce cv. Beuaregard em meio MS com 30 g L ⁻¹ de sacarose.	79
Tabela 2. Efeito da bactéria <i>G. diazotrophicus</i> e de nanopartículas de Zn, Cu e do composto Zn/Cu no comprimento de parte aérea e raiz, massa seca, clorofila total, carotenóides e teores de Zn e Cu em batata-doce cv. Beuaregard.....	82

Sumário

PRIMEIRA PARTE – REVISÃO DE LITERATURA	15
NANOFERTILIZERS IN MODERN AGRICULTURE: A TECHNOLOGICAL REVOLUTION IN PLANT NUTRITION AND RESOURCE EFFICIENCY	16
1. Introduction	19
2. Nanomaterial Integration for Fertilizer Formulations	22
2.1. <i>Concepts of Nanofertilizers</i>	22
2.2. <i>Properties of Nanomaterials and Nanofertilizers</i>	23
2.3. <i>Synthesis of Nanofertilizers</i>	25
2.3.1. <i>Green Synthesis</i>	26
2.3.2. <i>Nanoencapsulation</i>	27
3. Mechanisms of action, development, and growth promotion in plants	27
3.1. <i>Seed priming and treatment</i>	27
3.2. <i>Mechanism of soil/root absorption and transport</i>	28
3.3. <i>Mechanism of foliar absorption and transport</i>	29
3.4. <i>Growth Promotion</i>	30
3.5. <i>Gradual Nutrient Release</i>	31
4. Applications of nanofertilizers and effects on soil structure and health	32
4.1. <i>Benefits of nanoparticles on Soil Conditions</i>	32
4.2. <i>Nanoparticles in the Remediation of Contaminated Soils</i>	33
4.3. <i>Effects on Soil Microbial Communities</i>	34
4.4. <i>Regulatory and Safety Considerations</i>	36
5. Environmental Risks, Regulatory Frameworks, and Safety Considerations of Nanofertilizers	37
6. Challenges, Knowledge Gaps, and Research Priorities	38
7. Conclusions and Outlook	39
REFERENCES	42
SEGUNDA PARTE – ARTIGO	57
ARTIGO. SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS E NANOCAMPÓSITO Zn/Cu: EFEITOS DE SUA APLICAÇÃO COM MICRORGANISMOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO NO CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE BATATA-DOCE	58
1 INTRODUÇÃO	60
2 MATERIAL E MÉTODOS	63
2.1 Obtenção de genótipo de batata-doce e cultivo <i>in vitro</i>	63
2.2 Reativação, multiplicação, crescimento e padronização do inóculo bacteriano	64

2.3	Inoculação de isolado bacteriano e biossíntese de nanopartículas.....	64
2.4	Preparo do inóculo e aplicação dos tratamentos	65
2.5	Atividade bacteriana	66
2.6	Espectroscopia Eletrônica UV-Visível.....	67
2.7	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	67
2.8	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	68
2.9	Análises de pigmentos fotossintéticos	69
2.10	Análises Fitotécnicas	69
2.11	Delineamento Experimental e Análise Estatística	70
3	RESULTADOS.....	71
3.1	Atividade Bacteriana	71
3.2	Espectroscopia Eletrônica UV-visível.....	72
3.3	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	76
3.4	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	77
3.5	Análises Fitotécnicas	78
3.5.1	Comprimento de parte aérea (CPA).....	80
3.5.2	Comprimento de raiz (CR) e Massa seca (g)	81
3.5.3	Teor de nutrientes Zn e Cu (ppm)	81
3.6	Análises de pigmentos fotossintéticos	81
4	DISCUSSÃO.....	83
5	CONCLUSÃO	88
	REFERÊNCIAS	90

PRIMEIRA PARTE – REVISÃO DE LITERATURA

NANOFERTILIZERS IN MODERN AGRICULTURE: A TECHNOLOGICAL REVOLUTION IN PLANT NUTRITION AND RESOURCE EFFICIENCY

Moacir C. do Couto Junior¹; Leandro I. da Silva²; Mariana de S. Ribeiro¹; Caroline Dambroz¹; Tatiana C. e Bufalo³; Marcelo Pedrosa Gomes⁴ and Joyce Dória¹.

¹Department of Agriculture, Federal University of Lavras (UFLA), Lavras 37203-202, Brazil;
moacir.junior@estudante.ufla.br (M.C.C.J.); marianadsr20@gmail.com (M.S.R.);
carolinedambroz@gmail.com (C.D.)

²Department of Biology, Federal University of Lavras (UFLA), Lavras 37203-202, Brazil;
leandro.silva14@estudante.ufla.br (L.I.S.)

³Department of Physics, Federal University of Lavras (UFLA), Lavras 37203-202, Brazil;
tatiana.cardoso@ufla.br (T.C.e B.)

⁴Department of Botany, Federal University of Paraná, Curitiba, 81531-980, Brazil.

DOI : <https://doi.org/10.1021/acsomega.5c08087>

Abstract

Agriculture as we know it today has been made possible by the modernization of management practices and technological advances in agricultural inputs. However, the excessive, continuous, and inappropriate use of these inputs has led to nutrient loss, negatively affecting the ecosystem and human health. Population growth and climate change have driven the search for alternative technologies that increase crop productivity and reduce environmental impacts. Nanotechnology has emerged as a promising tool in agriculture, promoting better nutrient supply, controlled fertilizer release, and greater application and absorption efficiency. Nanofertilizers contribute to increasing crop yields, reducing nutrient losses, and promoting sustainability. This review aims to explore the current literature on nanofertilizers, their properties, synthesis methods, absorption and transport mechanisms, and the interaction between soil and microbiota. It provides an assessment of their agronomic benefits and potential environmental risks. In addition, we present a bibliometric analysis that identifies global trends in the scientific literature focused on nanofertilizers. This study highlights recent advancement and the existing perspective on nanofertilizers, while emphasizing the need for regulatory frameworks and long-term field evaluations to ensure their safe and effective implementation in agriculture.

Keywords: Nanomaterials, nutrient use efficiency, green synthesis, soil health, environmental risk

1. Introduction

With global population growth, the pursuit of efficient and sustainable agriculture has become a pressing reality worldwide. Furthermore, climate change has driven the search for technologies and management alternatives that enhance crop productivity while reducing environmental impact. The adverse conditions to which plants have increasingly been exposed, such as drought, heat, high light intensity, and salinity resulting from climate change, can interact and negatively affect plant performance, even if the impact of each condition individually is negligible¹. In addition, Ishfaq et al.² stated that under environmental stress conditions, such as heat and drought, the uptake and subsequent utilization of nutrients from the soil via the roots may be impaired. These unusual circumstances demand efficient, whether established or innovative, strategies for supplying nutrients to plants.

Modern agriculture, as it is known today, has only become possible through the advancement of management practices and technological evolution of agricultural inputs. Chemical pesticides, fertilizers, inoculants, high-yield genetically modified varieties, machinery, and implements have served as the foundation for the development of monoculture-based agricultural systems³. However, the excessive, continuous, and often improper use of these inputs has negatively impacted ecosystems and consumer health⁴. Conventional fertilizers are particularly inefficient; up to 50–70% of the applied nitrogen can be lost through volatilization, leaching, and runoff⁵, contributing to eutrophication and soil degradation. With growing reliance on synthetic chemical inputs, agricultural systems have become increasingly specialized and simplified, leading to a reduction in the complexity of natural ecological interactions³.

In the search for sustainable and economically viable agricultural management solutions, nanotechnology has emerged as a promising alternative⁶. This scientific and technological field, characterized by its multidisciplinary nature, involves the understanding, synthesis, control, manipulation, and application of materials at the nanoscale level. Nanomaterials are generally classified according to their morphology, dimensions, and chemical compositions. Based on their dimensions, a nanomaterial must have at least one of its three spatial dimensions (length, width, or height) within a nanometer scale ($10 \times \text{m}$)⁷. Depending on these dimensional attributes, a nanostructure is categorized as 0D, 1D, 2D, or 3D, based on the dimension(s) of the material that

are not within the nanoscale⁷. Accordingly, 0D nanomaterials possess all dimensions at the nanoscale and are referred to as NPs; 1D nanomaterials have one dimension—typically length—at the macroscale and include nanofibers, nanotubes, or nanowires; 2D nanomaterials have two dimensions—length and width—at the macroscale, forming structures known as nanosheets; and 3D nanomaterials are composed of assembled 0D, 1D, and/or 2D nanostructures, resulting in porous 3D architectures with dimensions at the macroscale⁷ (Figure 1).

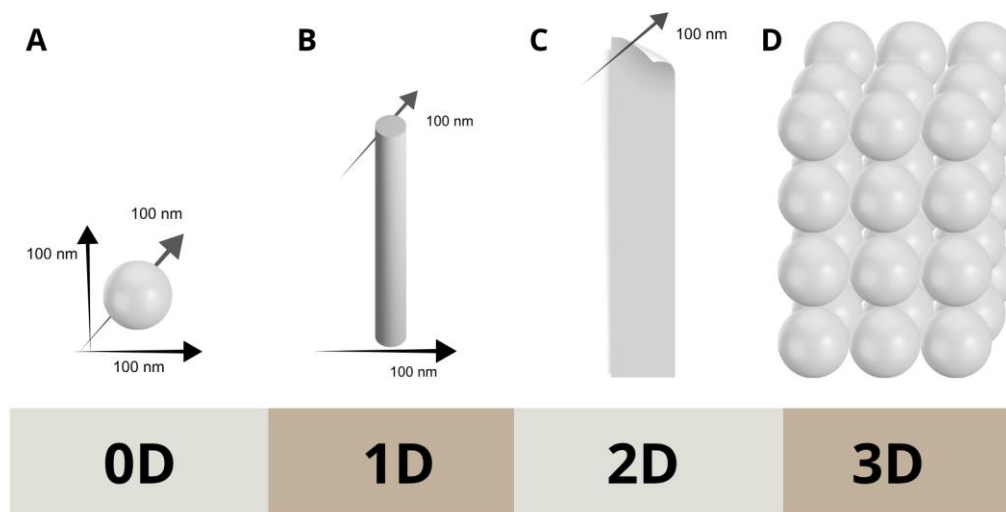


Figure 1. Classification of nanomaterials according to their dimensions - length, height, and width: (A) Zero-dimension - 0D, (B) One-dimension - 1D, (C) Two-dimension - 2D, and (D) Three-dimension - 3D.

The morphological diversity of nanostructures available for the configuration of chemical elements, molecules, and complex biochemical structures enables a wide range of applications in nanotechnology. In agriculture, nanotechnology has the potential to enhance conventional plant production systems through the controlled release of agrochemicals such as fertilizers, pesticides, and herbicides, ensuring precise and environmentally safe application and increasing resistance to abiotic stresses⁸. These improvements directly affect soil quality and lead to reduced water and energy consumption, resulting in more sustainable agricultural systems⁹⁻¹².

NPs can be used as nanofertilizers, either incorporated into, or applied as coatings on conventional fertilizers^{13,14}. Nanofibers and nanosheets may be employed to encapsulate conventional agrochemicals, enabling their slow release¹⁵⁻¹⁷, whereas porous nanomaterials facilitate the controlled delivery of agrochemicals, moisture retention, and UV protection^{18,19}. The use of nanofertilizers effectively contributes to improved production quality, increased nutrient

uptake efficiency, reduced costs, and minimized negative impacts on soil and water resources²⁰. For instance, nano-NPK formulations have demonstrated up to 25% higher nutrient use efficiency than conventional fertilizers in lettuce and maize trials^{21,22}. The selection of nanostructure types, application methods, and appropriate dosages for specific management practices are essential to achieve these outcomes.

A bibliometric analysis was conducted using the Web of Science Core Collection to better understand how these challenges have been addressed in the scientific literature ([Supporting Information](#)). The search was conducted in All Fields using the terms “nanofertilizer and nutrients” for the period from 2015 to 2025. A total of 181 peer-reviewed articles published over the mentioned period were analyzed using VOSviewer software. The co-occurrence network of author keywords revealed three major thematic clusters ([Figure 2](#)): (1) agronomic applications and nutrient management (green); (2) nanomaterials and application strategies (red); and (3) biological and environmental effects (blue). This thematic structure highlights the fragmented nature of the current research and underscores the need for integrated approaches that align scientific, policy, and industrial agendas.

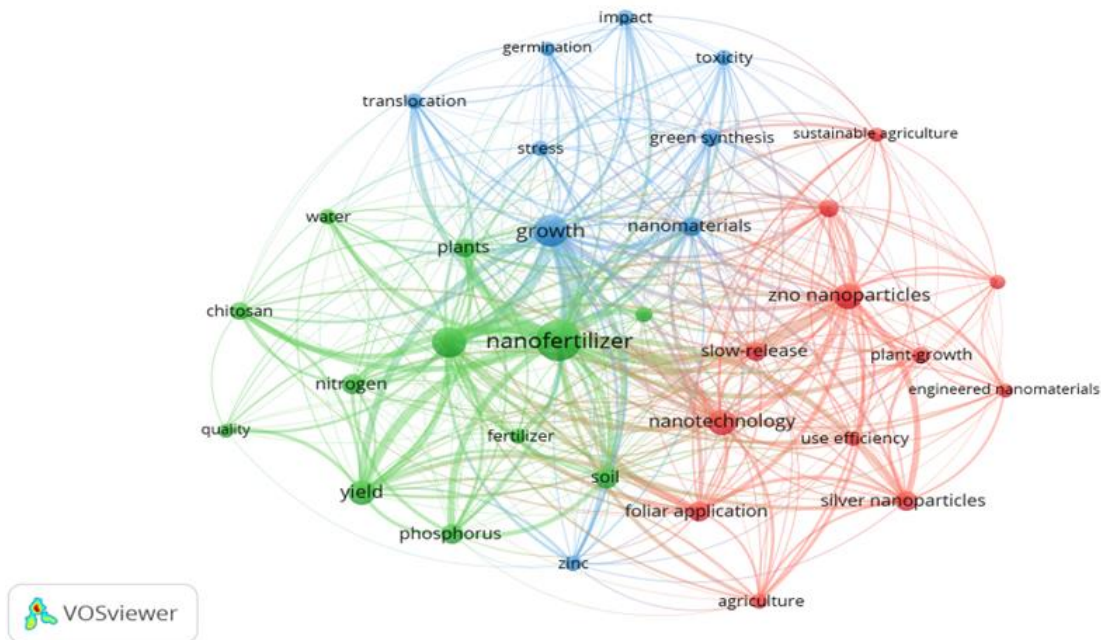


Figure 2. Co-occurrence network of author keywords from 421 articles on nanofertilizers in agriculture (2015–2025) based on data from the Web of Science Core Collection. The map was generated using VOSviewer with fractional counting and a minimum threshold of fi

management (green); (2) nanomaterials and application strategies (red); and (3) biological and environmental effects (blue). The node size represents the frequency of each keyword, and the line thickness indicates the strength of the co-occurrence links between terms.

This review aims to provide a comprehensive overview of the current state of research on nanofertilizer by examining the main characteristics that distinguish them from conventional fertilizers, their properties, synthesis methods, mechanisms of absorption and transport, interactions with microorganisms and soil structure, as well as their agronomic benefits and challenges. In addition, we critically analyze the potential environmental risks, long-term uncertainties, and regulatory issues associated with the widespread use of nanomaterials in agriculture. A bibliometric analysis is presented to identify major publication trends and highlight the most recent advancements in the application of nanofertilizer to plant nutrition. By integrating these perspectives, this work seeks not only to consolidate and synthesize the existing body of knowledge but also to highlight the current research gaps that limit the application of nanofertilizers into sustainable agricultural practices. In particular, the review identifies critical priorities such as understanding long-term soil–plant–microbe interactions, evaluating the environmental fate of nanomaterials under field conditions, and developing standardized regulatory frameworks. Finally, this synthesis provides a roadmap for future investigations and helps align ongoing research with the broader goals of agricultural sustainability and global food security.

2. Nanomaterial Integration for Fertilizer Formulations

2.1. Concepts of Nanofertilizers

Nanofertilizers are macro- and micronutrients that can be delivered to plants as particles or emulsions organized into structures or layers at the nanometric scale. These may include nutrients encapsulated or coated with nanomaterials, as well as nutrients attached to nanoporous materials. Such configurations can function as protectants and carriers, imparting distinct dispersion, absorption, and translocation properties^{23,24,20}. Nanofertilizers can be classified according to plant nutritional demands, such as macro- and micronutrient-based nanofertilizers, organic nanofertilizers, hybrid nanofertilizers, carbon-based nanofertilizers, and nanobiofertilizers^{24,25}. Additionally, they may be categorized by the heterogeneity of their composition (monomeric or

polymeric) and by their structural type (nanocapsules, nanocomposites, and nanodendrimers)²⁶. This diversity allows nanofertilizers to be tailored to crop-specific nutritional needs and environmental conditions^{24,25}.

One of the main advantages of nanofertilizers is their ability to minimize nutrient loss due to leaching, volatilization, or immobilization, which are the common drawbacks of conventional fertilizers. For instance, it is estimated that traditional formulations may lose up to 70–80% of the applied nutrients, depending on soil and climate conditions²⁷. By contrast, nanofertilizers provide a more targeted, stable, and efficient nutrient supply. Patil et al.²⁸ reported yield increases above 20% in maize and wheat following foliar application of ZnO nanoparticles (NPs), along with reduced nutrient runoff under field conditions.

2.2 Properties of Nanomaterials and Nanofertilizers

Defined by having at least one dimension equal to or smaller than 100 nm, NPs exhibit distinct and enhanced physicochemical properties compared to their bulk counterparts, enabling more efficient applications^{29,30}. Properties such as antioxidant and catalytic activity, biocompatibility, permeability, structural attributes, and, most importantly, their nanoscale size make NPs suitable for applications across various fields, including biomedicine, biosensors, pharmaceuticals, and agriculture^{30,31}. Nanomaterials have a significantly higher surface-area-to-volume (SA/V) ratio compared to their bulk forms, allowing a greater number of surface atoms to be exposed and available for interaction, thereby greatly enhancing their reactivity with plant systems³². Figure 3 illustrates the effect of particle size on the SA/V ratio. As particle size decreases, the SA/V ratio increases exponentially, leading to more reactive surfaces for nutrient interactions and greater efficiency in uptake by plant roots and leaves.

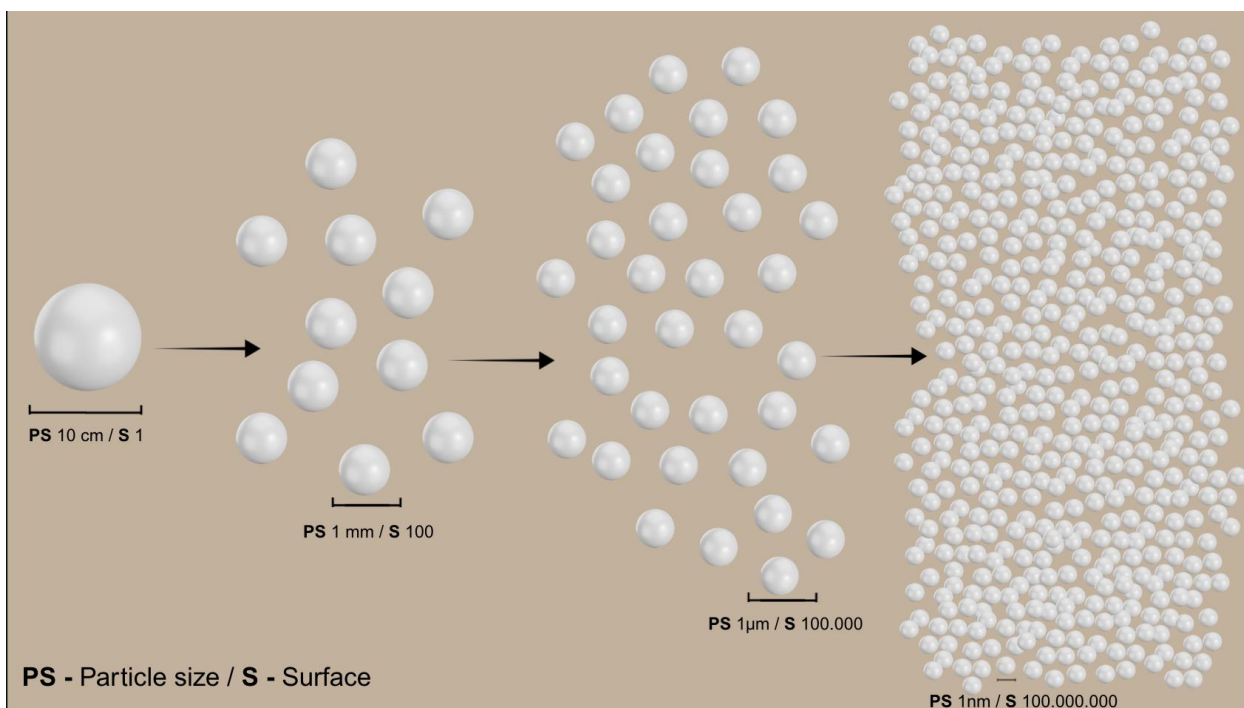


Figure 3. Comparison of the area-to-volume (SA/V) ratio of spherical particles of different diameters. As the particle size decreased to the nanoscale, the SA/V ratio increased exponentially, enhancing the chemical reactivity and interaction with plant tissues. T

The characteristics related to size, composition, and sensitivity confer nanofertilizers with various modes of interaction with plants. These interactions enhance plant growth, promote increases in fresh biomass, improve chlorophyll content, support metabolic activity, upregulate antioxidant potential, and enhance the expression of stress-related genes³³. In a study applying nanoencapsulated spermidine (an organic polyamine) to cabbage, Haghighi, Alviri, and Kappel³⁴ observed a significant increase in the fresh weight of shoots and roots, a result attributed by the authors to the role of polyamines in promoting cell division and expansion. For instance, hybrid nanofertilizers composed of Zn and carbon dots have been shown to improve lettuce (*Lactuca sativa*) growth by enhancing light capture and photosystem II repair³⁵. Nanoscale also prevents the aggregation of otherwise unstable forms of nutrients. The basic units, molecules, or ionic crystalline structures of conventional fertilizers such as urea, KCl, or P₂O₅, despite having molecular dimensions under 2 nm, can form aggregates during storage or in the soil, reducing their efficiency. Encapsulation in nanostructures (e.g., polyurethane matrices) preserves the nanometric scale and increases nutrient-use efficiency^{36,37}. Figure 4 compares the molecular and nanoencapsulated forms of common fertilizers, illustrating how polymer coatings improve stability and allow controlled nutrient release. These properties explain why nanofertilizers often show 20–

30% higher nutrient use efficiency than their conventional counterparts³⁸. Encapsulated fertilizers have been shown to release nutrients over 10–14 days, reducing environmental losses by up to 60% compared with conventional fertilizers^{20, 39}.

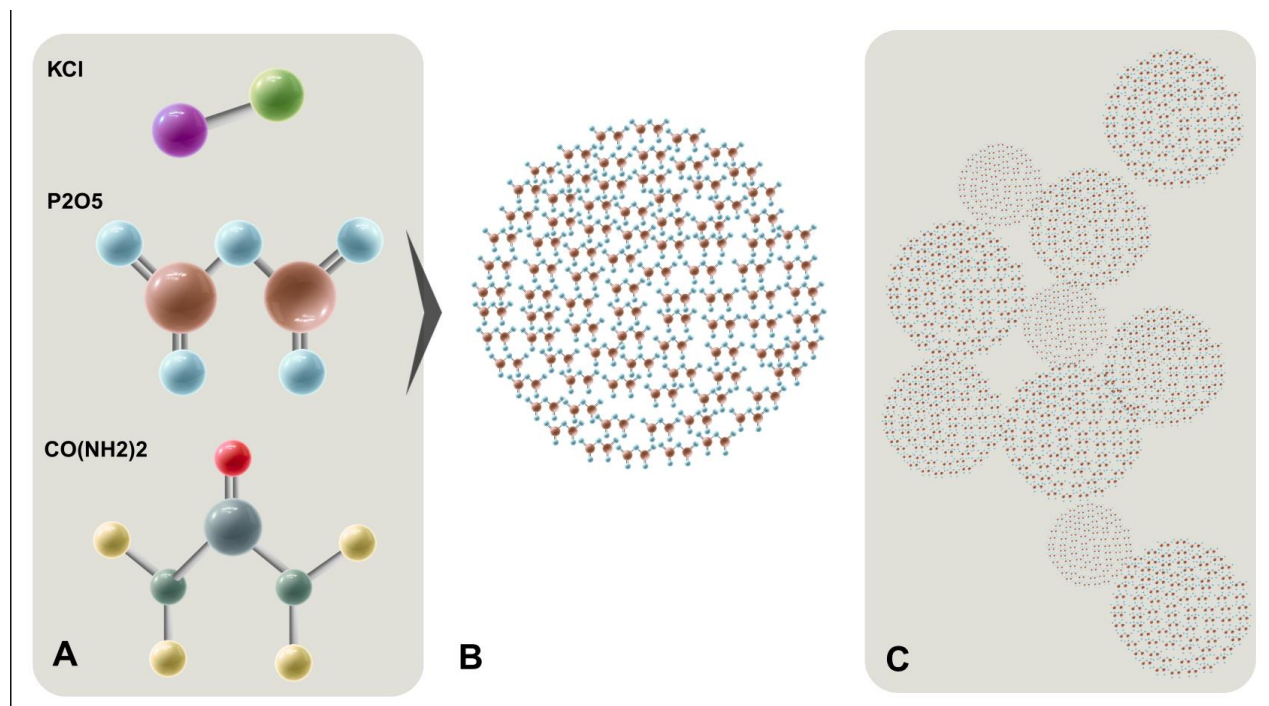


Figure 4. Comparison between conventional fertilizers and nanoencapsulated nutrient structures. (A) Molecular units of potassium chloride (KCl), phosphorus pentoxide (P₂O₅), and urea (CO(NH₂)₂) with dimensions smaller than 2 nm. (B) Aggregated P₂O₅ forming unsta

2.3. Synthesis of Nanofertilizers

Nanofertilizers can be synthesized using top-down or bottom-up approaches. Top-down methods involve breaking down bulk materials into nanoparticles using physical or mechanical processes, often resulting in irregular particle sizes and high energy consumption⁴⁰. Bulk materials are broken down through different techniques such as sonication^{41,42,43}, ball milling^{43,44}, pulse discharge^{44,45} and laser ablation⁴⁶. Bottom-up techniques, however, use chemical or biological processes to build nanoparticles from atomic or molecular precursors. Common methods include sol-gel synthesis^{47,48}, hydrothermal reactions⁴⁸, co-precipitation⁴⁹, and electrochemical deposition⁵⁰. While these methods provide better control over particle characteristics, they may involve toxic solvents or energy-intensive steps⁵¹. Green synthesis methods have gained traction to address these issues.

2.3.1. Green Synthesis

Green synthesis involves the use of biological organisms (e.g., plants, fungi, algae, and bacteria) as natural reducing and stabilizing agents to produce nanoparticles. These methods align with green chemistry principles by avoiding hazardous reagents and minimizing environmental impacts^{52,53}. Bioactive compounds, such as flavonoids, phenolics, alkaloids, and proteins, contribute to the reduction and stabilization of metal ions. For instance, extracts of *Azadirachta indica* have been used to synthesize Zn NPs that enhance millet growth and antioxidant responses⁵⁴. Among biological platforms, microalgae are particularly promising because of their high metabolic productivity and ease of cultivation. Figure 5 summarizes the green synthesis routes and typical stages of microalgae-mediated nanoparticle biosynthesis. Biosynthesis includes reduction, nucleation, and stabilization phases, which are typically driven by cellular metabolites and enzymes^{55,56}. Synthesis can occur extracellularly (on the cell wall surface) or intracellularly (within the cytoplasm) depending on the organism and conditions^{57,58}. Parameters such as pH, temperature, precursor concentration, and extract composition significantly affect the efficiency and properties of synthesized nanomaterials^{59, 60}. However, challenges remain in achieving reproducibility and scalability in agricultural applications.

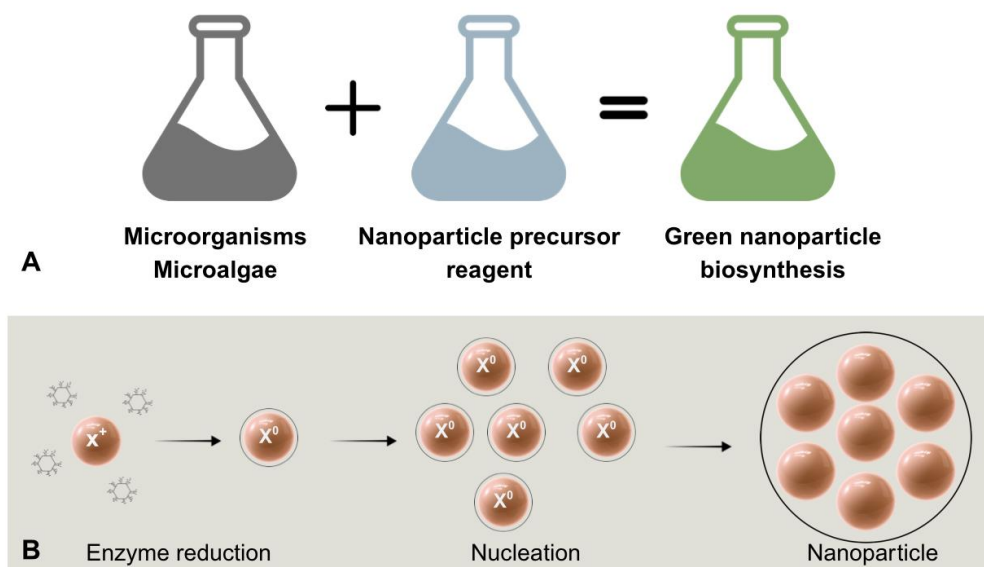


Figure 5. Overview of green synthesis routes for nanoparticle production. (A) Examples of bioactive compounds used in green synthesis, including phenolic compounds, alkaloids,

flavonoids, and enzymes, extracted from plants, fungi, and bacteria. (B) Stages of microalgae-mediated biosynthesis illustrating algal growth, metabolite extraction, nanoparticle formation, and purification. These eco-friendly methods reduce energy consumption and avoid toxic by-products, thus offering a sustainable alternative to conventional nanoparticle synthesis.

2.3.2. Nanoencapsulation

Nanoencapsulation is a strategic technique in the development of nanofertilizers, enabling the controlled and site-specific release of nutrients. By encapsulating active ingredients, such as nitrogen, phosphorus, or potassium, within nanostructured carriers, such as polymeric shells, liposomes, or mineral matrices, this approach enhances nutrient use efficiency (NUE) while reducing environmental losses²⁰. These nanoscale systems protect nutrients from degradation processes, such as volatilization, leaching, and microbial transformation, and allow for their gradual release in response to environmental stimuli, including soil moisture, temperature fluctuations, and root exudates⁶¹. Field trials demonstrated the potential of this technology. For example, phosphorus pentoxide (P_2O_5) nanoencapsulated in polyurethane matrices resulted in a 70% reduction in phosphorus leaching compared with conventional superphosphate in rain-fed maize systems³⁹. Similarly, chitosan-based nanofertilizer composed of copper (Cu) and salicylic acid in maize seed treatment, exhibited significantly antifungal activity and increased grain yield by 1.8-fold compared to the control⁶². These results reinforce the advantages of nanoencapsulation for enhancing the stability and efficiency of nutrient formulations. Figure 3 illustrates the structural contrasts between conventional fertilizers and nanoencapsulated formulations, emphasizing the improved surface reactivity and functional stability of nanomaterials. Such structural advantages, combined with the ability to fine-tune release kinetics and carrier composition, make nanoencapsulation a central innovation in the advancement of next-generation fertilizers.

3. Mechanisms of action, development, and growth promotion in plants

3.1. Seed priming and treatment

The use of seeds with high physiological and sanitary qualities is essential to establish productive crops capable of expressing their full genetic potential. Parameters such as vigor, uniformity of emergence, and germination are closely associated with seed health and initial

nutritional status. Seed treatment offers dual benefits: it protects against biotic and abiotic stressors, while simultaneously providing essential nutrients that support early plant development^{63, 64}. In the seed priming technique, seeds undergo controlled hydration and are immersed in nanofertilizer solutions. This process activates metabolic pathways linked to germination as nanofertilizers penetrate the seed coat through aquaporins and initiate internal dispersion⁶⁵. The resulting stimulation of growth-promoting hormones, mitigation of reactive oxygen species (ROS)⁶⁶, and activation of antioxidant responses contribute to robust seedling establishment, even under adverse environmental conditions. Furthermore, priming minimizes nutrient leaching and enhances uptake efficiency, particularly in nutrient-deficient soils⁶⁷.

Nanofertilizer-based seed treatments also contribute to early defence activation and nutrient mobilization⁶⁸. For example, a chitosan-based nanofertilizer containing copper and nanoencapsulated salicylic acid increases the activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and polyphenol oxidase (PPO), enzymes involved in systemic resistance, while protecting maize plants from post-flowering stalk rot⁶². The same study reported a 1.6-fold increase in the vigor index ten days after germination, driven by elevated α -amylase and protease activities. Similar outcomes were observed when zinc-based nanoparticles synthesized using *Calotropis procera* extract were applied to pearl millet (*Pennisetum glaucum*). Nanoprimed seeds exhibit improved germination rates, vigor index, biomass accumulation, and photosynthetic efficiency⁵⁴. Similarly, titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles, when combined with humic acid and applied to lettuce seeds, enhanced antioxidant content and biomass, potentially by stimulating redox reactions that facilitate respiration during germination⁶³. Microorganism-mediated nanoparticle synthesis has also shown promise. Batool et al.⁶⁴ demonstrated that *Enterococcus* sp. SR9-mediated silver nanoparticles (SR9AgNPs) enhanced germination, biomass, and physiological parameters in wheat, cucumber, and tomato plants. Importantly, SR9AgNPs at 100 ppm were confirmed to be nontoxic, highlighting their potential for safe agricultural applications. These studies underscore the synergistic potential of nanomaterials and plant-microbe interactions in promoting early growth and defense responses.

3.2 Mechanism of soil/root absorption and transport

Soil application remains the most common method of fertilizer delivery, including nanofertilizers. Once in the soil matrix, nanofertilizers dissolve in water and are absorbed at the root tip or through root hair, often via aquaporin-mediated transport or endocytosis⁶⁹. After reaching the xylem, nanoparticles are translocated throughout the plant, rapidly improving their nutritional status⁶⁷.

The root surface, which bears a net negative charge owing to mucilage secretion and the activity of root hairs, attracts positively charged nanoparticles, thereby facilitating uptake. This process is especially efficient in young tissues where the epidermis and root hairs are not fully developed. Once in contact with the root surface, nanoparticles can enter via multiple mechanisms, including ionic exchange, protein-ligand interactions, endocytosis, or passive diffusion^{70,71}. Encapsulated nutrients benefit from a higher absorption efficiency and enhance enzymatic activity, including catalase and peroxidase stimulation⁷². The efficiency of root uptake is influenced by the particle size. For example, Chen et al.⁷³ demonstrated the uptake of 40 nm ZnO nanoparticles in rice seedlings, showing their presence in the root cortex and elongation zones. Similar findings in maize have confirmed translocation from roots to shoots⁷⁴.

Nanoparticles may follow two principal transport pathways after entering the root system. In the apoplastic route, they move between the cell walls and the plasma membrane, potentially reaching the endodermis unless blocked by the Casparian strip. Alternatively, in the symplastic pathway, transport occurs through the plasmodesmata, allowing passage from cell to cell and facilitating a broader systemic distribution (Figure 6B).

3.3. Mechanism of foliar absorption and transport

Foliar fertilization offers a complementary strategy to soil fertilization and is particularly valuable under stress conditions or during periods of high nutrient demand. It allows for rapid correction of micronutrient deficiencies while avoiding soil-based nutrient imbalances^{75,2}. Nanoparticles applied via foliar spraying function as micronutrient sources, biostimulants, or protective agents. Their reduced size enables absorption through stomata, cuticular fissures, aqueous pores, trichomes, and ectodesmata. Once absorbed, nanoparticles are transported via diffusion and mass flow through the apoplast and symplast (Figure 6A), eventually reaching target tissues, such as roots, flowers, and fruits^{76,71}.

The efficiency of foliar uptake is highly dependent on the nanoparticle size and charge. While stomatal openings can accommodate particles up to 50 nm, the foliar cuticle is far more selective, admitting particles only in the 0.6–4.8 nm range⁷⁷. Studies using *Lactuca sativa* and *Solanum lycopersicum* have confirmed the presence of Ag and Zn nanoparticles in the mesophyll tissues and vascular bundles following foliar application^{78,79}. Environmental variables such as light, temperature, and humidity also affect foliar uptake. High temperatures may cause epidermal contraction, whereas low humidity can induce stomatal closure, thereby limiting absorption. In contrast, high relative humidity enhances uptake by reducing osmotic potential, and high light intensity may increase stomatal opening, further facilitating absorption^{80,81}. Precipitation immediately after application can reduce foliar absorption by washing off nanoparticles from the leaf surface⁸².

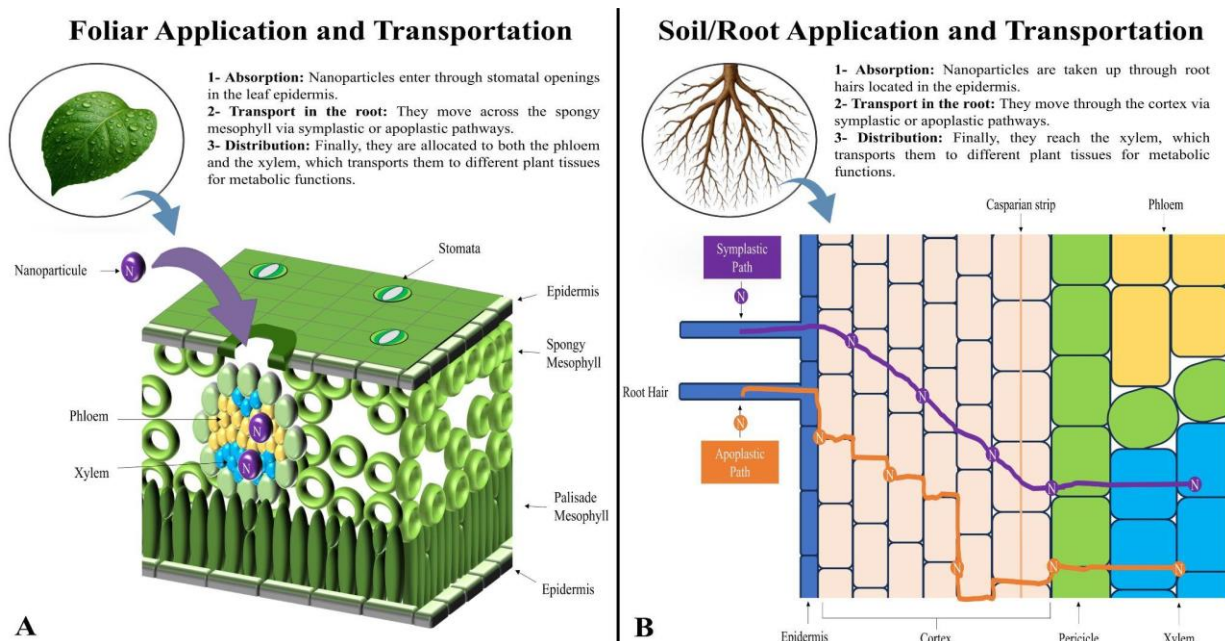


Figure 6. Pathways of nanoparticle (NP) uptake and transport pathways in plants. (A) Foliar application: NPs penetrated leaf tissues through the stomata, trichomes, cuticular cracks, and aqueous pores. After entering the mesophyll, NPs are translocated via sympla

3.4. Growth Promotion

The goal of nanofertiliser application is to enhance crop growth, yield, and nutritional quality. Macronutrients and micronutrients delivered in nanoscale formulations demonstrate greater bioavailability and responsiveness, which can lead to improved photosynthesis, enzymatic activity,

stress tolerance, and biomass accumulation. Studies have demonstrated significant gains in plant growth with nanoformulations. For example, foliar application of nano-NPK at 3 mg L⁻¹ increased vegetative growth in *Philodendron selloum*⁸³, while 200 mg L⁻¹ of calcium nanoparticles improved the phytochemical content and yield in lettuce across two growing seasons⁸⁴. Magnesium nanofertilizers have also been proven to be more effective than conventional magnesium sulfate in enhancing the antioxidant capacity and nutrient density in common beans⁸⁵.

Foliar applications of boron nanoparticles at 25–100 ppm increased nitrate reductase activity and stomatal conductance in beans while also improving biomass⁸⁶. These effects are summarized at the supporting information 1 (table 1), which summarizes nanofertilizer types, dosages, application methods, target crops, and observed benefits. By enabling precise nutrient delivery, enhancing plant metabolism, and reducing environmental loss, nanofertilizers represent a transformative tool for sustainable agriculture. Their adoption can substantially improve productivity while mitigating the ecological impacts of conventional fertilization.

3.5. Gradual Nutrient Release

One of the key advantages of nanofertilizers is their ability to provide controlled and gradual release of nutrients, improve nutrient use efficiency (NUE), and reduce environmental losses caused by leaching, volatilization, or fixation^{87,72}. This mechanism is typically achieved through nanoencapsulation, surface adsorption, or the integration of smart release materials that respond to environmental stimuli such as pH, humidity, or root exudates. Biodegradable polymers such as chitosan, alginate, and polyurethane are widely used as encapsulating matrices, forming nanostructures that protect active ingredients and progressively degrade in the soil^{87,88}. This allows for sustained nutrient availability that better matches the temporal nutrient demands of the plants⁶². For example, polyurethane-encapsulated P₂O₅ reduced phosphorus leaching by 70% in maize fields compared to conventional superphosphate under rain-fed conditions³⁹.

Some nanocarriers have been designed to release nutrients in response to specific soil conditions. Changes in soil temperature, enzymes, pH may induce structural changes or degradation of the nanostructure⁶¹. Nutrient release can occur via multiple mechanisms, although it is commonly understood that it takes place primarily through diffusion across semi-permeable membranes, where nutrients are gradually released in response to concentration or pressure

gradients. The release rate of nanofertilizer contents is influenced by the nature of the polymer used, the concentration and viscosity of the solution, the number of coating layers, modifying agents, and the technique employed in constructing the nanostructure⁸⁹.

This gradual release behavior contrasts sharply with that of traditional fertilizers, which typically discharge nutrients rapidly, often exceeding the uptake capacity of plants, leading to significant environmental contamination³⁸. Nanofertilizers represent a pivotal tool for precision agriculture, enabling crop-specific and environmentally conscious nutrient delivery⁸⁵. However, to fully realize these benefits, the formulation and environmental behavior of nanofertilizers must be optimized. The development of nanostructure requires attention to the material and method used, in addition to knowing the characteristics involved in the relationship between the material and the compound of interest⁹⁰. Therefore, future research should focus on tailoring release profiles to different crops, soil types, and climatic conditions to maximize agronomic gains while ensuring environmental safety⁹¹.

4. Applications of nanofertilizers and effects on soil structure and health

4.1. Benefits of nanoparticles on Soil Conditions

NPs offer significant benefits to the physical properties of soil, such as improved structure, porosity, and water retention, while also positively influencing fertility through the controlled release of nutrients and stimulation of microbial activity^{92,93,94}. Zinc oxide (ZnO) NPs enhance nutrient availability and soil fertility, thereby contributing to a more favorable environment for plant growth^{95,96}. Phung et al.⁹⁷ demonstrated that the addition of ZnO NPs to composted sewage sludge had positive effects on soil fertility, promoting a significant increase in nitrogen (1.6 to 2.3 times) and potassium levels, essential elements for plant development. Furthermore, the presence of ZnO NPs increased the fractions of tyrosine-like substances and the biological index in the dissolved organic matter of the soil, indicating enhanced microbial activity and intensified nutrient cycling. These factors directly contribute to improved quality and functionality of agricultural soils. Magnesium oxide (MgO) NPs, in turn, improve soil fertility by enhancing nutrient uptake, regulating soil pH, and contributing to plant tolerance against heavy metals and toxic metalloids^{96,98}.

Nanoclays improve soil structure and aeration, increase nutrient availability, and stabilize contaminants, preventing their leaching into groundwater^{96,99}. Padidar et al.¹⁰⁰ demonstrated that the application of nanoclays to sandy soils effectively controlled wind erosion. In wind tunnel experiments, the addition of 2000 ppm of nanoclay increased the volumetric water content of the soil by 18.9% and reduced erosion losses by more than 99%, even under wind speeds of up to 67.3 km/h. There was also a 2.5% increase in the fraction of particles between 0.25–2 mm and a significant reduction (74%) in the fraction of particles smaller than 0.25 mm, indicating improved aggregation and structural stabilization of the soil.

Nanosilica (NPSiO₂) has positive effects on soil structure, promoting greater water retention, enhanced nutrient delivery efficiency, and pest control. It also contributes to pollutant immobilization, supporting long-term soil quality^{96,101}. According to Al-Saeedi¹⁰², the application of NPSiO₂ to soil resulted in significant improvements, with up to a tenfold increase in the clay percentage using the highest dose (400 mg/kg). Porosity also increased significantly, reflecting the filling of macropores by NPs. Moreover, the saturation percentage increased by 36% compared to the control, indicating enhanced microporosity and water retention.

Carbon nanotubes (CNTs) offer benefits for soil strength and stability, supporting the controlled release of nutrients and herbicides^{96,103}. According to Alsharef et al.¹⁰⁴, incorporating small amounts (0.05–0.2%) of nanocarbons such as multi-walled CNTs and carbon nanofibers (CNFs) into residual soils significantly improved physical properties. These enhancements included increased pH (from 3.93 to 4.16), reduced hydraulic conductivity (from 2.16E–9 to 7.44E–10 m/s), increased maximum dry density, reduced optimum moisture content, and plasticity index, resulting in more stable soils less susceptible to deformation and water percolation. Thus, it is evident how different classes of nanoparticles can contribute individually or synergistically to the improvement of the physical conditions of different soils.

4.2. Nanoparticles in the Remediation of Contaminated Soils

The loss of soil health and functionality is a critical environmental issue that directly impacts agricultural productivity and ecosystem services^{105,106}. Various approaches have been employed to restore contaminated or degraded soils, among which the use of nanotechnology has gained

increasing attention. NPs exhibit unique physicochemical properties, such as high surface area, enhanced reactivity, and the ability to interact with both organic and inorganic soil components⁹³. Iron oxide (Fe_3O_4 , Fe_2O_3) NPs are widely used in the removal of heavy metals such as lead (Pb) and arsenic (As) through adsorption and reduction processes, directly contributing to improved soil quality^{96,107,108}. Singh et al.¹⁰⁹ demonstrated that Fe_3O_4 NPs exhibit high adsorption capacities for metals such as cadmium (Cd), chromium (Cr), iron (Fe), nickel (Ni), copper (Cu), lead (Pb), and zinc (Zn). In contaminated soils and water, removal efficiency ranged from 69.6% to 99.6% at pH 0.7 and from 63.5% to 98.3% at pH 4.5, with Pb being the most efficiently removed metal. According to Daryabeigi et al.¹¹⁰, the combination of titanium dioxide (TiO_2) NPs with biochar promoted greater growth of *Sorghum bicolor* and significantly enhanced the removal of antimony (Sb) from contaminated soils. The treatment with 250 mg/kg of TiO_2 NPs + 2.5% biochar resulted in the highest accumulation capacity (1624.1 $\mu\text{g}/\text{pot}$). Similarly, Bakshi and Kumar¹¹¹ reported that the application of TiO_2 NPs in association with the hyperaccumulator plant *Brassica juncea* was effective in removing Cd from soil. The NPs increased the plant's tolerance to the metal, improving growth, biomass, and photosynthesis, with the highest removal efficiency (55.11%) observed at a NP concentration of 500 mg/kg. These findings highlight the potential of nano-phytoremediation as a promising strategy for treating contaminated soils.

4.3. Effects on Soil Microbial Communities

The application of NPs to agricultural soils also has significant impacts on the rhizosphere microbiota and their functions, positively influencing plant growth and development⁸⁸. NPs act as mediators in plant-microbe interactions by modifying the rhizosphere environment in ways that favor the colonization and activity of beneficial microorganisms^{112,113}. These interactions can induce cooperation among microorganisms and the formation of homogeneous or heterogeneous biofilms, which enhance the protection and efficacy of bioinoculants under field conditions¹¹⁴. Furthermore, co-incubation of low concentrations of various types of nanomaterials can activate plant growth-promoting bacteria even under *in vitro* conditions, improving their functional traits and contributing to more effective soil performance^{114,115}.

On the other hand, according to Civilini et al.¹¹⁶, the application of cerium oxide (CeO_2) NPs negatively influenced the bacterial composition of the rhizosphere of *Silene flos-cuculi*, particularly

by reducing the abundance of anaerobic genera within the phylum *Firmicutes*. This shift affected key metabolic functions essential for soil fertility, such as biological nitrogen fixation, fermentation, and iron and nitrate respiration. In contrast, functions related to aerobic chemoheterotrophy were stimulated, indicating a potential redirection of microbial activity. These results suggest that CeO₂ NPs accumulation may impair essential soil biogeochemical cycles, thereby affecting nutrient availability and plant health.

According to Saleem et al.¹¹⁷, the combined application of ZnO NPs and a biofertilizer containing zinc-solubilizing bacteria significantly improved wheat growth and zinc content in grains, without causing substantial changes in the structure of the soil microbial community. In terms of microbial diversity, there was a marked increase in total aerobic bacteria (99%), fungi (34%), nitrogen-fixing bacteria (31%), phosphate-solubilizing bacteria (166%), and especially zinc-solubilizing bacteria (1400%). The population of actinobacteria, however, remained unchanged. Illumina sequencing analysis revealed a relative increase in the abundance of *Bacillus*, *Massilia*, and *Rhizobium*, indicating a tendency to favor microorganisms with plant growth-promoting potential. Nevertheless, alpha diversity indices and ordination analyses suggest that despite these changes in relative abundances, the overall structure of the soil microbial community was not significantly altered.

Sun et al.¹¹⁸ revealed that selenium (Se) NPs, biosynthesized by selenium-associated bacteria from maize roots, may modulate soil microbiota like root exudates, promoting the recruitment of plant-beneficial microorganisms. In vitro and soil-based assays showed that Se NPs improved plant performance by stimulating, in a dose-dependent manner, the colonization by plant growth-promoting bacteria such as *Bacillus*. Multi-omics analysis revealed an inter-kingdom signaling cascade: maize roots detect histamine signals produced by *Bacillus* spp., which induce the exudation of p-coumarate by the plant. In response, the *rpoS* gene in selenium bacteria such as *Pseudomonas* sp. ZY71 is activated, promoting Se NP biosynthesis.

Nanofertilizers not only improve physical soil conditions, such as porosity and water retention, but also offer promising solutions for the remediation of contaminated soils by leveraging the unique properties of different NPs. These advances may lead to more sustainable and efficient agricultural practices. Additionally, the beneficial interactions between NPs and soil microbiota highlight their potential to promote plant health and growth without significantly disrupting existing microbial communities.

4.4. Regulatory and Safety Considerations

Despite the considerable benefits associated with the use of nanofertilizers in sustainable agriculture, their environmental fate, bioaccumulation potential, and long-term ecotoxicological effects remain poorly understood, particularly under field conditions. The increasing application of nanoparticles (NPs) in agroecosystems raises several safety concerns related to their persistence in the environment, toxicity to non-target organisms, and occupational exposure risks, all of which are currently under-regulated in most countries.

One of the major challenges lies in the environmental persistence of metal-based NPs, such as ZnO, TiO₂, and AgNPs. These particles can remain in the soil matrix for extended periods, potentially altering microbial communities and physicochemical processes or leaching into groundwater, thereby increasing the risk of contamination and biomagnification in the food chain¹¹⁹. Studies have shown that certain NPs, particularly at high doses, can adversely affect beneficial soil organisms, such as earthworms, mycorrhizal fungi, and nitrogen-fixing bacteria, disrupting essential ecosystem services, such as nutrient cycling and organic matter decomposition^{120,121,122}. Occupational health risks are also a growing concern, especially in scenarios involving handling of dry or inadequately encapsulated formulations¹²³. Farmworkers may be exposed to these materials through inhalation or dermal contact, posing risks that are often overlooked owing to the absence of specific regulations or adequate personal protective equipment¹²⁴. From a regulatory perspective, most national and international frameworks have remained fragmented or outdated. In the European Union, nanomaterials are classified under the REACH regulation, guided by the precautionary principle; however, no dedicated protocols exist for nanofertilizers. The United States Environmental Protection Agency (EPA) has initiated voluntary reporting mechanisms, but comprehensive mandatory guidelines are lacking. In Brazil and other middle-income countries, agencies such as ANVISA and IBAMA have yet to implement consistent procedures for the classification, labeling, and risk assessment of nano-enabled agricultural inputs. The lack of harmonized international definitions and safety thresholds hampers product registration, environmental monitoring, and consumer awareness.

These gaps underscore the urgent need for standardized protocols for the risk assessment of nanofertilizers, considering their unique behavior in complex environmental matrices. Long-term

field trials are essential for assessing ecological safety across different soil types, climates, and cropping systems. Life cycle assessment (LCA) tools should be applied to evaluate the sustainability and environmental trade-offs of these technologies, whereas certification and traceability schemes are necessary to enhance transparency and ensure regulatory compliance. Incorporating these regulatory and safety considerations into research, innovation, and policy design is critical for ensuring that nanofertilizers contribute to agricultural productivity without compromising environmental integrity, human health, or long-term sustainability.

5. Environmental Risks, Regulatory Frameworks, and Safety Considerations of Nanofertilizers

Nanofertilizers offer promising advantages for sustainable agriculture; however, their deployment raises significant concerns regarding environmental safety and regulatory oversight. Owing to their nanoscale dimensions and enhanced reactivity, these materials can interact with biological systems in unexpected ways, potentially leading to toxicological effects on non-target organisms and ecological processes.

Numerous studies have shown that certain nanoparticles, particularly ZnO, TiO₂, and AgNPs, may induce oxidative stress, membrane damage, and genotoxicity in aquatic species such as *Daphnia magna*, algae, plants, and fish embryos¹²⁵⁻¹²⁸. In terrestrial ecosystems, nanoparticles can persist in the soil, interact with microbial communities, and disrupt key functions, such as nitrogen cycling and organic matter decomposition. For example, Civilini et al.¹¹⁶ observed that CeO₂ nanoparticles altered the rhizospheric microbiota of *Silene flos-cuculi*, impairing critical metabolic pathways related to soil fertility. Similarly, Sun et al.¹¹⁸ demonstrated that selenium nanoparticles modulate microbial recruitment and biochemical signaling in maize rhizospheres, with complex implications for soil health. Despite these findings, the long-term environmental fate of nanofertilizers remains largely unknown. Data on their persistence, transformation, mobility, and bioaccumulation in soil–plant systems are scarce, and results often vary depending on environmental conditions and nanoparticle coatings. These knowledge gaps are compounded by the lack of standardized ecotoxicological testing protocols and inconsistent regulatory classification. From a governance perspective, regulatory frameworks addressing nanofertilisers are still incipient and vary widely across jurisdictions. The European Union applies the

precautionary principle and regulates nanomaterials under REACH, yet it lacks specific guidelines tailored to nanofertilisers. In the United States, the Environmental Protection Agency (EPA) has proposed voluntary frameworks for nanomaterial registration, but binding requirements remain limited. Most low-income and middle-income countries do not have the institutional capacity to assess or regulate nanotechnology-based inputs in agriculture¹²⁹. As a result, many nanofertilizer products have been commercialized without clear labeling or traceability mechanisms, hindering risk management and consumer transparency.

Addressing the environmental risks and regulatory gaps associated with nanofertilizers requires coordinated actions on several fronts. First, harmonized risk assessment protocols that reflect the specific behavior of nanoparticles in agroecosystems must be developed. Second, regulatory definitions and classification criteria should be updated to explicitly encompass nanoproducts. Third, greater transparency regarding product composition and environmental labeling is essential for informing users and supporting monitoring efforts. Finally, investment in interdisciplinary research and international collaboration is critical to ensuring that nanofertilizer technologies are both effective and environmentally responsible.

6. Challenges, Knowledge Gaps, and Research Priorities

Despite the growing interest in nanofertilizers as promising tools for sustainable agriculture, several critical challenges remain unaddressed. A major limitation is that most studies have been conducted under controlled laboratory or greenhouse conditions, which may not accurately represent the complex interactions that occur in field environments. Variables such as soil type, climate, irrigation regime, and crop species significantly influence nanoparticle behavior, affecting their efficacy, persistence, and potential risks in real agricultural settings^{130,131}. Another major gap lies in the limited understanding of the environmental fate, transformation, and bioaccumulation of nanoparticles. Although certain metal-based NPs may persist in soils or leach into water bodies, long-term field data on their degradation pathways and interactions with organic matter and soil colloids remain scarce. Particularly concerning is the possibility of nanoparticle uptake and translocation to edible plant tissues, which could lead to human exposure through the food chain. However, systematic evaluations of accumulation patterns and their potential health effects are rare.

Analytical limitations also hinder the progress in this field. The detection, quantification, and speciation of nanoparticles in complex environmental matrices require sophisticated tools, such as single-particle ICP-MS, NanoSIMS, or synchrotron-based techniques, which are not widely accessible and lack standardized protocols for nanofertilizer-specific assessments. This limits the ability to compare results across studies and impairs the development of robust risk assessments. The interaction between nanofertilizers and the rhizosphere microbiota represents another underexplored area. While some studies have reported beneficial effects on plant growth-promoting rhizobacteria^{132,133}, others have indicated potential disruption of microbial community structure and function^{133,134}. These divergent findings highlight the need for more detailed investigations using metagenomic and multi-omics approaches to elucidate the mechanisms underlying such interactions. Finally, the absence of harmonized international regulations and definitions poses barriers to the safe deployment of nanofertilizers. Regulatory frameworks are fragmented, with inconsistencies in product classification, labeling requirements, safety thresholds, and risk assessment protocols across countries. Without internationally agreed standards, both environmental monitoring and commercialization efforts remain limited. To address these gaps, future research should prioritize the following:

- Long-term, multi-site field trials under realistic agronomic conditions
- Mechanistic studies of nanoparticle-soil-plant-microbe interactions
- Development of accessible, standardized analytical methods for nanoparticle tracking
- Integration of LCA and exposure modeling into risk evaluation
- International cooperation for regulatory harmonization and data sharing.

Bridging these knowledge gaps is essential to unlock the full potential of nanofertilizers while safeguarding the environment and human health.

7. Conclusions and Outlook

Nanofertilizers represent a transformative innovation in modern agriculture, offering the potential to enhance nutrient-use efficiency (NUE), promote plant growth, and mitigate environmental degradation. Their unique physicochemical properties, such as high surface area, controlled release, and enhanced reactivity, enable precise nutrient delivery and reduce losses through leaching, volatilization, or immobilization. Furthermore, their integration into sustainable

agricultural practices aligns with global goals of reducing chemical inputs and improving crop productivity under variable environmental conditions. Despite these promising advantages, the widespread adoption of nanofertilizers is limited by several challenges. These include a limited understanding of their long-term environmental fate, the complexity of their interactions with soil and microbiota, and the risks posed to non-target organisms and human health. Current regulatory frameworks are fragmented and insufficient to fully address the unique behaviors and potential hazards of nanoscale agroinputs. The lack of standardized definitions, testing protocols, and traceability mechanisms further hampers risk assessments and product approvals across jurisdictions.

Future research should prioritize multidisciplinary approaches that combine agronomy, soil science, toxicology, and policy development. Long-term field studies are essential to evaluate efficacy, ecological safety, and potential trade-offs under real-world conditions. Simultaneously, LCA and ecotoxicological models should be incorporated into innovation pipelines to guide safe-by-design strategies for nanofertilizer development. Moreover, policy innovation is needed to harmonize regulatory practices and promote transparency across supply chains. The establishment of international guidelines, certification systems, and clear labelling requirements is vital to foster public trust and facilitate market entry. Equally important is investment in education and extension programs to support informed decision making by farmers, agronomists, and stakeholders. In conclusion, nanofertilizers offer a promising pathway for more efficient and sustainable agriculture. However, their successful implementation depends on a holistic approach that balances technological innovation with environmental stewardship, regulatory clarity and societal engagement.

Supporting Information: ¹Table of nanofertilizer classification, dosages, application methods, crop, and achieved effects (docx).

²Bibliometric analysis: Temporal evolution, geographical distribution and analysis of similarities (docx).

Author contribution

Conceptualization; project administration; investigation; visualization; writing—original draft; writing—review and editing, M.C.C.J. Investigation; visualization; writing—original draft;

writing—review and editing, M.S.R., M.P.G. and L.I.S.; Investigation; supervision; visualization; writing—original draft; writing—review and editing M.P.G. and C.D. Resources; supervision; visualization; funding acquisition; writing—review and editing, J.D. and T.C.e.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Declaration of competing interests

The authors declare that there are no known competing financial interests or personal relationships that could have influenced the work reported in this study.

Declaration of Funding

This research was funded by the CAPES, and FAPEMIG and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; Finance Code 302226/2022-2).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank CNPq, CAPES, and FAPEMIG for funding the study.

ABBREVIATIONS

AgNP, silver nanoparticle; ANVISA, Brazilian Health Regulatory Agency; CeO₂, cerium oxide; CNT, carbon nanotube; CO, carbon monoxide; DNA, deoxyribonucleic acid; EPA, Environmental Protection Agency (USA); EU, European Union; Fe₂O₃, ferric oxide; Fe₃O₄, magnetite; IBAMA, Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources; LCA, life cycle assessment; LMIC, low- and middle-income countries; nZVI, nanoscale zero-valent iron; NP, nanoparticle; NPK, nitrogen, phosphorus, potassium; NPSiO₂, nanosilica; NUE, nutrient use efficiency; NZ, nanozeolite; PGPR, plant growth-promoting rhizobacteria; REACH, Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (EU); TiO₂, titanium dioxide; ZnO, zinc oxide.

REFERENCES

- 1 - Zandalinas, S. I., Sengupta, S., Fritschi, F. B., Azad, R. K., Nechushtai, R., & Mittler, R. The impact of multifactorial stress combination on plant growth and survival. *New Phytologist*, 2021, 230, 3, 1034-1048. <https://doi.org/10.1111/nph.17232>
- 2 - Ishfaq, M., Kiran, A., Ur Rehman, H., Farooq, M., Ijaz, N. H., Nadeem, F., ... & Wakeel, A. Foliar nutrition: Potential and challenges under multifaceted agriculture. *Environmental and Experimental Botany*, 2022, 200, 104909. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2022.104909>
- 3 - Jacquet, F., Jeuffroy, M. H., Jouan, J., Le Cadre, E., Litrico, I., Malausa, T., ... & Huyghe, C. Pesticide-free agriculture as a new paradigm for research. *Agronomy for Sustainable Development*, 2022, 42, 1, 88. <https://doi.org/10.1007/s13593-021-00742-8>
- 4 - Mbuyisa, S., Bertling, I., & Ngcobo, B. L. Impact of Foliar-Applied Plant Extracts on Growth, Physiological and Yield Attributes of the Potato (*Solanum tuberosum* L.). *Agronomy*, 2024, 14, 1, 38. <https://doi.org/10.3390/agronomy14010038>
- 5 - Govindasamy, P., Muthusamy, S. K., Bagavathiannan, M., Mowrer, J., Jagannadham, P. T. K., Maity, A., ... & Tiwari, G. Nitrogen use efficiency—a key to enhance crop productivity under a changing climate. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14, 1121073. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1121073>
- 6 - Francis, D. V., Asif, A., & Ahmed, Z. F. R. Nanoparticle-enhanced plant defense mechanisms harnessed by nanotechnology for sustainable crop protection. *Nanoparticles in Plant Biotic Stress Management*, 2024, 451-491. https://doi.org/10.1007/978-981-97-0851-2_19
- 7 - Saleh, Tawfik A. Nanomaterials: Classification, properties, and environmental toxicities. *Environmental Technology & Innovation*, 2020, 20, 101067. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101067>
- 8 - Francis, D. V., Abdalla, A. K., Mahakham, W., Sarmah, A. K., & Ahmed, Z. F. Interaction of plants and metal nanoparticles: Exploring its molecular mechanisms for sustainable agriculture and crop improvement. *Environment international*, 2024, 190, 108859. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2024.108859>
- 9 - Usman, M., Farooq, M., Wakeel, A., Nawaz, A., Cheema, S. A., ur Rehman, H., ... & Sanaullah, M. Nanotechnology in agriculture: Current status, challenges and future opportunities. *Science of the total environment*, 2020, 721, 137778. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137778>

- 10 - Dasgupta, Nandita; Ranjan, Shivendu; Ramalingam, Chidambaram. Applications of nanotechnology in agriculture and water quality management. *Environmental Chemistry Letters*, 2017, 15, 591-605. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0648-9>
- 11 - Prasad, Ram; Bhattacharyya, Atanu; Nguyen, Quang D. Nanotechnology in sustainable agriculture: recent developments, challenges, and perspectives. *Frontiers in microbiology*, 2017, 8, 1014. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01014>
- 12 - Wang, P., Lombi, E., Zhao, F. J., & Kopittke, P. M. Nanotechnology: a new opportunity in plant sciences. *Trends in plant science*, 2016, 21(8), 699-712. [10.1016/j.tplants.2016.04.005](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.04.005)
- 13 - OH, Soojin; CAVE, Gareth; LU, Chungui. Vitamin B12 (cobalamin) and micronutrient fortification in food crops using NP technology. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12, 668819. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.668819>
- 14 - Joye, Iris J.; Davidov-Pardo, Gabriel; McClements, David Julian. Nanotechnology for increased micronutrient bioavailability. *Trends in food science & technology*, 2014, 40, 2, 168-182. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.08.006>
- 15 - Zainab, R., Hasnain, M., Ali, F., Abideen, Z., Siddiqui, Z. S., Jamil, F., ... & Park, Y. K. Prospects and challenges of nanopesticides in advancing pest management for sustainable agricultural and environmental service. *Environmental Research*, 2024, 119722. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.119722>
- 16 - Wang, D., Saleh, N. B., Byro, A., Zepp, R., Sahle-Demessie, E., Luxton, T. P., ... & Su, C. Nano-enabled pesticides for sustainable agriculture and global food security. *Nature nanotechnology*, 2022, 17(4), 347-360. <https://doi.org/10.1038/s41565-022-01082-8>
- 17 - Xu, T., Ma, C., Aytac, Z., Hu, X., Ng, K. W., White, J. C., & Demokritou, P. Enhancing agrichemical delivery and seedling development with biodegradable, tunable, biopolymer-based nanofiber seed coatings. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2020, 8(25), 9537-9548. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c02696>
- 18 - Saberi Riseh, R., Hassanisaadi, M., Vatankhah, M., Varma, R. S., & Thakur, V. K. Nano/micro-structural supramolecular biopolymers: innovative networks with the boundless potential in sustainable agriculture. *Nano-Micro Letters*, 2024, 16(1), 147. <https://doi.org/10.1007/s40820-024-01348-x>
- 19 - Harish, V., Tewari, D., Gaur, M., Yadav, A. B., Swaroop, S., Bechelany, M., & Barhoum, A. Review on NPs and nanostructured materials: Bioimaging, biosensing, drug delivery, tissue

- engineering, antimicrobial, and agro-food applications. *Nanomaterials*, 2022, 12(3), 457. <https://doi.org/10.3390/nano12030457>
- 20 - Reddy, M. K., Asthana, R., Debnath, S., Ray, P., Mandal, N., Arunachalam, A., & Koduru, J. R. Nanofertilizers for sustainable crop production: a comprehensive review. *BioNanoScience*, 2024, 14(2), 1918-1939. <https://doi.org/10.1007/s12668-024-01413-0>
- 21 - Sanjeev, K. K. G., Parasuraman, P., Kannan, P., Manivannan, V., & Senthil, A. Insights of nano-NPK foliar application on growth and yield of maize (*Zea mays* L.). *Plant Science Today*, 2024, 11, 5837. <https://doi.org/10.14719/pst.5837>
- 22 - Abdel-Hakim, S. G., Shehata, A. S., Moghannem, S. A., Qadri, M., El-Ghany, M. F. A., Abdeldaym, E. A., & Darwish, O. S. Nanoparticulate fertilizers increase nutrient absorption efficiency and agro-physiological properties of lettuce plant. *Agronomy*, 2023, 13(3), 691. <https://doi.org/10.3390/agronomy13030691>
- 23 - Seleiman, M. F., Almutairi, K. F., Alotaibi, M., Shami, A., Alhammad, B. A., & Battaglia, M. L. Nano-fertilization as an emerging fertilization technique: Why can modern agriculture benefit from its use? *Plants*, 2020, 10(1), 2. <https://doi.org/10.3390/plants10010002>
- 24 - Nongbet, A., Mishra, A. K., Mohanta, Y. K., Mahanta, S., Ray, M. K., Khan, M., ... & Chakrabartty, I. Nanofertilizers: A smart and sustainable attribute to modern agriculture. *Plants*, 2022 11(19), 2587. <https://doi.org/10.3390/plants11192587>
- 25 - Arora, P. K., Tripathi, S., Omar, R. A., Chauhan, P., Sinhal, V. K., Singh, A., ... & Singh, V. P. Next-generation fertilizers: the impact of bionanofertilizers on sustainable agriculture. *Microbial Cell Factories*, 2024, 23(1), 254. <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02528-5>
- 26 - Kumari, P., Ramkumar, S., Seethalaxmi, M., Rekha, T., Abiyoga, M., Baskar, V., & Sureshkumar, S. Biofortification of crops with nutrients by the application of nanofertilizers for effective agriculture. *Plant Physiology and Biochemistry* 2024, 108772. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2024.108772>
- 27 - Pudhuvai, B., Koul, B., Das, R., & Shah, M. P. Nano-Fertilizers (NFs) for resurgence in nutrient use efficiency (NUE): A sustainable agricultural strategy. *Current Pollution Reports*, 2024, 11(1), 1. <https://doi.org/10.1007/s40726-024-00331-9>
- 28 - Patil, B. M., Patil, V. L., Bhosale, S. R., Bhosale, R. R., Ingavale, D. R., Patil, S. S., ... & Vanalakkar, S. A. Field application of Ca-doped ZnO nanoparticles to maize and wheat plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2024, 210, 108552. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2024.108552>

- 29 - Mukhopadhyay, S. S. Nanotechnology in agriculture: prospects and constraints. *Nanotechnology, science and applications*, 2014, 63-71. <https://doi.org/10.2147/NSA.S39409>
- 30 - Selmani, A., Kovačević, D., & Bohinc, K. NPs: From synthesis to applications and beyond. *Advances in colloid and interface science*, 2022, 303, 102640. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102640>
- 31 - García-Torra, V., Cano, A., Espina, M., Ettcheto, M., Camins, A., Barroso, E., ... & Souto, E. B. State of the art on toxicological mechanisms of metal and metal oxide NPs and strategies to reduce toxicological risks. *Toxics* 2021, 9(8), 195. <https://doi.org/10.3390/toxics9080195>
- 32 - Zaman, W., Ayaz, A., & Park, S. Nanomaterials in agriculture: A pathway to enhanced plant growth and abiotic stress resistance. *Plants* 2025 14(5), 716. <https://doi.org/10.3390/plants14050716>
- 33 - Kumari, A., Gupta, A. K., Sharma, S., Jadon, V. S., Sharma, V., Chun, S. C., & Sivanesan, I. NPs as a tool for alleviating plant stress: Mechanisms, implications, and challenges. *Plants* 2024, 13(11), 1528. <https://doi.org/10.3390/plants13111528>
- 34 - Haghighi, M., Alviri, A., & Kappel, N. Screening of spermidine-mediated improvement of plant growth, photosynthetic performance, metabolites, and nutrition acquisition in six cabbage varieties. *South African Journal of Botany*, 2025, 178, 50-60. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2025.01.021>
- 35 - Ren, Y., Zhang, D., Cheng, B., Chen, B., Yue, L., Cao, X., ... & Wang, Z. Foliar Spraying Zinc–Carbon Dot Nanofertilizer Promotes Yield and Quality of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) through Leaf–Root Regulation. *ACS Agricultural Science & Technology*, 2025. <https://doi.org/10.1021/acsagscitech.4c00651>
- 36 - Auffinger, P., Cheatham, T. E., & Vaiana, A. C. Spontaneous formation of KCl aggregates in biomolecular simulations: a force field issue? *Journal of chemical theory and computation*, 2007, 3(5), 1851-1859. <https://doi.org/10.1021/ct700143s>
- 37 - Idrissi, A., Damay, P., Yukichi, K., & Jedlovsky, P. Self-association of urea in aqueous solutions: A Voronoi polyhedron analysis study. *The Journal of chemical physics*, 2008, 129(16). <https://doi.org/10.1063/1.2996348>
- 38 - Guardiola-Márquez, C. E., López-Mena, E. R., Segura-Jiménez, M. E., Gutierrez-Marmolejo, I., Flores-Matzumiya, M. A., Mora-Godínez, S., ... & Jacobo-Velázquez, D. A. Development and evaluation of zinc and iron NPs functionalized with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR)

- and microalgae for their application as bio-nanofertilizers. *Plants*, 2023, 12(20), 3657. <https://doi.org/10.3390/plants12203657>
- 39 - Nasser, E. D., Ngojo, J. K. M., Amon, R. E. C., Dy, J. M. S., Rosalia, J. J., & Lawagon, C. P. Synthesis of encapsulated nanofertilizer from biogas plant digestate. *Bioresource Technology Reports*, 2025, 29, 102009. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2024.102009>
- 40 - Negrescu, A. M., Killian, M. S., Raghu, S. N., Schmuki, P., Mazare, A., & Cimpean, A. Metal oxide NPs: review of synthesis, characterization and biological effects. *Journal of Functional Biomaterials*, 2022, 13(4), 274. <https://doi.org/10.3390/jfb13040274>
- 41 - Hussain, M., Alanazi, M. M., Abdelmohsen, S. A., Abdullah, M., Ali, M., Aman, S., ... & Farid, H. M. T. Enhanced supercapacitive performance of FeAl₂O₄ nanoparticles with neodymium (Nd) doping by sonication method. *Jom*, 2024, 76(6), 3185-3194. <https://doi.org/10.1007/s11837-024-06518-1>
- 42 - Blomberg, E., Wang, X., Herting, G., Khort, A., Arora, A., Buxton, S., ... & Odnevall, I. Effects of sonication on particle dispersions from a size, biodissolution, cytotoxicity and transferred dose perspective—a case study on nickel and nickel oxide particles. *PLoS One*, 2025, 20(5), e0323368. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0323368>
- 43 - Sun, C., Hu, Y., Zhu, Z., He, Z., Mei, L., Wang, C., ... & Du, X. Starch nanoparticles with predictable size prepared by alternate treatments of ball milling and ultrasonication. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 272, 132862. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.132862>
- 44 - Yang, H., Shang, H., & Zhang, X. (2024). Properties of silicon nanoparticles prepared by pulse discharge and ball milling. *Nanoscale*, 2024, 16(30), 14510-14521. <https://doi.org/10.1039/D4NR02136C>
- 45 - Du, K., Wei, R., & Li, G. Preparation and luminescent properties of SiC nanoparticles by strong pulse discharge in organic liquid phase environment. *Materials Research Express*, 2024, 11(3), 035902. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/ad3525>
- 46 - Ahmed, A. H., Jasima, A. S., & Jasim, S. K. Synthesis of gold nanoparticles by pulsed laser ablation and its study physical and mechanical properties. *International Journal of Nanoelectronics and Materials (IJNeaM)*, 2024, 17(4), 634-641. <https://doi.org/10.58915/ijneam.v17i4.1465>
- 47 - Nerkar, C. K., Shinde, S. G., Raut, V. S., Shaikh, S. A., & Chobe, S. S. Development of CuO-MgO nanocomposites heterojunction via the sol gel and Screen-Printing approach for the detection

- of CO₂ gas. *Journal of the Indian Chemical Society*, 2025, 101751. <https://doi.org/10.1016/j.jics.2025.101751>
- 48 - Ali, B. T., Qader, I. N., Babakr, K. A., Mohammed, S. S., Aziz, S. B., Aspoukeh, P., & Hussein, S. M. Exploring the impact of sol-gel and hydrothermal synthesis on the structural and electrochemical properties of NiFe₂O₄ nanoparticles in PEO: NaNO₃ polymer electrolytes. *Emergent Materials*, 2025, 1-14. <https://doi.org/10.1007/s42247-025-01088-7>
- 49 - Karrari, S., Mohammadzadeh, H., & Jafari, R. Characterization of ZnO-CuO and ZnO-CuO-NiO nanocomposites prepared by co-precipitation and antibacterial properties. *Applied Physics A*, 2025, 131(2), 147. <https://doi.org/10.1007/s00339-025-08273-9>
- 50 - Nguyen, T. N., Cappillino, P. J., & Chang, W. S. Revealing Enhanced Size Uniformity of the Electrochemical Deposition of Palladium Nanoparticles via Single-Particle Dark-Field Scattering Imaging. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2025, 129(13), 6477-6485. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.4c08682>
- 51 - Namakka, M., Rahman, M. R., Said, K. A. M. B., Mannan, M. A., & Patwary, A. M. A review of NP synthesis methods, classifications, applications, and characterization. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 2023, 20, 100900. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2023.100900>
- 52 - Takele, E., Feyisa Bogale, R., Shumi, G., & Kenasa, G. Green synthesis, characterization, and antibacterial activity of CuO/ZnO nanocomposite using Zingiber officinale rhizome extract. *Journal of Chemistry*, 2023 (1), 3481389. <https://doi.org/10.1155/2023/3481389>
- 53 - Riseh, R. S., & Vazvani, M. G. Green synthesis of metal NPs using plant growth promoting rhizobacteria and application in agriculture. *Plant Nano Biology*, 2024, 100111. <https://doi.org/10.1016/j.plana.2024.100111>
- 54 - Kumar, R., Dadhich, A., Dhiman, M., Sharma, L., & Sharma, M. M. Stimulatory effect of ZnO NPs as a nanofertilizer in seed priming of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) and their bioactivity studies. *South African Journal of Botany*, 2024, 165, 30-38. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.12.001>
- 55 - Salem, D. M., Ismail, M. M., & Aly-Eldeen, M. A. Biogenic synthesis and antimicrobial potency of iron oxide (Fe₃O₄) NPs using algae harvested from the Mediterranean Sea, Egypt. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 2019, 45(3), 197-204. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2019.07.002>

- 56 - Mandal, A. K., Behera, A. K., Parida, S., Nayak, R., Hembram, P., Behera, C., ... & Jena, M. Microalgal Nanofactory: Green Synthesis of Zinc Oxide NPs and Their Antibacterial and Antioxidant Potentials. *BioNanoScience*, 2025, 15(1), 1-12. <https://doi.org.ez26.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s12668-024-01664-x>
- 57 - Zhang, X., Yan, S., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. Synthesis of NPs by microorganisms and their application in enhancing microbiological reaction rates. *Chemosphere*, 2011, 82(4), 489-494. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.10.023>
- 58 - Samsoon, S., Azam, M., Khan, A., Ashraf, M., Bhatti, H. N., Alshawwa, S. Z., & Iqbal, M. Green-synthesized MnO₂ nanofertilizer impact on growth, photosynthetic pigment, and non-enzymatic antioxidant of *Vigna unguiculata* cultivar. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2024, 14(21), 26943-26952. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-03686-5>
- 59 - Dwivedi, A. D., & Gopal, K. Biosynthesis of silver and gold NPs using *Chenopodium album* leaf extract. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2010, 369(1-3), 27-33. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.07.020>
- 60 - Alghofaili, F., Tombuloglu, H., Almessiere, M. A., Akhtar, S., Tombuloglu, G., Turumtay, E. A., ... & Baykal, A. Fine-tuning the element dose in NP synthesis is the critical factor determining NP's impact on plant growth. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2024, 216, 109110. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2024.109110>
- 61 - Shen, M., Liu, S., Jiang, C., Zhang, T., & Chen, W. Recent advances in stimuli-response mechanisms of nano-enabled controlled-release fertilizers and pesticides. *Eco-Environment & Health*, 2023, 2(3), 161-175. <https://doi.org/10.1016/j.eehl.2023.07.005>
- 62 - Sharma, G., Saharan, V., Pal, A., & Sharma, S. S. Chitosan nanofertilizer to strengthen sink strength and provide resistance against PFSR (post flowering stalk rot) disease in maize. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2024, 60, 103303. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2024.103303>
- 63 - Ahmed, G. O., Halshoy, H. S., Mahmood, C. H., & Hama, J. R. Titanium NP and humic acid applications improve seed germination, growth development, and phytochemical contents of lettuce (*Lactuca sativa*) plants. *BioNanoScience*, 2024, 14(5), 4930-4941. <https://doi.org.ez26.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s12668-024-01545-3>

- 64 - Batool, S., Safdar, M., Naseem, S., Sami, A., Saleem, R. S. Z., Larrainzar, E., & Shahid, I. A Novel Enterococcus-Based Nanofertilizer Promotes Seedling Growth and Vigor in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plants*, 2024, 13(20), 2875. <https://doi.org/10.3390/plants13202875>
- 65 - Hassan, F. E., Alyafei, M. A., Kurup, S., Jaleel, A., Al Busaidi, N., & Ahmed, Z. F. Effective priming techniques to enhance ghaf (*Prosopis cineraria* L. Druce) seed germination for mass planting. *Horticulturae*, 2023, 9(5), 542. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9050542>
- 66 - Alhindaassi, H., Alhebsi, B. M. S., Francis, D. V., & Ahmed, Z. F. R. Nutri-priming for enhancing nutritional value of ghaf (*Prosopis cineraria*) microgreen. In *V All Africa Horticultural Congress-AAHC2024 1422*, 2024, (pp. 1-6). [10.17660/ActaHortic.2025.1422.1](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2025.1422.1)
- 67 - Ramkumar, S., Seethalaxmi, M., Rekha, T., Abiyoga, M., Baskar, V., & Sureshkumar, S. Biofortification of crops with nutrients by the application of nanofertilizers for effective agriculture. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2024, 108772. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2024.108772>
- 68 - Francis, D. V., Subhan, A., I. Mourad, A. H., K. Abdalla, A., & FR Ahmed, Z. Optimizing germination conditions of Ghaf seed using ZnO nanoparticle priming through Taguchi method analysis. *Scientific reports*, 2024, 14(1), 15946. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-67025-6>
- 69 - Asif, A., Ali, M., Qadir, M., Karthikeyan, R., Singh, Z., Khangura, R., ... & Ahmed, Z. F. Enhancing crop resilience by harnessing the synergistic effects of biostimulants against abiotic stress. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14, 1276117. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1276117>
- 70 - Lv, Jitao, Peter Christie, and Shuzhen Zhang. "Uptake, translocation, and transformation of metal-based NPs in plants: recent advances and methodological challenges." *Environmental Science: Nano*, 2019, 6, 1, 41-59. <https://doi.org/10.1039/C8EN00645H>
- 71 - Wang, X., Xie, H., Wang, P., & Yin, H. NPs in plants: uptake, transport and physiological activity in leaf and root. *Materials*, 2023, 16(8), 3097. <https://doi.org/10.3390/ma16083097>
- 72 - Bhardwaj, A. K., Arya, G., Kumar, R., Hamed, L., Pirasteh-Anosheh, H., Jasrotia, P., ... & Singh, G. P. Switching to nanonutrients for sustaining agroecosystems and environment: The challenges and benefits in moving up from ionic to particle feeding. *Journal of Nanobiotechnology*, 2022, 20, 1, 19. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-01177-9>
- 73 - Chen, J., Dou, R., Yang, Z., You, T., Gao, X., & Wang, L. Phytotoxicity and bioaccumulation of zinc oxide NPs in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018, 130, 604-612. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.08.019>

- 74 - Adhikari, T., Kundu, S., Biswas, A. K., Tarafdar, J. C., & Subba Rao, A. Characterization of zinc oxide nano particles and their effect on growth of maize (*Zea mays* L.) plant. *Journal of Plant Nutrition*, 2015, 38(10), 1505-1515. <https://doi.org/10.1080/01904167.2014.992536>
- 75 - Niu, J., Liu, C., Huang, M., Liu, K., & Yan, D. Effects of foliar fertilization: a review of current status and future perspectives. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 2021, 21, 104-118. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00346-3>
- 76 - Li, C., Wang, P., Lombi, E., Wu, J., Blamey, F. P. C., Fernández, V., ... & Kopittke, P. M. Absorption of foliar applied Zn is decreased in Zn deficient sunflower (*Helianthus annuus*) due to changes in leaf properties. *Plant and Soil*, 2018, 433, 309-322. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3841-0>
- 77 - Rani, S., Kumari, N., & Sharma, V. Uptake, translocation, transformation and physiological effects of NPs in plants. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 2022, 69, 9, 1579–1599. <https://doi.org/10.1080/03650340.2022.2103549>
- 78 - Xiong, T., Zhang, T., Dumat, C., Sobanska, S., Dappe, V., Shahid, M., ... & Li, S. Airborne foliar transfer of particular metals in *Lactuca sativa* L.: translocation, phytotoxicity, and bioaccessibility. *Environmental Science and Pollution Research*, 2019, 26, 20064-20078. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3084-x>
- 79 - Deshpande, P., Dapkekar, A., Oak, M. D., Paknikar, K. M., & Rajwade, J. M. (2017). Zinc complexed chitosan/TPP NPs: A promising micronutrient nanocarrier suited for foliar application. *Carbohydrate polymers*, 2017, 165, 394-401. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.061>
- 80 - Shahid, M., Dumat, C., Khalid, S., Schreck, E., Xiong, T., & Niazi, N. K. (2017). Foliar heavy metal uptake, toxicity and detoxification in plants: A comparison of foliar and root metal uptake. *Journal of hazardous materials*, 2017, 325, 36-58. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.11.063>
- 81 - Fan, X., Cao, X., Zhou, H., Hao, L., Dong, W., He, C., ... & Zheng, Y. Carbon dioxide fertilization effect on plant growth under soil water stress associates with changes in stomatal traits, leaf photosynthesis, and foliar nitrogen of bell pepper (*Capsicum annuum* L.). *Environmental and Experimental Botany*, 2020, 179, 104203. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104203>
- 82 - Alshaal, T., & El-Ramady, H. Foliar application: from plant nutrition to biofortification. *Environment, Biodiversity and Soil Security*, 2017, 1, 71-83. [10.21608/jenvbs.2017.1089.1006](https://doi.org/10.21608/jenvbs.2017.1089.1006)
- 83 - Nofal, E., Menesy, F., M Abd El-Hady, W., G Shehab, E., El-Ramady, H., & Prokisch, J. Effect of Nano-NPK and Nano-Chitosan Fertilizers on the Growth and Chemical Constituents of

- Philodendron sellum Plants. *Egyptian Journal of Soil Science*, 2024, 64(3), 1193-1205. [10.21608/EJSS.2024.289119.1769](https://doi.org/10.21608/EJSS.2024.289119.1769)
- 84 - Salama, D. M., Osman, S. A., Mahmoud, S. H., El-Tanahy, A. M., & Abd El-Aziz, M. E. Improving the Productivity and Physiological Characteristics of Lettuce Plants Using Spraying Calcium as a Nanofertilizer. *Horticulturae*, 2024, 10(11), 1157. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10111157>
- 85 - Amaya-Olivas, N. I., Sanchez, E., Hernandez-Ochoa, L., Ojeda-Barrios, D. L., Avila-Quezada, G. D., Flores-Córdova, M. A., ... & Ramírez-Estrada, C. A. Biofortification with magnesium nanofertilizer on bioactive compounds and antioxidant capacity in green beans. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 2023, 51(1), 12830-12830. <https://doi.org/10.15835/nbha51112830>
- 86 - Franco-Lagos, C. L., Sanchez, E., Palacio-Marquez, A., Perez-Alvarez, S., Terrazas-Gomez, M., Villalobos-Cano, O., & Ramirez-Estrada, C. A. Efficacy of the application of boron nanofertilizer on biomass, yield, nitrogen assimilation and photosynthetic activity in green beans. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 2023, 51(1), 12795-12795. <https://doi.org/10.15835/nbha51112795>
- 87 - Haydar, M. S., Ghosh, D., & Roy, S. Slow and controlled release nanofertilizers as an efficient tool for sustainable agriculture: Recent understanding and concerns. *Plant Nano Biology*, 2024, 7, 100058. <https://doi.org/10.1016/j.plana.2024.100058>
- 88 - Elsayed, A. A., Ahmed, E. G., Taha, Z. K., Farag, H. M., Hussein, M. S., & AbouAitah, K. Hydroxyapatite NPs as novel nano-fertilizer for production of rosemary plants. *Scientia Horticulturae*, 2022, 295, 110851. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110851>
- 89 - Sales, H. B. E., de S. Carolino, A., de A. Nunes, R. Z., Macalia, C. M. A., Ruzo, C. M., da C. Pinto, C., ... Sanches, E. A. Advances in Agricultural Technology: A Review of Slow-Release Nanofertilizers and Innovative Carriers. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 2024, 55, 12, 1849–1882. <https://doi.org/10.1080/00103624.2024.2326145>
- 90 - Bazana, M. T., Codevilla, C. F., & de Menezes, C. R. Nanoencapsulation of bioactive compounds: Challenges and perspectives. *Current opinion in food science*, 2019, 26, 47-56. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.03.005>
- 91 - Waheed, Z., Anwar, A., Sadiqa, A., Ahmad, A., Intisar, A., Javaid, A., ... & Kazi, M. Advancing sustainable agriculture: Metal-doped urea-hydroxyapatite hybrid nanofertilizer for

agro-industry. *Nanotechnology Reviews*, 2024, 13(1), 20240107. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2024-0107>

92 - Sun, W., Dou, F., Li, C., Ma, X., & Ma, L.Q. Impacts of metallic NPs and transformed products on soil health. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 2021, 51, 973–1002. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1794391>

93 - Zhang, H., Zheng, T., Wang, Y., Li, T., & Chi, Q. Multifaceted impacts of NPs on plant nutrient absorption and soil microbial communities. *Front. Plant Sci.*, 2024, 15, 1497006. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1497006>

94 - Kumar, N., Kumar, P., & Dubey, R.C. Nanomaterials in soil science for agricultural productivity and environmental sustainability. *Discov. Environ.*, 2025, 3, 27. <https://doi.org/10.1007/s44274-025-00210-0>

95 - Kareem, H.A., Adeel, M., Azeem, M., Ahmad, M.A., Shakoor, N., Hassan, M.U., Saleem, S., Irshad, A., Niu, J., Guo, Z., Branko, C., Hołubowicz, R., & Wang, Q. Antagonistic impact on cadmium stress in alfalfa supplemented with nano-zinc oxide and biochar via upregulating metal detoxification. *J. Hazard. Mater.*, 2023, 443, 130309. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.130309>

96 - Alkhaza'leh, H., Rahbeh, M., Hamadneh, I., AL-Mashakbeh, H., & Albalawna, Z. NPs in Soil Reclamation: A Review of Their Role in Reducing Soil Compaction. *Air Soil Water Res.*, 2025, 18. <https://doi.org/10.1177/11786221241311725>

97 - Phung, L.D., Sao, S., Afriani, S.D., Kumar, A., & Watanabe, T. ZnO NPs in composted sewage sludge enhance soil fertility and rice nutrition but elevate As and Pb accumulation. *J. Environ. Chem. Eng.*, 2024, 12, 113606. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2024.113606>

98 - Kale, S.S., Chauhan, R., Nigam, B., Gosavi, S., & Chaudhary, I.J. Effectiveness of NPs in improving soil fertility and eco-friendly crop resistance: A comprehensive review. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 2024, 56, 103066. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2024.103066>

99 - Johari, A., Golkarfard, H., Davoudi, F., & Fazeli, A. A predictive model based on the experimental investigation of collapsible soil treatment using nano-clay in the Sivand Dam region, Iran. *Bull. Eng. Geol. Environ.*, 2021, 80, 6725–6748. <https://doi.org/10.1007/s10064-021-02360-w>

- 100 - Padidar, M., Jalalian, A., Abdouss, M., Najafi, P., Honarjoo, N., & Fallahzade, J. Effects of Nanoclay on Some Physical Properties of Sandy Soil and Wind Erosion. *Int. J. Soil Sci.*, 2016, 11, 9–13. <https://doi.org/10.3923/ijss.2016.9.13>
- 101 - Dhanapal, A.R., Thiruvengadam, M., Vairavanathan, J., Venkidasamy, B., Easwaran, M., & Ghorbanpour, M. Nanotechnology approaches for the remediation of agricultural polluted soils. *ACS Omega*, 2024, 9, 13522–13533. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c09776>
- 102 - Al-Saeedi, A. Contribution of Nano-Silica in Affecting Some of the Physico-Chemical Properties of Cultivated Soil with the Common Bean (*Phaseolus vulgaris*). *J. Adv. Agric. Res.*, 2020, 25, 389–400. <https://doi.org/10.21608/jalexu.2020.189536>
- 103 - Hsu, C., Rheima, A.M., Mohammed, M.S., Kadhim, M.M., Mohammed, S.H., Abbas, F.H., Abed, Z.T., Mahdi, Z.M., Abbas, Z.S., Hachim, S.K., Ali, F.K., Mahmoud, Z.H., & Kianfar, E. Application of carbon nanotubes and graphene-based nanoadsorbents in water treatment. *BioNanoScience*, 2023, 13, 1418–1436. <https://doi.org/10.1007/s12668-023-01175-1>
- 104 - Alsharef, J.M.A., Taha, M.R., & Firoozi, A.A. Govindasamy, P. Potential of Using Nanocarbons to Stabilize Weak Soils. *Appl. Environ. Soil Sci.*, 2016, 2016, 5060531. <https://doi.org/10.1155/2016/5060531>
- 105 - Golui, D., Datta, S.P., Dwivedi, B.S., Meena, M.C., Varghese, E., Sanyal, S.K., Ray, P., Shukla, A.K., & Trivedi, V.K. Assessing soil degradation in relation to metal pollution—A multivariate approach. *Soil Sediment Contam.*, 2019, 28, 630–649. <https://doi.org/10.1080/15320383.2019.1640660>
- 106 - Hou, D., Jia, X., Wang, L., McGrath, S.P., Zhu, Y.G., Hu, Q., Zhao, F.J., Bank, M.S., O'Connor, D., & Nriagu, J. Global soil pollution by toxic metals threatens agriculture and human health. *Science*, 2025, 388, 316–321. <https://doi.org/10.1126/science.adr5214>
- 107 - Rizwan, M., Ali, S., Ali, B., Adrees, M., Arshad, M., Hussain, A., Rehman, M.Z., & Waris, A.A. Zinc and iron oxide NPs improved the plant growth and reduced the oxidative stress and cadmium concentration in wheat. *Chemosphere*, 2019, 214, 269–277. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.120>
- 108 - Mohamed, E.F., & Awad, G. Development of nano-sensor and biosensor as an air pollution detection technique for the foreseeable future. *Compr. Anal. Chem.*, 2022, 99, 163–188. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820849-0.00009-4>

- 109 - Singh, A., Chaudhary, S., & Dehiya, B.S. Fast removal of heavy metals from water and soil samples using magnetic Fe₃O₄ NPs. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2021, 28, 3942–3952. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10737-9>
- 110 - Daryabeigi Zand, A., Tabrizi, A.M., & Heir, A.V. Co-application of biochar and titanium dioxide NPs to promote remediation of antimony from soil by *Sorghum bicolor*: metal uptake and plant response. *Heliyon*, 2020, 6, e04669. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04669>
- 111 - Bakshi, M., & Kumar, A. Co-application of TiO₂ NPs and hyperaccumulator *Brassica juncea* L. for effective Cd removal from soil: Assessing the feasibility of using nano-phytoremediation. *J. Environ. Manag.* 2023, 341, 118005. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.118005>
- 112 - Wolińska, A., & Stępniewska, Z. Dehydrogenase activity in the soil environment. *Dehydrogenases*, 2012, 10, 183–210. <https://doi.org/10.5772/48294>
- 113 - Jiang, H., Lv, L., Ahmed, T., Jin, S., Shahid, M., Noman, M., Osman, H.E.H., Wang, Y., Sun, G., Li, X., & Li, B. Effect of the NP exposures on the tomato bacterial wilt disease control by modulating the rhizosphere bacterial community. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, 23, 414. <https://doi.org/10.3390/ijms23010414>
- 114 - Handa, M., & Kalia, A. Exploring the dynamics of NP-plant-microbe interactions to realize the goal of improved crop productivity and food security. *Rhizosphere*, 2024, 100884. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2024.100884>
- 115 - Kalia, A., & Kaur, H. Agri-Applications of Nano-Scale Micronutrients: Prospects for Plant Growth Promotion. In: Raliya, R. (Ed.) *Agri-Applications of Nano-Scale Micronutrients*, CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2019; ISBN 9781315123950. <https://doi.org/10.1201/9781315123950>
- 116 - Civilini, M., Colautti, A., Brunello, A., Saccomanno, N., Marchiol, L., Foscari, A., & Iacumin, L. Impact of CeO₂ NPs on the microbiota of the *S. flos-cuculi* L. (*Caryophyllaceae*) rhizosphere. *Environ. Sci. Nano.*, 2024, 11, 2157–2172. <https://doi.org/10.1590/2447-536X.v26i2.2156>
- 117 - Saleem, S., Malik, A., & Khan, S.T. ZnO NPs in combination with Zn biofertilizer improve wheat plant growth and grain Zn content without significantly changing the rhizospheric microbiome. *Environ. Exp. Bot.*, 2023, 213, 105446. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2023.105446>

- 118 - Sun, C., Sun, B., Chen, L., Zhang, M., Lu, P., Wu, M., Xue, Q., Guo, Q., Tang, D., & Lai, H. Harnessing biosynthesized selenium NPs for recruitment of beneficial soil microbes to plant roots. *Cell Host Microbe*, 2024, 32, 2148–2160. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2024.10.015>
- 119 - Gomes, M. P. Nanophytoremediation: advancing phytoremediation efficiency through nanotechnology integration. *Discover Plants*, 2025, 2(1), 8. <https://doi.org/10.1007/s44372-025-00090-x>
- 120 - Li, W., Zhang, P., Qiu, H., Van Gestel, C. A., Peijnenburg, W. J., Cao, X., ... & He, E. Commonwealth of soil health: how do earthworms modify the soil microbial responses to CeO₂ nanoparticles? *Environmental Science & Technology*, 2021, 56(2), 1138-1148. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01660>
- 121 - Ameen, F., Alsamhary, K., Alabdullatif, J. A., & ALNadhari, S. A review on metal-based nanoparticles and their toxicity to beneficial soil bacteria and fungi. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 213, 112027. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112027>
- 122 - Tian, H., Kah, M., & Kariman, K. Are nanoparticles a threat to mycorrhizal and rhizobial symbioses? A critical review. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10, 1660. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01660>
- 123 - Al Yabhouni, L., Subhan, A., Mourad, A. H. I., Francis, D. V., Ahmed, Z. F., & Ramachandran, T. Antibacterial and photocatalytic activity of chitosan encapsulated Ag/ZnO ternary nanocomposites. *Next Research*, 2025, 100451. <https://doi.org/10.1016/j.nexres.2025.100451>
- 124 - Basinas, I., Jiménez, A. S., Galea, K. S., Tongeren, M. V., & Hurley, F. A systematic review of the routes and forms of exposure to engineered nanomaterials. *Annals of Work Exposures and health*, 2018, 62(6), 639-662. <https://doi.org/10.1093/annweh/wxy048>
- 125 - Mallin, A. C., Marques, R. Z., Kitamura, R. S. A., Prodocimo, M. M., de Moraes, L. C., Figueredo, C. C., ... & Gomes, M. P. Lemna minor as a phytoremediator of cobalt nanoparticles: Insights into toxicity and remediation. *Water Biology and Security*, 2025, 100442. <https://doi.org/10.1016/j.watbs.2025.100442>
- 126 - Bordin, E. R., Ramsdorf, W. A., Domingos, L. M. L., de Souza Miranda, L. P., Mattoso Filho, N. P., & Cestari, M. M. Ecotoxicological effects of zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) on aquatic organisms: Current research and emerging trends. *Journal of Environmental Management*, 2024, 349, 119396. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.119396>

- 127 - Mahjoubian, M., Naeemi, A. S., Moradi-Shoeili, Z., Tyler, C. R., & Mansouri, B. Oxidative stress, genotoxic effects, and other damages caused by chronic exposure to silver nanoparticles (Ag NPs) and zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs), and their mixtures in zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2023, 472, 116569. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2023.116569>
- 128 - Lee, Y. L., Shih, Y. S., Chen, Z. Y., Cheng, F. Y., Lu, J. Y., Wu, Y. H., & Wang, Y. J. Toxic effects and mechanisms of silver and zinc oxide nanoparticles on zebrafish embryos in aquatic ecosystems. *Nanomaterials*, 2022, 12(4), 717. <https://doi.org/10.3390/nano12040717>
- 129 - Prakash, S., Rajpal, V. R., Vaishnavi, S., & Deswal, R. Phyto-nanotechnology: Current status, Challenges, and leads for future. *ScienceOpen Posters*, 2021. <https://doi.org/10.14293/s2199-1006.1.sor-.ppvb2vq.v1>
- 130 - Astner, A. F., Gillmore, A. B., Yu, Y., Flury, M., DeBruyn, J. M., Schaeffer, S. M., & Hayes, D. G. Formation, behavior, properties and impact of micro-and nanoplastics on agricultural soil ecosystems (A Review). *NanoImpact*, 2023, 31, 100474. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2023.100474>
- 131 - Hazarika, A., Yadav, M., Yadav, D. K., & Yadav, H. S. An overview of the role of nanoparticles in sustainable agriculture. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2022, 43, 102399. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102399>
- 132 - Zhang, H.; Zheng, T.; Wang, Y.; Li, T.; Chi, Q. Multifaceted impacts of NPs on plant nutrient absorption and soil microbial communities. *Front. Plant Sci.*, 2024, 15, 1497006. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1497006>
- 133 - Upadhyay, P. K., Dey, A., Singh, V. K., Dwivedi, B. S., Singh, R. K., Rajanna, G. A., ... & Shukla, G. Changes in microbial community structure and yield responses with the use of nanofertilizers of nitrogen and zinc in wheat–maize system. *Scientific Reports*, 2024, 14(1), 1100. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-48951-3>
- 134 - Kalwani, M., Chakdar, H., Srivastava, A., Pabbi, S., & Shukla, P. Effects of nanofertilizers on soil and plant-associated microbial communities: Emerging trends and perspectives. *Chemosphere*, 2022, 287, 132107. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132107>

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

ARTIGO. SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS E NANOCAMPÓSITO Zn/Cu: EFEITOS DE SUA APLICAÇÃO COM MICRORGANISMOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO NO CULTIVO *IN VITRO* DE BATATA-DOCE

RESUMO

A nanotecnologia é um campo multidisciplinar das ciências que estuda as aplicações e propriedades de materiais e estruturas com dimensões variando entre 1 e 100 nm. Essas nanoestruturas podem ser obtidas por rotas físicas, químicas ou biológicas. A biossíntese ou síntese verde de nanopartículas (NPs) baseia-se em princípios e condições de reação ambientalmente amigáveis. Nesta estratégia são empregados precursores biológicos como bactérias, vírus, fungos, leveduras, algas para a formação de nanoestruturas. Microrganismos promotores de crescimento são capazes de interagir com as plantas e seus sistemas de inúmeras formas, podendo habitar espaços externos como a rizosfera, a filosfera e a espermosfera além de espaços internos como os tecidos vasculares, isso permite que desenvolvam relações benéficas, patogênicas ou neutras com seus hospedeiros e com o ambiente. O objetivo desse trabalho foi avaliar o uso de bionanopartículas de zinco (Zn) e cobre (Cu) e do bionanocompósito de Zn/Cu em matriz biológica e seus efeitos nutricionais no crescimento de batata-doce *in vitro* e a atuação da bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* como promotora de crescimento. O estudo foi constituído de quatorze tratamentos, sendo cinco controles (1 – sem bactéria e sem NPs; 2 – bactéria; 3 – Zn; 4 – Cu; 5 - Zn + Cu) e nove tratamentos contendo bactéria e NPs (6 - Zn + Bac + MS; 7 - Cu + Bac + MS; 8 – Zn/Cu + Bac + MS; 9 – Pellet bacteriano + Nps Zn; 10 - Pellet bacteriano + Nps Cu; 11 - Pellet bacteriano + Nps Zn/Cu; 12 – NPs Zn; 13 – NPs Cu; 14 – NPs Zn/Cu). Explantes de batata-doce cultivados em meio MS líquido e suspensos por pontes de papel foram inoculados com os tratamentos. Após 75 dias, foram avaliados comprimento de parte aérea, comprimento de raiz, massa seca, clorofila total e carotenóides além do teor de Zn e Cu da massa seca total. A bactéria *G. diazotrophicus* se mostrou promissora como matriz para a produção de NPs de Zn e Cu de forma sustentável. A utilização da bactéria *G. diazotrophicus* não foi uma boa alternativa para *in vitro* nas condições testadas, pois afetou negativamente o crescimento e desenvolvimento dos explantes em todos os tratamentos. A utilização *in vitro* de NPs de Zn, Cu e do composto Zn/Cu biossintetizadas se apresenta como uma alternativa a ser mais bem compreendida para futuras aplicações.

Palavras-chaves: *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Biossíntese. Cultura de tecidos vegetais. *Ipomea batatas* L.,

ABSTRACT

Nanotechnology is a multidisciplinary field of science that studies the applications and properties of materials and structures with dimensions ranging from 1 to 100 nm. These nanostructures can be obtained through physical, chemical, or biological routes. The biosynthesis, or green synthesis, of nanoparticles (NPs) is based on environmentally friendly principles and reaction conditions. This strategy employs biological precursors such as bacteria, viruses, fungi, yeasts, and algae for the formation of nanostructures. Plant growth-promoting microorganisms can interact with plants and their systems in numerous ways. They may inhabit external environments such as the rhizosphere, phyllosphere, and spermosphere, as well as internal environments such as vascular tissues, which allows them to establish beneficial, pathogenic, or neutral relationships with their hosts and with the environment. The objective of this study was to evaluate the use of Zn and Cu bionanoparticles and a Zn/Cu bionanocomposite in a biological matrix, as well as their nutritional effects on the *in vitro* growth of sweet potato, and to assess the role of the bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* as a growth promoter. The study comprised fourteen treatments: five controls (1 – without bacterium and without NPs; 2 – bacterium; 3 – Zn; 4 – Cu; 5 – Zn + Cu) and nine treatments containing bacterium and NPs (6 – Zn + Bac + MS; 7 – Cu + Bac + MS; 8 – Zn/Cu + Bac + MS; 9 – bacterial pellet + Zn NPs; 10 – bacterial pellet + Cu NPs; 11 – bacterial pellet + Zn/Cu NPs; 12 – Zn NPs; 13 – Cu NPs; 14 – Zn/Cu NPs). Sweet potato explants grown in liquid MS medium and supported by paper bridges were inoculated with the treatments. After 75 days, shoot length, root length, dry mass, chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll, carotenoids, and Zn and Cu contents in total dry mass were evaluated. The bacterium *G. diazotrophicus* proved promising as a matrix for the sustainable production of Zn and Cu nanoparticles. However, the use of *G. diazotrophicus* was not a suitable alternative for *in vitro* application under the tested conditions, as it negatively affected the growth and development of explants in all treatments. The *in vitro* use of biosynthesized Zn, Cu, and Zn/Cu composite nanoparticles appears to be an approach that warrants further investigation for future applications.

Keywords: *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Biosynthesis. Plant Tissue culture.

1 INTRODUÇÃO

A batata-doce (*Ipomea batatas* L.) é uma hortaliça tuberosa rústica da família Convolvulaceae, com ampla capacidade de adaptação em diferentes condições edafoclimáticas, podendo ser cultivada em todas as regiões do Brasil (Queiroga *et al.* 2007). No cenário mundial, a Ásia se destacou em 2022 como a principal região produtora (61%), seguida da África (34,2%) e das Américas (3,7%) (FAO, 2022). De acordo com o IBGE (2022), no ano de 2022, foram colhidos 58.229 hectares de batata-doce no Brasil, com produção total de 847.000 toneladas. Mundialmente conhecida, a cultivar Beuaregard foi desenvolvida pela Louisiana Agricultural Experiment Station em 1981 e chegou ao Brasil através da EMBRAPA. Esta cultivar apresenta copa considerada rala com folhas inteiras e alongadas e com nervuras verdes. As raízes tuberosas são grandes, fusiformes e ovoides e com cascas rosa clara e polpa alaranjada. A cultivar possui alto teor de β -caroteno além de ferro e zinco, se apresentando como uma fonte nutricional importante para alimentação humana (Balázs *et al.* 2024; Humia *et al.* 2020).

A produtividade da batata-doce no Brasil é significativamente inferior ao seu potencial, devido, entre outros fatores, à ausência ou à aplicação inadequada de insumos nutricionais (Higashikawa *et al.* 2024). Martins *et al.* (2023) comprovaram que a utilização adequada de fertilizantes NPK e reguladores de crescimento favorece o aumento do número de raízes totais e do número de raízes comerciais por planta de batata-doce. A variação da qualidade nutricional e da composição química da batata-doce está relacionada com as estratégias de manejo, com a cultivar utilizada, com a qualidade do solo, com as condições climáticas e com a região geográfica (Souza *et al.* 2020).

A reprodução vegetativa é a principal forma de propagação da batata-doce, podendo ser feita por meio de ramos ou raízes tuberosas obtidas na colheita. Contudo, esse procedimento pode ser um desafio quando se considera o controle de disseminação de pragas e doenças. No sentido de minimizar os danos causados nesse momento, a micropropagação se apresenta como uma ferramenta sustentável e de resultados rápidos para obtenção de plantas saudáveis (Amaro *et al.* 2017). Além disso, a batata-doce pode ser facilmente cultivada em condições de crescimento controladas, com crescimento rápido e manipulação simples, se tornando uma excelente ferramenta para pesquisa.

A cultura de tecidos vegetais permite, através de um conjunto de técnicas, o cultivo e a manutenção de plantas, tecidos, órgãos e células vegetais em meio de cultura sintético, sob condições controladas, estéreis, dentro de um recipiente em laboratório (Phillips *et al.* 2019; Gunasena *et al.* 2024). A propagação por cultura de tecidos pode oferecer uma série de vantagens em relação aos métodos tradicionais, dentre eles a rápida produção e propagação de material vegetal com qualidade e uniforme, multiplicação acelerada de espécies com crescimento lento, baixa produção de sementes ou com baixas taxas de germinação (Nordine, 2025).

A nanotecnologia é um campo multidisciplinar das ciências que estuda as aplicações e propriedades de materiais e estruturas com dimensões variando entre 1 e 100 nm (Wu *et al.* 2025). Nanoestruturas podem apresentar, na maioria das vezes, propriedades físico-químicas únicas e melhoradas em relação às suas contrapartes em tamanho macro (Tank *et al.* 2025; Periakaruppan *et al.* 2025). Propriedades antioxidantes e catalíticas, biocompatibilidade, permeabilidade, estrutura e, principalmente, o tamanho são algumas características que conferem à nanotecnologia possibilidades de transformar a agricultura, com soluções inovadoras que podem mitigar os danos ambientais causados pelas práticas tradicionalmente empregadas nos sistemas agrícolas, impactando na produtividade das culturas (García-Torra *et al.* 2021; Selmani *et al.* 2022; Rodríguez-Seijo *et al.* 2025).

Considerando todas as possibilidades de utilização das nanopartículas e suas propriedades físicas e químicas, é de extrema importância entender seu comportamento em variados tipos de matriz (fluida, biológica etc.) e sua estabilidade de dispersão. Além disso, é fundamental conhecer o processo de síntese das nanopartículas para compreender todas as suas funcionalidades em relação a sua monodispersidade, carga superficial, morfologia (esferas, nanotubos, nanofios, nanofolhas, nanoplacas, nanodiscos, nanoflores etc.), área superficial, entre outras propriedades (Selmani *et al.* 2022).

Os avanços em nanotecnologia têm demonstrado que a morfologia dos nanomateriais desempenha papel crucial em suas propriedades, podendo ser modulada por diferentes estratégias de síntese. Essas estratégias se enquadram nas categorias *bottom-up* e *top-down* (Jeevarathin; Asharani, 2024). No primeiro caso, ocorre a agregação de átomos e moléculas para a formação de nanoestruturas, geralmente caracterizadas por alta uniformidade em tamanho e forma. Em contrapartida, a abordagem *top-down* utiliza materiais de maior escala que são fragmentados e

processados até atingirem dimensões nanométricas, com vantagens principalmente na escalabilidade e no controle de tamanho (TANK *et al.* 2025).

Essas nanoestruturas podem ser obtidas por rotas físicas, químicas ou biológicas. Embora amplamente utilizadas, as abordagens físicas e químicas apresentam alto consumo energético, elevado custo e potencial de gerar subprodutos tóxicos. Por outro lado, os métodos biológicos se destacam pela utilização de organismos vivos ou seus metabólitos — incluindo plantas, fungos, leveduras, bactérias, vírus e microalgas — oferecendo assim uma alternativa de síntese mais econômica, acessível e ambientalmente sustentável (Tank *et al.* 2025; Goswami *et al.* 2024).

Na biossíntese ou síntese verde de nanoestruturas, metabólitos celulares produzidos por organismos vivos como flavonoides, fenóis, alcaloides e proteínas contribuem para redução e estabilização de íons metálicos. A síntese pode se dar extracelular ou intracelular, variando de acordo com o organismo vivo e as condições de crescimento como pH, temperatura, concentração do sal precursor e do extrato (Couto Junior *et al.* 2025). A interação entre microrganismos e nanotecnologia se apresenta de forma promissora podendo promover benefícios para a agricultura, melhorando a eficiência de aplicação e de utilização de nutrientes pelas culturas.

Microrganismos promotores de crescimento são capazes de interagir com as plantas e seus sistemas de inúmeras formas, podendo habitar espaços externos como a rizosfera, a filosfera e a espermosfera além de espaços internos como os tecidos vasculares, isso permite que desenvolvam relações benéficas, patogênicas ou neutras com seus hospedeiros e com o ambiente (Elnahal *et al.* 2022). A relação benéfica dos microrganismos e seus metabólitos pode melhorar a resistência de plantas ao ataque de patógenos, promover o desenvolvimento e o crescimento de forma direta ou indireta induzindo o metabolismo do hospedeiro, fixando nutrientes e produzindo hormônios e enzimas que serão utilizados pela planta e controlando agentes patogênicos à cultura (Wang *et al.* 2024).

Gluconacetobacter diazotrophicus é uma bactéria promotora de crescimento de plantas devido à sua capacidade de fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfatos, biossíntese de fitormônios como auxina e giberelinas e controle de fitopatógenos (Pallucchini *et al.* 2024; Ceballos-Aguirre *et al.* 2025; Moreira *et al.* 2025). Gram-negativa, endofítica e não nodulante, *G. diazotrophicus* foi relatada em diferentes culturas como, batata-doce, café, abacaxi (Ceballos-Aguirre *et al.* 2023) além da cana-de-açúcar onde foi isolada pela primeira vez em 1988 (Cavalcante; Dobereiner, 1988). Durante seu ciclo as plantas podem dividir o mesmo ambiente,

sejam naturais ou agrícolas, com diversos microrganismos. O conhecimento da relação planta-microrganismo-ambiente pode melhorar as estratégias de nutrição e biocontrole que dependem dessa associação.

A integração microrganismos-nanotecnologia-cultura de tecidos vegetais surge como uma importante ferramenta nos avanços das práticas utilizadas no cultivo *in vitro*, melhorando a propagação de plantas, aumentando o crescimento, induzindo a produção de metabólitos secundários além da manipulação genética, oferecendo grande potencial de aumentar a produtividade das culturas e enfrentar os desafios globais da agricultura (Gunasena *et al.* 2024; Mahanta; Gantait, 2025).

Buscando entender melhor a biossíntese de nanopartículas mediada por bactéria e a sua utilização no crescimento *in vitro* de batata-doce, o objetivo desse trabalho foi avaliar o uso de bionanopartículas de Zn e Cu e do bionanocompósito de Zn/Cu em matriz biológica e seus efeitos nutricionais no crescimento de batata-doce *in vitro* e a atuação da bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* como promotora de crescimento.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção de genótipo de batata-doce e cultivo *in vitro*

O experimento foi conduzido no laboratório de cultura de tecidos, bioinsumos e interação microrganismo-planta (LCT/LABIMP) da Universidade Federal de Lavras (UFLA). O material vegetal utilizado foi obtido de explantes já estabelecidos *in vitro* no referido laboratório. Foi escolhido a cultivar de batata-doce Beauregard levando em consideração a cor da polpa e seu posicionamento comercial.

Os explantes de 1 cm de comprimento contendo ao menos uma gema, foram cultivados em tubos com 15 mL de meio MS (Murashige; Skoog, 1962) líquido, contendo 20 g L⁻¹ de sacarose, com pH ajustado para 5,92 e vedados com plástico filme transparente. Para suporte dos explantes foram utilizadas pontes de papel filtro. O cultivo foi conduzido em sala de crescimento com iluminação artificial fornecida por lâmpadas de LED branca e irradiância média de 49,4 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2 °C. Após 15 dias, foi feita a inoculação dos tratamentos. Considerando o fato de a bactéria *G. diazotrophicus* Pal 5 ter sido originalmente

isolada do interior de raízes e colmos de cana-de-açúcar e possuir tolerância a altas concentrações de sacarose, cultivou-se batata-doce cultivar Beauregard nas mesmas condições mencionadas acima e em meio de cultura MS com 30 g L⁻¹ de sacarose para avaliar o efeito da bactéria no crescimento do explante.

2.2 Reativação, multiplicação, crescimento e padronização do inóculo bacteriano

Nessa etapa foi utilizado a bactéria *G. diazotrophicus* Pal 5 (BR 11281 – Embrapa Agrobiologia – CNPAB) obtida da coleção da Coleção do Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner da Embrapa Agrobiologia do Brasil (CCBD). A bactéria foi estriada em placas de Petri de 60 x 15mm com meio de cultura previamente preparado e esterilizado em autoclave por 20 minutos a 125 °C, 1 atm, dentro de câmaras de fluxo laminar de circulação de ar forçado, com o auxílio de alças de inoculação. Seguidamente as placas foram fechadas com o auxílio de plástico filme para completa vedação e, posteriormente, acondicionados em BOD com ambiente controlado com temperatura de 26 ± 2 °C por 24 horas. Após essa etapa a bactéria foi transferida para geladeira para armazenamento. Para a reativação e multiplicação a bactéria foi transferida da placa de Petri para tubo falcon de 15 ml contendo caldo nutriente (5 g L⁻¹ de peptona, 1,5 g L⁻¹ de extrato de levedura, 5 g L⁻¹ de extrato de carne e 1,5 g L⁻¹ de NaCl), autoclavado, onde foi mantida por 24 horas em BOD à 30°C. Após o crescimento das colônias, o caldo nutriente foi centrifugado por 10 minutos em 4000 rpm para obtenção de pellet bacteriano que foi ressuscitado em 10 mL de água deionizada para a padronização das UFC considerando a escala de MC Farland nº 2 (6,0 x 10⁸ UFC mL⁻¹).

2.3 Inoculação de isolado bacteriano e biossíntese de nanopartículas

Para a biossíntese de nanopartículas, 100 µL do isolado bacteriano previamente padronizado foram inoculados em quatro Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de caldo nutriente, conforme a composição descrita a seguir:

- Erlenmeyer I: caldo nutriente + sulfato de zinco (ZnSO₄).
- Erlenmeyer II: caldo nutriente + sulfato de cobre (CuSO₄).
- Erlenmeyer III: caldo nutriente + composto (ZnSO₄ + CuSO₄).

- Erlenmeyer IV: caldo nutriente + isolado bacteriano, sem adição de sais metálicos.

Nos Erlenmeyers I e II foram adicionados 0,2 mmol do respectivo sal, enquanto no Erlenmeyer III foram adicionados 0,1 mmol de ZnSO_4 e 0,1 mmol de CuSO_4 , resultando em concentração final de 2 mmol L^{-1} em todos os tratamentos contendo sais.

Adicionalmente, foram preparados três Erlenmeyers contendo apenas as soluções estoque dos sais metálicos, sem inoculação bacteriana:

- Erlenmeyer V: solução de ZnSO_4 (2 mmol L^{-1})
- Erlenmeyer VI: solução de CuSO_4 (2 mmol L^{-1})
- Erlenmeyer VII: solução do composto ($\text{ZnSO}_4 + \text{CuSO}_4$; 2 mmol L^{-1})

Após a inoculação, os sete Erlenmeyers foram incubados em shaker orbital a 120 rpm por 72 horas, ao abrigo da luz, para permitir o crescimento bacteriano e a biossíntese das nanopartículas.

2.4 Preparo do inóculo e aplicação dos tratamentos

Os experimentos foram conduzidos em meio de cultura MS suplementado com sacarose, utilizando duas concentrações: 30 g L^{-1} e 20 g L^{-1} .

Para o meio contendo 30 g L^{-1} de sacarose, foram cultivados 24 tubos, sendo:

- 12 tubos sem aplicação bacteriana
- 12 tubos com aplicação bacteriana

Desses, 8 tubos foram considerados nas avaliações experimentais.

Para o experimento conduzido em meio MS com 20 g L^{-1} de sacarose, os tratamentos foram estabelecidos conforme descrito abaixo.

Tratamentos controle e soluções simples

- Tratamento 1: controle absoluto, sem qualquer aplicação.
- Tratamento 2: inoculação de 100 μL do isolado bacteriano padronizado, proveniente do Erlenmeyer IV (bactéria em caldo nutriente, sem sais).
- Tratamento 3: aplicação de 100 μL da solução de ZnSO_4 (Erlenmeyer V).
- Tratamento 4: aplicação de 100 μL da solução de CuSO_4 (Erlenmeyer VI).
- Tratamento 5: aplicação de 100 μL da solução composto ($\text{ZnSO}_4 + \text{CuSO}_4$) (Erlenmeyer VII).

Tratamentos com solução completa de biossíntese

Os tratamentos 6, 7 e 8 receberam 100 μ L da solução total presente nos Erlenmeyers de biossíntese, contendo caldo nutriente + sal metálico + bactérias, conforme descrito a seguir:

- Tratamento 6: solução do Erlenmeyer I (Zn + bactéria)
- Tratamento 7: solução do Erlenmeyer II (Cu + bactéria)
- Tratamento 8: solução do Erlenmeyer III (compósito Zn + Cu + bactéria)

Tratamentos com suspensão bacteriana após centrifugação

Para os tratamentos 9, 10 e 11, foram coletados 15 mL das soluções dos Erlenmeyers I, II e III, que foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos para obtenção do pellet bacteriano. Os pellets obtidos foram ressuspensos em 10 mL de água deionizada, e as suspensões foram padronizadas na escala de McFarland nº 2.

A partir dessas suspensões, foram aplicados 100 μ L em cada tubo, correspondendo aos seguintes tratamentos:

- Tratamento 9: bactéria proveniente do sistema Zn + bactéria
- Tratamento 10: bactéria proveniente do sistema Cu + bactéria
- Tratamento 11: bactéria proveniente do sistema compósito Zn + Cu + bactéria

Tratamentos com nanopartículas liberadas por lise celular

Para os tratamentos 12, 13 e 14, também foram coletados 15 mL das soluções dos Erlenmeyers I, II e III, que foram centrifugados a 4000 rpm por 10 minutos para obtenção do pellet bacteriano. Os pellets foram ressuspensos em 200 mL de água deionizada e submetidos ao sonificador ultrassônica (Ultronique) por 420 segundos a 95% da potência, com o objetivo de romper a parede celular bacteriana e liberar as nanopartículas associadas às células.

Após o processo de ultrassom, uma amostra da suspensão foi transferida para tubos Falcon de 15 mL, seguida de centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos. Do sobrenadante obtido, foram aplicados 100 μ L nos seguintes tratamentos:

- Tratamento 12: nanopartículas provenientes do sistema Zn
- Tratamento 13: nanopartículas provenientes do sistema Cu
- Tratamento 14: nanopartículas provenientes do compósito Zn + Cu

Para cada tratamento foram cultivados 30 tubos, sendo 12 utilizados nas avaliações experimentais.

2.5 Atividade bacteriana

A viabilidade da bactéria *G. diazotrophicus* foi verificada logo após o período recomendado para a síntese das nanopartículas (72h) em 5 concentrações diferentes de solução de síntese (0,02 mmol.L⁻¹, 0,2 mmol.L⁻¹, 2 mmol.L⁻¹, 20 mmol.L⁻¹ e 200 mmol.L⁻¹). Utilizando a técnica de espalhamento em superfície, 50 µL da solução de síntese foram aplicados e espalhados uniformemente com alça de Drigalski em 3 placas de petri para cada concentração contendo o mesmo caldo nutriente utilizado na reativação e multiplicação. As placas foram vedadas com plástico filme e acondicionados em BOD com ambiente controlado com temperatura de 26 ± 2 °C por 24 horas para posterior avaliação do crescimento.

2.6 Espectroscopia Eletrônica UV-Visível

Para as análises de Espectroscopia Eletrônica UV-visível (UV-vis) foram coletados 5 ml da solução de síntese após 72 horas. Foi efetuada a leitura da solução de síntese completa (Caldo nutriente, bactéria e sal de síntese), do sobrenadante após centrifugado por 10 minutos a 4000 rpm e do pellet bacteriano tratado em sonicador ultrassônico (Ultronique) por 420 segundos com 95% da potência total para dispersão das nanopartículas das células bacterianas. O propósito da obtenção da curva de absorção nas três etapas mencionadas é observar o comportamento da bactéria em relação ao local de síntese das nanopartículas, que pode acontecer no interior da célula bacteriana (intracelular) ou na parte externa, no meio ou aderidas a superfície da bactéria (extracelular). Além disso foram feitas leituras do meio MS com sal de síntese durante 60 dias e do caldo nutriente com sal de síntese por 5 dias com intuito de verificar alguma possível interação dos componentes dos meios com o sal de síntese.

A leitura de UV-vis foi realizada em aparelho Espectrofotômetro Elisa MULTiskan GO (Thermo Fisher Scientific) e processados no programa SkanIt Software 5.0 for Microplate Readers RE versão 5.0.0.42.34-135 no LCT/ LABIMP da UFLA.

2.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram conduzidas no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME) no setor de Fitopatologia

da Universidade Federal de Lavras e as amostras foram preparadas de acordo com a metodologia descrita por Alves e Perina (2012). A suspensão bacteriana foi colocada em uma lâmina circular contendo cola de Poli-L-lisina na parte superior, dentro de placas de petri, por aproximadamente 15 minutos. Após esse período, foi adicionado o fixador Karnovsky modificado até cobrir as amostras e elas foram armazenadas em geladeira por 24 horas. Posteriormente, foram submetidas à pós-fixação com tetróxido de ósmio, em seguida a desidratação com acetona (25, 50, 75, 90 e 100 %), secagem ao ponto crítico e montagem dos stubs. As lâminas foram aderidas em stubs envolvidos com papel-alumínio por meio de uma fita dupla face e colocado em banho de carbono em aparelho evaporador de carbono (Bal-Tec). As imagens foram observadas no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) LEO EVO 040 XVP para avaliação da morfologia da bactéria bem como a possível presença de nanopartículas.

2.8 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As análises de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foram conduzidas no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME) no setor de Fitopatologia da UFLA e as amostras foram preparadas de acordo com a metodologia descrita por Alves et al., 2004. A suspensão bacteriana foi colocada em Eppendorf e centrifugada a 6000 rpm por 5 minutos, sendo resuspendido o pellet duas vezes em água destilada para lavar. Após esse processo, a suspensão foi centrifugada novamente por mais 2 minutos. A água foi jogada fora e foi adicionada solução de agarose a 2% quente e centrifugada mais uma vez por 2 minutos. Após solidificado, os blocos foram cortados (aprox. 1 mm) e foram adicionados em solução fixadora Karnovsky modificada e armazenados por 24 horas. Depois desse período, o fixador foi retirado e as amostras foram lavadas com água destilada durante 15 minutos por duas vezes. Retirada a água, foi adicionada solução de acetato de uranila e armazenada em geladeira por 24 horas. Após esse período, foi retirado o acetato de uranila e as amostras foram lavadas como anteriormente. Na etapa seguinte, as amostras foram fixadas com tetróxido de ósmio 1% por uma hora. Em seguida foi feita a desidratação onde as amostras foram submetidas a soluções crescentes de acetona (25, 50, 75, 90 e 100 %), e permanecendo por 10 minutos em cada, sendo passada 3 vezes na solução de 100%. O passo seguinte foi incluir as amostras em gradiente crescente de resina Spurr/acetona. 30% resina/acetona por 8 horas, 70% resina/acetona por 12 horas e 100% resina por 24 horas. Após esse

período, foi retirada a resina 100%, as amostras foram colocadas e organizadas em formas de silicone e novamente cobertas com resina 100% e levadas para estufa (50 – 70 °C) por 48 horas para polimerização. Retiradas da estufa as amostras foram desbastadas (toilette ou trimming) com o auxílio de lâminas de barbear para retirar o excesso de resina e formar uma mesa de corte de formato trapezoidal com base de no máximo 1,5 mm. Em seguida foram obtidos os cortes semifinos (1-2 μm), para verificar por meio de coloração com azul de toluidina se a fixação estava adequada e se o material de interesse estava presente. Por fim, foram obtidos os cortes ultrafinos utilizando navalhas de vidro presas ao ultramicrotomo (Reichert-Jung Ultracut) para observação no MET Zeiss EM 109 para a visualização da ultraestrutura celular da bactéria.

2.9 Análises de pigmentos fotossintéticos

Para a análise foram utilizados 0,05 g de material vegetal fresco, que, em seguida foram colocados em tubos de ensaio contendo 10 mL de acetona 80% para extração dos pigmentos. Os tubos foram envoltos por papel-alumínio para evitar o contato da amostra com a luz, evitando a degradação da clorofila. Após 24 horas em geladeira, foi mensurado a absorvidade das amostras em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 470, 645, 652 e 663 nm (Scopel; Barbosa; Vieira, 2011). A análise foi realizada em triplicata com quatro repetições biológicas por tratamento, sendo três repetições técnicas para cada repetição biológica. As equações utilizadas no cálculo da clorofila total e de carotenoides foram as propostas por Li, Tang e Xu (2013).

2.10 Análises Fitotécnicas

Para tal, foram avaliados após 75 dias o comprimento de parte aérea (cm), comprimento de raiz (cm), massa seca (g) e teor de nutrientes Zn e Cu (ppm). Para as análises foram utilizadas 12 amostras biológicas. Para as mensurações de comprimento de parte aérea, comprimento de raízes foi utilizada uma régua, e para análise de massa seca foi utilizada balança analítica de precisão, e em seguida, as plantas foram levadas para a estufa de circulação forçada de ar à temperatura de 40 °C até peso constante.

Em seguida, as amostras secas, contendo parte aérea e raiz, foram trituradas e analisadas por meio de um espectrômetro portátil de fluorescência de raio X (pXRF) Tracer 5 g (Bruker Analytical

Instrumentation, Billerica, MA, EUA) para avaliação do teor de nutrientes zinco e cobre (ppm). Este modelo pXRF contém um tubo de raios X de ródio de 50 keV e 100 μ A. As amostras foram escaneadas em triplicata, com 60 s por escaneamento, utilizando o modo planta por meio do software Geochem integrado (730.0225).

2.11 Delineamento Experimental e Análise Estatística

O delineamento foi inteiramente casualizado, constituído de quatorze tratamentos, sendo cinco tratamentos controle (1- controle 0, 2- controle bactéria, 3- controle Zn, 4 - controle Cu e 5 - controle Zn/Cu), três contendo caldo nutriente (CN), bactéria (Bac) e NPs (completo), três contendo bactéria e NPs (pellet bacteriano) e três contendo apenas NPs. Os dados foram submetidos à análise de variância e, posteriormente, ao teste de Tukey à 5% de probabilidade por meio do software Speed.stat 3.4 (Carvalho *et al.* 2020). A normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias foram verificadas para todas as variáveis analisadas. Para dados paramétricos, foi realizada uma análise de variância de uma via, seguida pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Para dados não paramétricos, foi utilizada a transformação de postos e, em seguida, o teste de Tukey foi aplicado aos dados transformados. Para realização das análises estatísticas os tratamentos foram agrupados em três grupos distintos (Quadro 1) levando em consideração o sal utilizado, sendo:

Quadro 1: Divisão dos tratamentos em grupos de acordo com o sal utilizado.

Grupo 1 (Zn)	Grupo 2 (Cu)	Grupo 3 (Zn/Cu)
TRATAMENTOS		
1 – Controle 0	1 – Controle 0	1 – Controle 0
2 – Controle Bactéria	2 – Controle Bactéria	2 – Controle Bactéria
3 – Controle Sal de Zn	4 – Controle Sal de Cu	5 – Controle Sal de Zn/Cu
6 – Completo (CN+Bac+NPs)	7 - Completo (CN+Bac+NPs)	8 - Completo (CN+Bac+NPs)
9 – Pellet bacteriano + NPs	10 - Pellet bacteriano + NPs	11 - Pellet bacteriano + NPs
12 – NPs Zn	13 - NPs Cu	14 - NPs Zn/Cu

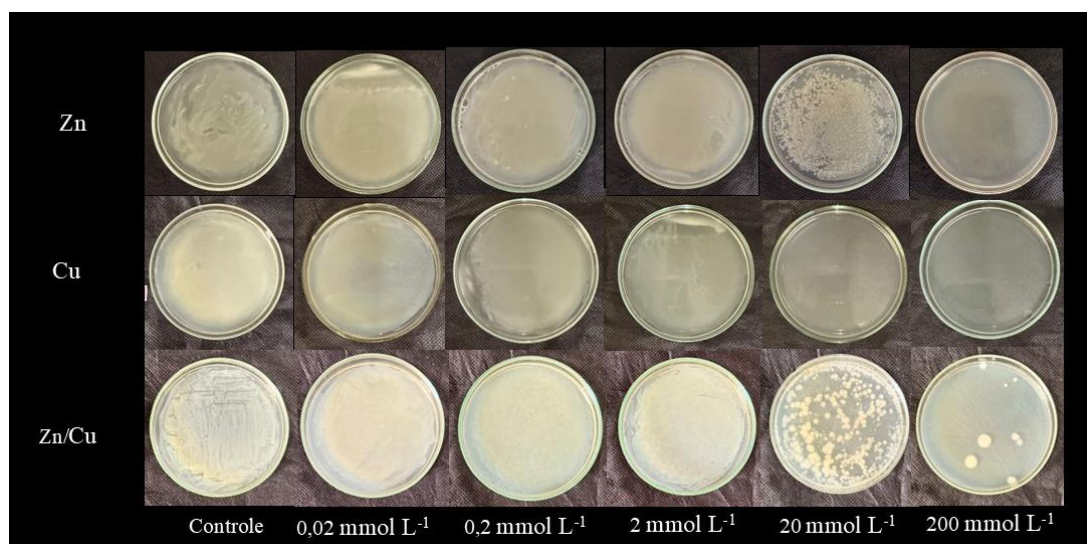
Legenda: Controle 0: explante em meio MS; Controle Bactéria: explante em meio MS + Bactéria; Controle Sal de Zn: explante em meio MS + solução estoque de ZnSO_4 ; Controle Sal de Cu: explante em meio MS + solução estoque de CuSO_4 ; Controle Sal de Zn/Cu: explante em meio MS + solução estoque de $\text{ZnSO}_4/\text{CuSO}_4$; Completo: Caldo nutriente (CN) + bactéria + NPs.

3 RESULTADOS

3.1 Atividade Bacteriana

A Figura 7 apresenta o crescimento da bactéria *G. diazotrophicus* nas diferentes concentrações de Zn, Cu e Zn/Cu. Até a concentração de 2 mmol L⁻¹, foi visto que o crescimento bacteriano após 24 horas ocorreu da forma esperada, as colônias ocuparam a placa de petri de forma integral e não foi visto isolamento de colônias. O crescimento da bactéria mostrou-se satisfatório em todos os casos na concentração de referência (2 mmol L⁻¹), demonstrando a viabilidade do microrganismo para a realização da biossíntese e para a aplicação nos tratamentos. Na faixa acima de 2 mmol L⁻¹ até a concentração de 20 mmol L⁻¹, para ZnSO₄, foi notado impacto negativo no crescimento bacteriano, pois nessa última concentração foi vista que, morfológicamente, as colônias se organizaram em agrupamentos claramente visíveis. Concentrações de 20 e 200 mmol L⁻¹ de CuSO₄ inibiram completamente o crescimento bacteriano. Em relação a Zn/Cu, concentrações de 10 e 100 mmol L⁻¹ de ZnSO₄ e CuSO₄ (equivalente final a 20 e 200 mmol L⁻¹) tiveram impacto negativo no crescimento bacteriano visto que, morfológicamente, as colônias se organizaram em agrupamentos.

Figure 7. Técnica de espalhamento em superfície da bactéria *G. diazotrophicus* exposta a concentrações de ZnSO₄, CuSO₄ e ZnSO₄/CuSO₄.



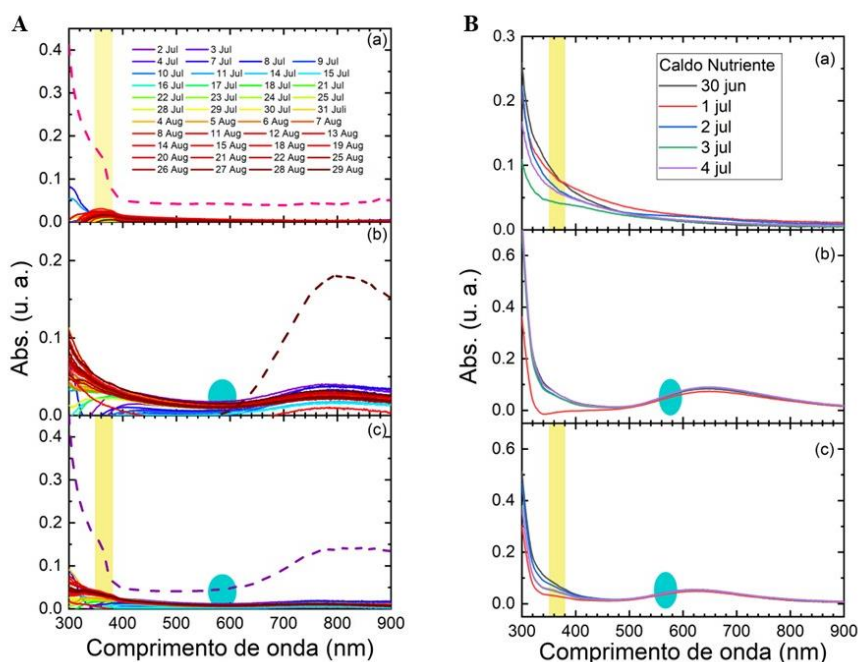
Legenda: *G. diazotrophicus* exposta a concentrações de ZnSO₄, CuSO₄ (A) *G. diazotrophicus* exposta a diferentes concentrações de solução de sulfato de Zn. (B) *G. diazotrophicus* exposta a diferentes concentrações de solução de sulfato de Cu. (C) *G. diazotrophicus* exposta a diferentes concentrações do composto Zn/Cu.

Fonte: Do autor (2026)

3.2 Espectroscopia Eletrônica UV-visível

As propriedades óticas do meio MS e do caldo nutriente acrescidos com o sal de síntese de Zn, Cu e do composto Zn/Cu, foram coletadas para avaliação de possível síntese pelos componentes dos meios por meio da curva de absorção UV-vis. Foram avaliados o comportamento do meio MS durante o período de 60 dias e do caldo nutriente por 5 dias iniciando a verificação após o período de 72 horas (período de síntese). As figuras 8A e 8B demonstram o comportamento de não formação de nanopartículas pelo meio MS e pelo caldo nutriente visto que não se verificou picos bem definidos nos comprimentos de onda 350 a 380 nm (amarelo) que fazem referência a nanopartículas de ZnO e entre 560 e 600 nm (azul) que faz referência a nanopartículas de CuO. Essa constatação demonstra a viabilidade da utilização dos dois meios no experimento pois não interferem no processo de síntese, apenas no crescimento do explante e da bactéria, respectivamente.

Figure 8. Espectro de absorbância (UV-vis) do meio MS e do caldo nutriente para verificação de síntese de nanopartículas pelos componentes dos meios.



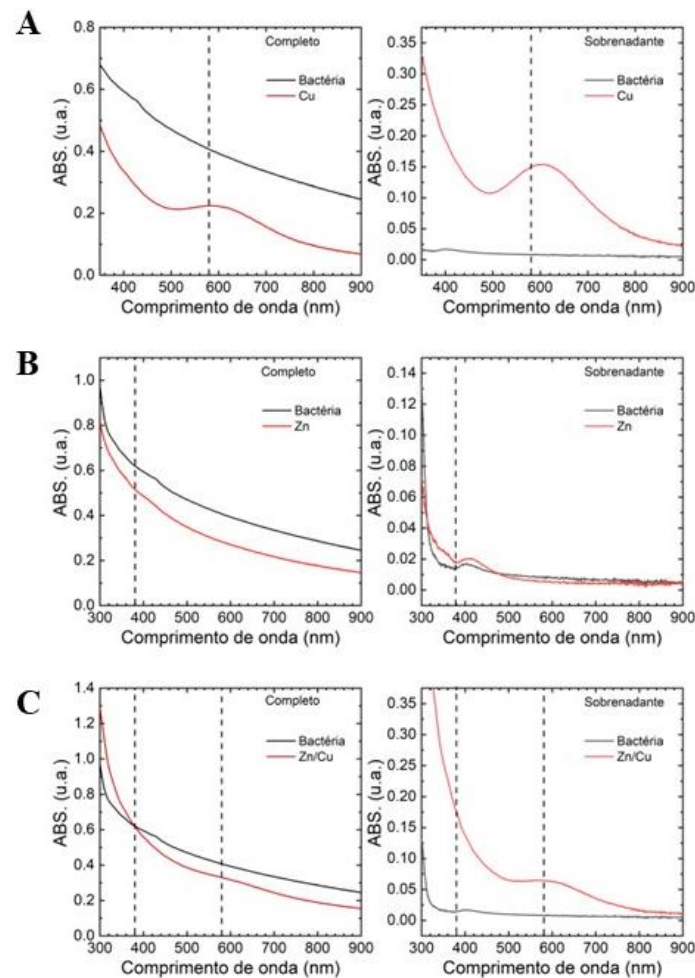
Legenda: (A) Meio MS + sal de Zn (a), meio MS + sal de Cu (b), meio MS + sal de Zn/Cu (c). Linhas pontilhadas fazem referência a solução estoque (sal + água). (B) Caldo nutriente + sal de Zn (a), caldo nutriente + sal de Cu (b), caldo nutriente + sal de Zn/Cu (c). Áreas em amarelo indicam comprimento de onda entre 350 e 380 nm e áreas em azul indicam comprimento de onda de 580 nm a 600 nm.

Fonte: Do autor (2026)

Após o período de síntese, as amostras contendo material biológico e os sais de Zn, Cu e do composto foram avaliadas por meio da curva de absorção UV-vis. A figura 9A mostra a leitura da solução de síntese completa e do sobrenadante contendo sal de Cu (linhas vermelhas) e da solução contendo apenas bactéria (linhas pretas). É possível observar a formação de picos bem definidos e evidentes próximos ao comprimento de onda 580 nm (linhas vermelhas), sugerindo a síntese extracelular e a presença de nanopartículas de CuO no meio. Enquanto as soluções contendo apenas bactéria demonstram um comportamento semelhante quanto ao comprimento de onda, com perfil típico de espalhamento de luz por partículas biológicas, e diferem apenas quanto à turbidez da amostra (linhas pretas). A figura 9B apresenta os espectros de absorção UV-Vis da suspensão bacteriana na presença (linhas vermelhas) e ausência (linhas pretas) de sulfato de zinco. A solução completa exibiu elevada absorbância em toda faixa espectral e perfil decrescente do UV para o visível, comportamento característico do espalhamento de luz em partículas biológicas em suspensão e provavelmente alguns componentes do meio de cultura. Nessa condição não foi possível identificar picos definidos associados ao Zn. O sobrendante apresentou uma redução

considerável do espalhamento, possibilitando avaliar apenas espécies solúveis e coloidais dispersas. As linhas exibiram um perfil espectral semelhante, contínuo e suavemente decrescente. Os picos discretos e semelhantes próximos a 380 e 420 nm podem ser atribuídos à presença de compostos orgânicos extracelulares liberados pelo metabolismo bacteriano que podem ter interagido com o metal disponível. Já a figura 9C, que traz a curva de absorção da solução de síntese completa e do sobrenadante contendo o sal de Zn/Cu (linhas vermelhas) e da solução contendo apenas bactéria (linhas pretas), segue o padrão das amostras que continham os sais individualmente, sendo possível observar, na solução completa, a não formação de picos definidos. Já no sobrenadante, é visível a presença de pico bem definido na região do comprimento de onda 580 nm que faz referência à síntese extracelular de nanopartículas de CuO.

Figure 9. Espectro de absorbância (UV-vis) de material biológico para verificação de síntese de nanopartículas.

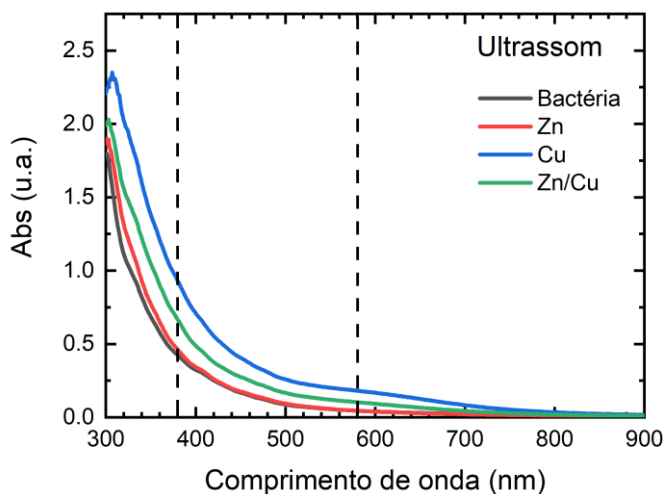


Legenda: (A) Linha vermelha: Caldo nutriente + bactéria + sal de Cu; Linha preta: Caldo nutriente + bactéria. (B) Linha vermelha: Caldo nutriente + bactéria + sal de Zn; Linha preta: Caldo nutriente + bactéria. (C) Linha vermelha: Caldo nutriente + bactéria + sal de Zn/Cu; Linha preta: Caldo nutriente + bactéria. Solução completa: caldo nutriente + bactéria + sal (NPs).

Fonte: Do autor (2026)

As curvas de absorção UV-vis obtidas após o tratamento do pellet bacteriano em sonificador ultrassônico estão representadas na figura 10. As linhas referentes à solução contendo apenas bactéria e à solução contendo bactéria + NPs de Zn (linha preta e vermelha, respectivamente) não apresentaram picos bem definidos. Já as linhas referentes as soluções contendo bactéria + NPs de Cu e bactéria + NPs de Zn/Cu (linhas azul e verde, respectivamente), demonstraram de forma pouco definida, a formação de picos. Essa não formação de picos bem definidos pode ser atribuída ao procedimento para se realizar o ultrassom dos materiais que exige uma diluição do material de interesse (pellet bacteriano) em volumes elevados (200 ml de água).

Figura 10. Espectro de absorvância (UV-vis) – Pellet bacteriano tratado em sonicador ultrassônico (Ultronique) por 420 segundos com 95% da potência total para dispersão das nanopartículas das células bacterianas.



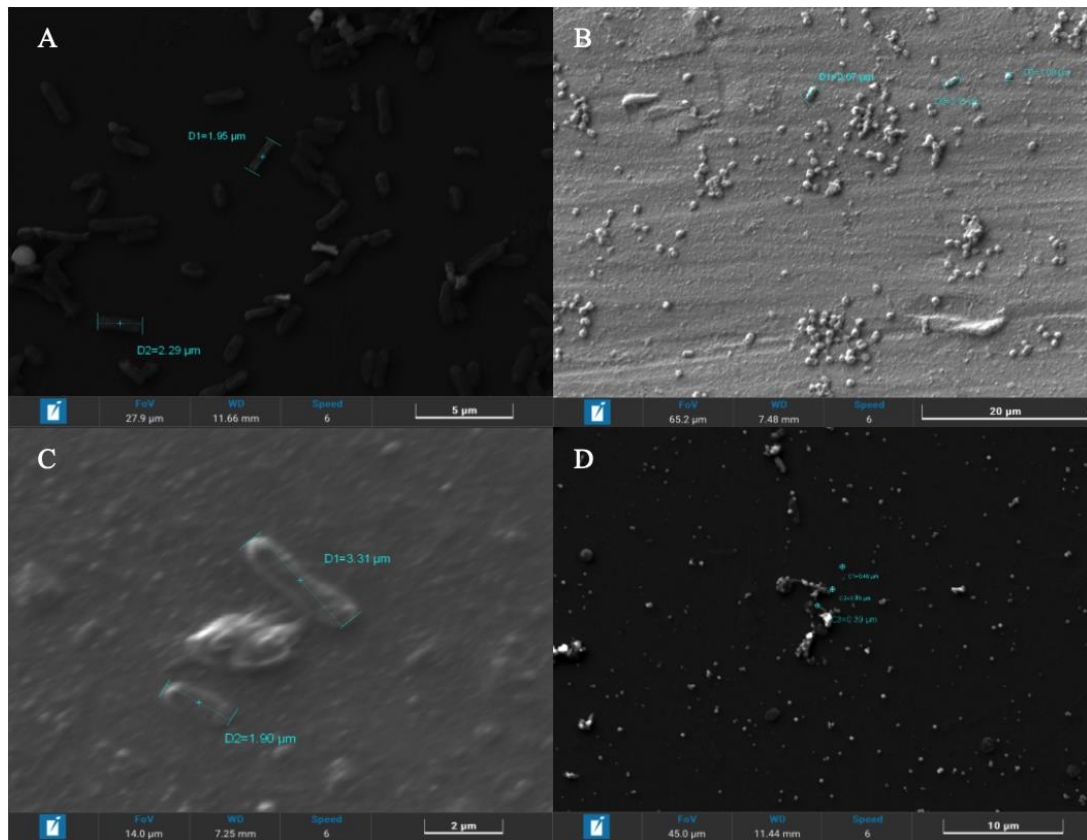
Legenda: Linha preta: solução apenas com bactéria tratada em sonicador; Linha vermelha: solução com bactéria + NPs de Zn tratada em sonicador; Linha azul: solução com bactéria + NPs de Cu tratada em sonicador; Linha verde: solução com bactéria + NPs de Zn/Cu tratada em sonicador.

Fonte: Do autor (2026)

3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As eletromicrografias mostradas na figura 11 apresentam células de *G. diazotrophicus*, com morfologia bacilar típica, tornando possível a visualização sem a presença de estruturas externas a bactéria (Figura 11A). Além da visualização da morfologia da bactéria, é possível observar a presença de estruturas com dimensões inferiores ao redor da bactéria, formando pequenos agregados irregulares que não foram observados no controle, sugerindo a possibilidade da presença de nanopartículas de ZnO e CuO (figura 11B e 11C). Na condição contendo simultaneamente Zn e Cu foi possível observar agregados dispersos no meio e aderidos às células bacterianas, indicando um possível processo de formação desses agregados sobre a bactéria. Contudo, devido a ausência de metalização condutiva das amostras (banho de ouro), não foi possível atingir aproximações acima de 25.00 kx, limitando a ampliação das imagens e dificultando a visualização efetiva e determinação com precisão das estruturas observadas.

Figura 11. Eletromicrografia de varredura de *G. diazotrophicus*



Legenda: (A) *G. diazotrophicus* cultivada em caldo nutriente (aumento de 10.00 kx). (B) *G. diazotrophicus* cultivada em caldo nutriente contendo 2 mmol L⁻¹ de sulfato de zinco (aumento de 4.28 kx). (C) *G. diazotrophicus* cultivada em caldo nutriente contendo 2 mmol L⁻¹ de sulfato de cobre (aumento de 20.00 kx). (D) *G. diazotrophicus* cultivada em caldo nutriente contendo 1 mmol L⁻¹ de sulfato de zinco e 1 mmol L⁻¹ de sulfato de cobre (aumento de 6.20 kx).

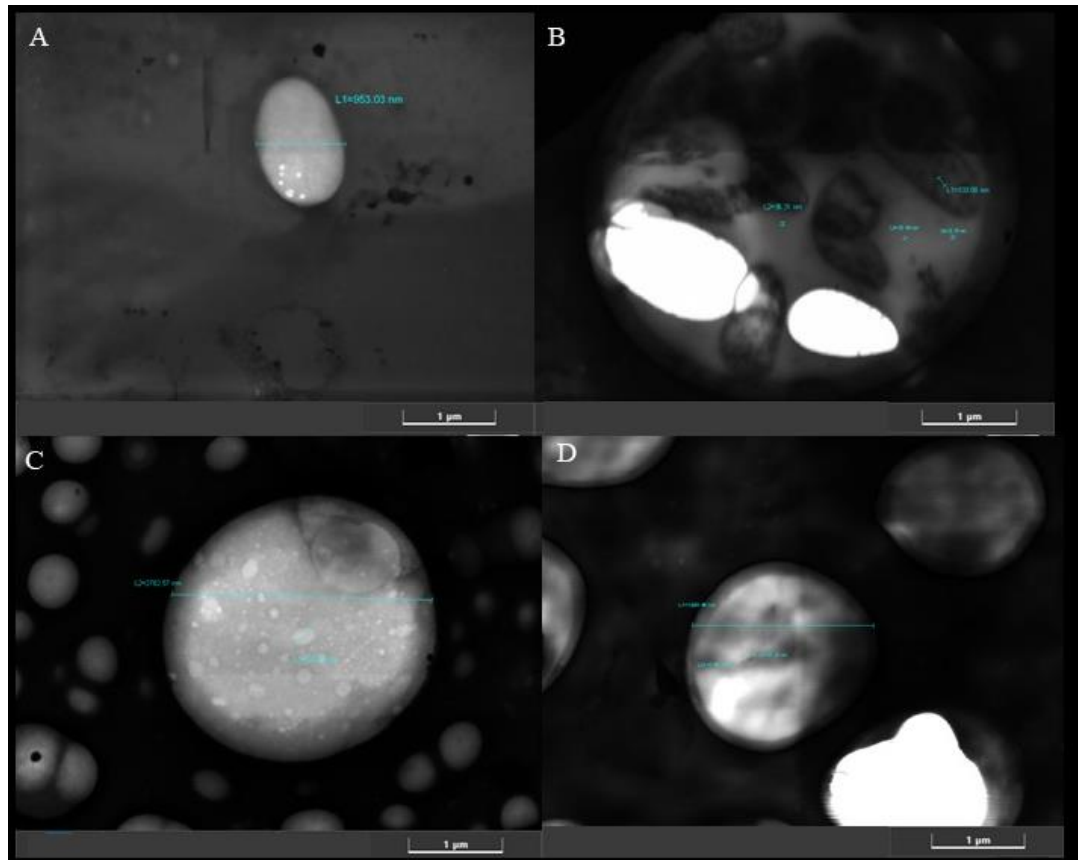
Fonte: Do autor (2026)

3.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As micrografias da figura 12 proporcionaram a visualização da ultraestrutura celular de *G. diazotrophicus*. Foi possível observar células bacterianas íntegras, com citoplasma homogêneo e ausência de estruturas eletrodensas bem definidas (figura 12A). Os mesmos padrões se repetem para as amostras contendo Cu (figura 12C), não sendo observados inclusões intracelulares evidentes, sugerindo que o cobre não se acumule predominantemente no interior das células nas condições avaliadas. Em contraste, nas amostras contendo Zn (Figura 12B e 12D), foram observadas múltiplas estruturas eletrodensas distribuídas no interior das células bacterianas, com dimensões nanométricas e morfologia aproximadamente esférica. A ausência dessas estruturas no

controle e na amostra contendo apenas Cu, sugere que essas formações podem estar associadas a presença de Zn. Considerando a interação previamente evidenciada por UV-vis, tais estruturas podem ser compatíveis com a formação de nanoestruturas contendo Zn.

Figura 12. Análise ultraestrutural de *G. diazotrophicus*, em microscopia eletrônica de transmissão.



Legenda: (A) *G. diazotrophicus* cultivada em caldo nutriente. (B) *G. diazotrophicus* cultivada em caldo nutriente contendo 2 mmol L⁻¹ de sulfato de zinco. (C) *G. diazotrophicus* cultivada em caldo nutriente contendo 2 mmol L⁻¹ de sulfato de cobre. (D) *G. diazotrophicus* cultivada em caldo nutriente contendo 1 mmol L⁻¹ de sulfato de zinco e 1 mmol L⁻¹ de sulfato de cobre.

Fonte: Do autor (2026)

3.5 Análises Fitotécnicas

A figura 13 permite uma avaliação visual do efeito da utilização da bactéria *G. diazotrophicus* em plantas de batata-doce, cultivar Beuaregard, cultivadas *in vitro*, em meio de cultura MS contendo 30 g L⁻¹ de sacarose. A utilização da bactéria afetou negativamente a massa seca das plantas (tabela 1), isso pode ser percebido pela diferença existente entre as plantas que crescerem sem e com a presença da bactéria.

Figura 13. Visualização do efeito da bactéria *G. diazotrophicus* em batata-doce cv. Beuaregard em meio MS com 30 g L⁻¹ de sacarose.



Fonte: Do autor (2026)

Tabela 1. Efeito da bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* na massa seca (g) de batata-doce cv. Beuaregard em meio MS com 30 g L⁻¹ de sacarose.

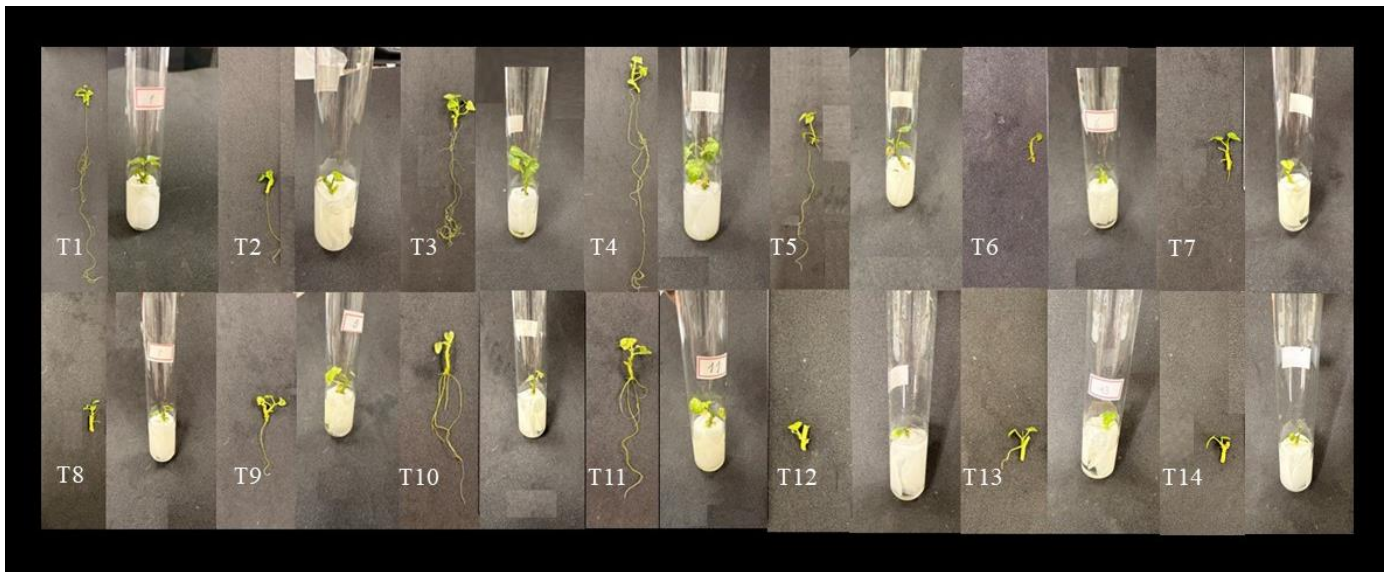
Tratamento	Massa Seca
1. Controle	0,05 ± 0,01 a

2. Bactéria	$0,01 \pm 0 \text{ b}$
C.V. (%)	12,22

* As médias são seguidas pelos erros padrão. Não há evidências suficientes de que as médias seguidas pela mesma letra diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 1 - Controle: explante em meio MS, sem inoculação; 2 – Bac: explante em meio MS inoculado com bactéria.

A figura 14 permite uma avaliação visual do efeito dos tratamentos em plantas de batata-doce cultivar Beuaregard cultivadas *in vitro*, em meio de cultura MS contendo 20 g L^{-1} de sacarose. A utilização da bactéria permaneceu impactando negativamente o desenvolvimento da cultura *in vitro*.

Figura 14. Visualização do efeito da bactéria *G. diazotrophicus* e de nanopartículas de Zn, Cu e do composto Zn/Cu em batata-doce cv. Beuaregard em meio MS com 20 g L^{-1} de sacarose.



Fonte: Do autor (2026)

3.5.1 Comprimento de parte aérea (CPA)

O comprimento da parte aérea foi afetado negativamente por todos os tratamentos em relação aos controles 1, 3, 4 e 5. Nos grupos 2 e 3, além dos tratamentos, o controle 2, com a inoculação da bactéria, também apresentou efeito negativo no crescimento da parte aérea em relação aos controles 1, 3, 4 e 5.

3.5.2 Comprimento de raiz (CR) e Massa seca (g)

Todos os tratamentos além do controle 2 apresentaram diferença significativa em relação aos controles 1, 3, 4 e 5, afetando o comprimento de raiz de forma negativa. Isso pode ter ocorrido devido a competição entre a bactéria e o explante por nutrientes ou mesmo um estresse que pode ter levado a bactéria a parasitar o explante. Para a massa seca o padrão encontrado no comprimento de raiz se repete.

3.5.3 Teor de nutrientes Zn e Cu (ppm)

Para o teor de nutrientes foi possível observar que a absorção de Zn e Cu não diferiu estatisticamente nos tratamentos 6, 7 e 8 (8 em relação ao Zn) quando comparados aos controles 3, 4 e 5. Isso pode ter ocorrido devido ao conteúdo do caldo nutriente aplicado, além do volume de nanopartículas contidas nos tratamentos, fato que pode ter favorecido o crescimento do explante, mesmo na presença da bactéria. Os tratamentos 9, 10, 12 e 13, se igualaram estatisticamente ao controle 2 e diferiram estatisticamente dos controles 3 e 4, não surtindo o efeito positivo esperado. O tratamento 14 (235,33 ppm), contendo apenas ZnONPs foi estatisticamente igual ao controle 5. Em relação ao cobre, o controle 5 apresentou maior média de concentração em relação ao tratamento 14.

3.6 Análises de pigmentos fotossintéticos

Os teores de clorofila total e carotenoides não foram influenciados positivamente pelos tratamentos. Contudo, em relação à clorofila total, os tratamentos 6, 10, 11, 12 e 14 não diferiram significativamente em relação aos controles 1, 2, 3, 4 e 5. No que se refere ao teor de carotenóides, vale destacar que os tratamentos 6, 8, 10, 11, 13 e 14 não apresentaram diferença significativa em relação aos controles.

A tabela 2 mostra os comprimentos de parte aérea (CPA), comprimento de raiz (CR), massa seca (MS), clorofila total, carotenoides e teores de Zn e Cu em todos os tratamentos, dispostos em seus respectivos grupos.

Tabela 2. Efeito da bactéria *G. diazotrophicus* e de nanopartículas de Zn, Cu e do composto Zn/Cu no comprimento de parte aérea e raiz, massa seca, clorofila total, carotenóides e teores de Zn e Cu em batata-doce cv. Beuaregard.

	Tratamentos	CPA (cm)	CR (cm)	Massa Seca (g)	Clorofila Total (mg g ⁻¹)	Carotenoides (mg g ⁻¹)	Teor de Zn (ppm)	Teor de Cu (ppm)
Grupo 1	1 - Controle	2,57 ± 0,17 a	18,02 ± 2,10 a	0,019 ± 0 ab	0,23 ± 0,098 a	0,04 ± 0,02 ab	281,33 ± 36,96 ab	-
	2 - Bac	1,23 ± 0,10 c	3,35 ± 1,05 bc	0,009 ± 0 cd	0,11 ± 0,01 ab	0,02 ± 0 ab	181,67 ± 13,69 b	-
	3 - Zn	2,47 ± 0,23 a	15,34 ± 2,41 a	0,021 ± 0 a	0,24 ± 0,06 a	0,05 ± 0,01 a	333,00 ± 18,77 a	-
	6 - Completo	0,9 ± 0,33 c	5,9 ± 1,16 b	0,017 ± 0 d	0,11 ± 0,01 ab	0,05 ± 0,01 ab	283,00 ± 22,01 ab	-
	9 - Pellet Bac	1,89 ± 0,13 ab	0,57 ± 0,32 c	0,008 ± 0 bc	0,03 ± 0,004 b	0,01 ± 0 b	176,67 ± 24,64 b	-
	12 - Zn NPs	1,3 ± 0,15 bc	1,9 ± 0,55 bc	0,009 ± 0 cd	0,09 ± 0,03 ab	0,01 ± 0 b	188,33 ± 9,21 b	-
	C.V. (%)	16,9	50,8	35,9	40,77	55,72	16,32	-
Grupo 2	1 - Controle	2,57 ± 0,17 ab	19,46 ± 2,10 a	0,019 ± 0 ab	0,23 ± 0,098 ab	0,04 ± 0,02 ab	-	8,67 ± 1,86 b
	2 - Bac	1,23 ± 0,10 cd	3,35 ± 1,05 bc	0,009 ± 0 d	0,11 ± 0,01 b	0,02 ± 0 ab	-	5,67 ± 0,33 b
	4 - Cu	3,2 ± 0,19 a	18,66 ± 1,65 a	0,025 ± 0 a	0,59 ± 0,17 a	0,09 ± 0,03 a	-	31 ± 2,08 a
	7 - Completo	1,91 ± 0,26 bc	1,63 ± 0,41 c	0,015 ± 0 bc	0,12 ± 0,06 b	0,01 ± 0 b	-	34,67 ± 1,76 a
	10 - Pellet Bac	1,38 ± 0,19 cd	5,4 ± 0,86 b	0,012 ± 0 cd	0,19 ± 0,06 ab	0,04 ± 0 ab	-	7,67 ± 0,33 b
	13 - Cu NPs	1,01 ± 0,11 d	1,86 ± 0,68 c	0,01 ± 0 d	0,02 ± 0,002 b	0,02 ± 0 ab	-	11,33 ± 1,2 b
	C.V. (%)	26,8	31,82	17,25	35,08	38,61	-	15,19
Grupo 3	1 - Controle	2,57 ± 0,17 a	19,46 ± 2,10 a	0,019 ± 0 ab	0,23 ± 0,098 ab	0,04 ± 0,02 a	281,33 ± 36,96 a	8,67 ± 1,86 c
	2 - Bac	1,23 ± 0,10 b	3,35 ± 1,05 bc	0,009 ± 0 c	0,11 ± 0,01 ab	0,02 ± 0 a	181,67 ± 13,69 b	5,67 ± 0,33 c
	5 - Zn/Cu	2,55 ± 0,20 a	14,98 ± 2,36 a	0,021 ± 0 a	0,49 ± 0,19 a	0,06 ± 0,04 a	207 ± 9,61 ab	25,00 ± 2,52 a
	8 - Completo	1,23 ± 0,12 b	1,42 ± 0,63 c	0,011 ± 0 c	0,03 ± 0,003 b	0,01 ± 0 a	199,33 ± 10,41 ab	16,33 ± 0,67 b
	11 - Pellet Bac	1,68 ± 0,19 b	5,68 ± 1,08 b	0,013 ± 0 bc	0,37 ± 0,11 a	0,04 ± 0,02 a	197,33 ± 5,78 ab	6,00 ± 0,58 c
	14 - Zn/Cu NPs	1,32 ± 0,17 b	3,72 ± 1,17 bc	0,013 ± 0 bc	0,18 ± 0,05 ab	0,01 ± 0,01 a	235,33 ± 10,87 ab	8,00 ± 1,15 c
	C.V. (%)	31,65	40,47	13,29	33,53	53,51	2,41	21,1

* As médias são seguidas pelos erros padrão. Não há evidências suficientes de que as médias seguidas pela mesma letra diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Grupo 1: controle e tratamentos contendo Zn; Grupo 2: controle e tratamentos contendo Cu; Grupo 3: controle e tratamentos contendo Zn/Cu - Controle: explante em meio MS, sem inoculação; 2 – Bac: explante em meio MS inoculado com bactéria; 3 – Zn: explante em meio MS inoculado com solução estoque de ZnSO₄; 4 – Cu: explante em meio MS inoculado com solução estoque de CuSO₄; 5 – Zn/Cu: explante em meio MS inoculado com solução estoque de ZnSO₄ e CuSO₄; 6, 7 e 8 – Completo: explante em meio MS inoculado com solução completa (caldo nutriente + bactéria + NPs); 9, 10 e 11 – Pellet Bac: explante em meio MS inoculado com pellet bacteriano + NPs; 12, 13 e 14 - explante em meio MS inoculado com NPs.

4 DISCUSSÃO

Microrganismos são capazes de interagir com as plantas e seus sistemas de várias formas, permitindo o estabelecimento de relações com seus hospedeiros e com o ambiente, sejam elas benéficas, patogênicas ou neutras (Elnahal *et al.* 2022). Isolada pela primeira vez na cultura da cana-de-açúcar por Cavalcante e Dobereiner (Cavalcante; Dobereiner, 1988), a bactéria *G. diazotrophicus* é reconhecida como promotora de crescimento vegetal devido às suas capacidades intrínsecas de fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fósforo e produção de fitormônios (Ceballos-Aguirre *et al.* 2025). O crescimento e o desenvolvimento de uma bactéria promotora de crescimento dependem de sua capacidade de resistência e adaptação a ambientes e condições de estresse (Moreira *et al.* 2025).

A bactéria demonstrou crescimento satisfatório em todos os casos em que foi utilizada no experimento concentração de 2 mmol L⁻¹. Moreira et al. (2025), avaliaram o impacto do Zn no crescimento e na viabilidade celular de *G. diazotrophicus* Pal 5 nas concentrações de 2,5; 3,0; 3,5 e 4,0 mM de ZnCl₂ e compararam o resultado com o cultivo da bactéria sem adição do sal, no tempo de 12 horas. O crescimento foi inibido em todas as concentrações em relação ao controle sem o sal, com redução de 51% a 2,5 mM. Os mesmos autores revelaram que o Zn diminuiu a viabilidade celular da bactéria em aproximadamente 20% a 4,5 mM. No que se refere à atividade bacteriana, a concentração dos sais de síntese utilizada nesse experimento foi satisfatória. Ficou evidente também que a progressão da concentração do sal de Zn inibiu o crescimento bacteriano. Teores elevados de Zn tiveram um efeito menor na viabilidade quando comparados ao crescimento, ativando mecanismos de resistência para manter a viabilidade celular nessas condições (Moreira *et al.* 2025).

Intorne et al. (2012) demonstraram evidências de alta tolerância de *G. diazotrophicus* Pal 5 a metais pesados como Cádmio, Cobalto e Zn. Almeida et al. (2017) verificaram a presença de bactérias do gênero *Gluconacetobacter* (cerca de 77%) em consórcio bacteriano resistente a Cu obtidos de rizosedimento de *Phragmites australis* exposto a concentrações de Cu. O efeito antimicrobiano do Cu para vários microrganismos é conhecido, sobretudo, estudos sobre a tolerância e concentrações mínimas inibitória de Cu em *G. diazotrophicus* Pal 5 são escassos, explicitando a necessidade de mais pesquisas para compreender melhor essa relação.

Com isso, fica claro que os sais, como fatores de estresse, desaceleram o crescimento bacteriano e podem interferir no tamanho e na morfologia das colônias, tanto pela quantidade quanto pela interação, como observado nas concentrações acima de 2 mmol L⁻¹. Os sais em alta concentração podem penetrar de forma eficiente os exopolissacarídeos que constituem a matriz da colônia bacteriana, interferindo no mecanismo de comunicação das células bacterianas (quorum-sensing), dificultando a comunicação entre elas, inibindo e alterando seu crescimento (Lahiri *et al.* 2021). Ceriotti *et al.* (2022) evidenciaram a importância da morfologia das colônias bacterianas em vários processos ecológicos, além de expor os principais fatores que controlam a dinâmica da expansão das colônias e a morfologia resultante. Entre esses fatores, os autores mencionam a distribuição espacial de nutrientes, o efeito da disponibilidade limitada ou do excesso de nutrientes além do processo de difusão e absorção de nutrientes. Proteínas envolvidas no metabolismo da parede celular de *G. diazotrophicus* Pal 5, que estão envolvidas na exportação de lipopolissacarídeos e lipídios, foram reguladas em resposta ao estresse por excesso de Zn, apresentando acúmulo reduzido (Moreira *et al.* 2025).

O potencial biotecnológico das bactérias endofíticas em várias áreas ainda é desconhecido. A interação entre microrganismos e nanotecnologia pode ocorrer por meio da biossíntese ou síntese verde de nanopartículas. As bactérias são um dos agentes mais eficientes utilizados na síntese verde de NPs. Diversas biomoléculas produzidas por bactérias, como enzimas, proteínas, polissacarídeos flavonoides, fenóis e alcaloides podem atuar como agentes redutores e produzir as NPs (Akdaşçı *et al.* 2025; Couto Junior *et al.* 2025).

A bactéria *G. diazotrophicus* Pal 5 demonstrou potencial para realização da síntese de nanopartículas de ZnO e CuO. As propriedades ópticas da amostra contendo sulfato de cobre mostraram a formação de CuNPs extracelular na faixa de comprimento de onda entre 560 e 600 nm. Bactérias, quando mantidas em ambientes com quantidades elevadas de metais tóxicos, produzem substâncias em resposta ao estresse oxidativo que funcionam como agentes redutores e estabilizadores na produção de nanopartículas, convertendo íons metálicos em formas menos tóxicas (Chakraborty *et al.* 2022). Utilizando *Streptomyces griseus* para a biossíntese de CuONPs Ponmurugan *et al.* (2016) confirmaram a presença de nanopartículas utilizando espectroscopia UV-Vis em comprimento de onda de 592 nm. A espécie *S. capillispiralis* Ca-1, isolada de *Convolvulus arvensis* foi utilizada para sintetizar CuONPs e a confirmação da biossíntese foi feita por observação de um pico de absorção por espectroscopia UV-Vis em comprimento de onda de 600

nm (Saad *et al.* 2018). Trabalhos esses que confirmam os resultados encontrados no presente trabalho quanto à biossíntese de CuONPs mediada pela bactéria *G. diazotrophicus* Pal 5. Saad *et al.* (2018) explicam ainda que o pico de absorção depende diretamente do tamanho e da estabilidade das nanopartículas.

A biossíntese de nanopartículas oferece uma alternativa sustentável e economicamente viável para a produção de nanopartículas de metais e óxidos metálicos (El Ouardy *et al.* 2026). A utilização de bactérias na biossíntese de NPs é vantajosa em relação a outros microrganismos, pois seu cultivo pode ser viabilizado em condições artificiais, pelo fato de serem tolerantes e se adaptarem em concentrações elevadas de metais além de possuírem potencial de reduzir materiais inorgânicos em NPs por vias intra e extracelulares (Koul *et al.* 2021). Para comprovar a existência e caracterizar as propriedades atômicas, estruturais e químicas das nanopartículas biossintetizadas são utilizadas diferentes técnicas que determinam a forma, o tamanho, o comportamento morfológico e as características exatas das nanopartículas (Arora; Manchanda; Gupta; 2026).

Na biossíntese realizada no presente trabalho, o espectro UV-Vis de ZnONPs não exibiu pico de ressonância plasmônica de superfície em torno de 350 e 380 nm, região característica de ZnONPs. O que normalmente se detecta no UV-Vis são nanopartículas de óxido de zinco (ZnO), pois o zinco metálico (Zn) possui alta reatividade, formando facilmente ZnO. A não formação de pico na região de comprimento de onda esperado pode se justificar pela não conversão de Zn em ZnO, pela formação de agregados que podem formar nanopartículas grandes que perdem o efeito quântico ou pela região de formação, nesse caso internamente as células bacterianas. A dispersão das nanopartículas, considerando a oscilação coletiva dos elétrons da superfície, resulta em picos que podem fornecer evidências sobre o tamanho e a forma das nanopartículas (Arif; Raza; Akhter; 2024). Mohammadian, Es'haghi e Hooshmand (2018) citam a relação existente entre o pico de absorção e o tamanho das nanopartículas, sendo o espectro de absorção uma função do comprimento de onda e do tamanho das nanopartículas. Os mesmos autores demonstram essa relação entre o tamanho da nanopartícula e a energia de absorção óptica, com base em uma aproximação de massa efetiva, com a expressão teórica da equação de Brus. A formação de nanopartículas é extremamente dependente do tipo de microrganismo e das suas condições de crescimento (Eweis *et al.* 2024; Swain; Mishra; Sahoo; 2025). Saravana *et al.* (2018) sintetizaram nanopartículas de ZnO utilizando *Bacillus megaterium*. Utilizando cinco cepas de *Streptomyces spp*, Rajivgandhi *et al.* (2022) conseguiram sintetizar nanopartículas de ZnO apenas com três. Fica

evidente a variabilidade existente de microrganismos capazes de biossintetizar nanopartículas e suas especificidades quanto às condições de crescimento e produção de metabólitos responsáveis pela biossíntese. Os resultados obtidos em relação ao espectro UV-Vis do compósito foi semelhante as avaliações individuais de Zn e Cu.

As amostras foram avaliadas em microscopia eletrônica de varredura (MEV) com o objetivo de buscar possíveis alterações morfológicas celulares e a presença de estruturas nanométricas após a exposição da bactéria aos metais. Pallucchini *et al.* (2024) demonstraram que a bactéria *G. diazotrophicus*, de forma epifítica, pode se organizar em biofilme enquanto exibe morfologia em bastonete quando colonizam o meio intracelular (endofítica), demonstrando alterações em seu comportamento em ambientes diferentes. ZnONPs biossintetizadas por *Enterococcus hirae* apresentaram tamanho uniforme, predominantemente esférico e mínimo de aglomeração. Já o compósito ZnO/CuO biossintetizado pela mesma bactéria apresentou morfologia e agregações variadas, sugerindo que a presença de CuONPs afeta a nucleação e a incorporação das nanopartículas (Jalal; Salih; Hassan; 2026). Análises de MEV de CuONPs biossintetizados por *Aspergillus terreus* (Mousa *et al.* 2020) e *E. coli* (Ghorbani; Fazeli; Fallahi, 2015) indicaram a formação de partículas esféricas. A variabilidade observada na morfologia, no tamanho e na bioatividade das NPs biossintetizadas está intimamente ligada ao controle dos parâmetros experimentais como pH, concentração do precursor, tempo de reação e material biológico utilizado como agentes redutores e estabilizantes (Couto Junior *et al.* 2025; Gong *et al.* 2026). Após o exposto e devido às limitações encontradas no que diz respeito à ampliação e resolução das imagens, faz-se necessária a análise complementar para confirmação inequívoca das estruturas encontradas.

Eletromicrografias de transmissão (MET) também foram realizadas com o objetivo de verificar a possível formação intracelular de nanoestruturas. ZnONPs, biossintetizadas por *Bacillus haynesii*, apresentaram tamanhos variando de 20 a 300 nm com formato esférico para as partículas menores e em bastonetes para partículas maiores que 100 nm (Rehman *et al.* 2019). Nanopartículas de CuO biossintetizadas com extrato de *Sclerocarya birrea* apresentaram morfologia predominantemente esférica e com leve aglomeração entre as partículas quanto avaliadas em MET. Essa aglomeração é típica de óxidos em nanoescala e pode ser atribuída à alta energia superficial, que leva a interação interpartículas (Msimango *et al.* 2025). Nanocompósito de ZnO/CuO biossintetizado por bactéria e analisados por MET apresentou menores tamanhos quando

comparados a nanopartículas de ZnO, além de se apresentar em formas irregulares e com tendência a formação de aglomerados sugerindo a interferência de CuONPs na nucleação e no crescimento das nanopartículas (Jalal; Salih; Hassan; 2026). Em conjunto, os resultados sugerem que a bactéria *G. diazotrophicus* Pal 5 promove mecanismos distintos de biotransformação, com formação de estruturas extracelulares na presença de Cu e intracelulares de na presença de Zn. Fazendo-se necessária a continuação da pesquisa sobre o comportamento do microrganismo utilizado na realização de biossíntese de nanopartículas.

A batata-doce é uma importante cultura de tubérculos, propagada vegetativamente por estacas de caules ou ramas e tubérculos que é produzida em várias regiões do mundo devido ao seu valor nutricional e econômico. No entanto, esse método de propagação é demorado e pode transmitir doenças para as próximas gerações (Behera *et al.* 2022). A cultura de tecidos é utilizada para multiplicar rapidamente e em grande quantidade materiais vegetais de plantio de forma confiável. Esse processo envolve a seleção criteriosa de explantes e do meio de cultura em condições assépticas, oferecendo vantagens como a rápida multiplicação de material vegetal livre de doenças, uniformidade genética e capacidade de propagar variedades de interesse de forma eficiente (Adu Donyina *et al.* 2025).

Em cultura de tecidos vegetais, as bactérias podem se apresentar como contaminação microbiana ou como manifestação endofítica (Esposito-Polesi, 2020). Nesse contexto e devido ao conhecimento sobre o comportamento de bactérias promotores de crescimento na promoção de crescimento e indução de resistência em cultivos, vem crescendo o interesse no uso desses microrganismos em etapas do cultivo *in vitro* (Castro Molina *et al.* 2025).

O potencial biotecnológico das bactérias endofíticas na cultura de tecidos ainda não é muito conhecido. Esposito-Polesi (2020) corrobora a necessidade de se conhecer o potencial de bactérias promotoras de crescimento no cultivo *in vitro*, considerando, contudo, que o objetivo principal é o crescimento e desenvolvimento da cultura. A contaminação microbiana no cultivo *in vitro* pode resultar em um crescimento variável dos explantes, redução de brotações e enraizamento, necrose dos tecidos e consequente morte das plantas (Permadi *et al.* 2025; Rollins *et al.* 2026). Microrganismos encontrados na micropropagação podem competir por nutrientes além de excretarem substâncias tóxicas que causam a morte do explante (Esposito-Polesi, 2020; Okoroafor, 2022). A utilização de *G. diazotrophicus* Pal 5 *in vitro* e seus efeitos são praticamente desconhecidos. As análises realizadas nesse trabalho mostraram seu efeito negativo nos atributos

fitotécnicos da batata-doce nas concentrações e condições em que foram aplicadas, seja por competição ou por efeito negativo de algum metabólito liberado.

Micronutrientes desempenham um papel vital em várias funções fisiológicas nas plantas e abordagens biotecnológicas inovadoras utilizando nanotecnologia vêm crescendo de forma considerável. O uso de NPs em sistemas de cultura de tecidos vegetais representa uma nova abordagem com potencial para melhorar a eficiência da micropropagação. Dentre os benefícios se incluem a melhoria da esterilização, a regulação da atividade hormonal, aumento da multiplicação e do enraizamento, aumento da taxa de sobrevivência e a absorção direcionada de nutrientes (Guru *et al.* 2025). FeNPs biossintetizadas a partir de extratos de plantas substituíram a fonte de Fe do meio MS e proporcionaram maior diâmetro, peso, número de raízes e de brotações em calos de arroz *in vitro* (Ullah *et al.* 2024). ZnO NPs sintetizadas quimicamente, aplicadas no estabelecimento dos explantes, em concentrações de 10-30 mg dm⁻³, aumentaram o teor Zn e de outros nutrientes em plantas de blackberry (*Rubus fruticosus* L.) (Krzepiłko; Prażak; Matyszczyk, 2024). Utilizando extrato de folhas de *Moringa oleifera* para biossíntese de CuONPs, Ali *et al.* (2026) conseguiram aumento significativo no conteúdo de fenólicos totais.

No presente trabalho, ficou evidente a interferência negativa da bactéria *G. diazotrophicus* Pal 5 na cultura da batata-doce *in vitro*. Essa interferência condenou a avaliação dos efeitos das nanopartículas de ZnO e CuO. A aplicação de nanopartículas em cultura de tecidos pode significar uma nova abordagem para melhorar a eficiência da micropropagação. O completo entendimento e padronização dos processos de síntese, do momento de aplicação em relação ao estágio de desenvolvimento do explante e às formas de aplicação (líquido, sólido, concentrações etc.) é de extrema importância para integrar a utilização de nanopartículas em cultura de tecidos. O momento da aplicação das nanopartículas, considerando o estágio da micropropagação (estabelecimento, multiplicação de brotos, enraizamento e aclimação), pode favorecer os resultados esperados. Além disso, a concentração das nanopartículas aplicadas *in vitro* deve ser testada e otimizada para cada nutriente para atender à demanda de cada cultura em específico (Krzepiłko; Prażak; Matyszczyk, 2024; Guru *et al.* 2025).

5 CONCLUSÃO

A bactéria *G. diazotrophicus* se mostrou promissora como matriz para a produção de nanopartículas de Zn e Cu de forma sustentável. A utilização da bactéria *G. diazotrophicus* não foi uma boa alternativa para utilização *in vitro* nas condições testadas pois afetou negativamente o crescimento e desenvolvimento dos explantes em todos os tratamentos. A utilização *in vitro* de nanopartículas de Zn, Cu e do compósito Zn/Cu biossintetizadas se apresenta como uma alternativa a ser mais bem compreendida para futuras aplicações.

Diante dos crescentes desafios impostos pelas mudanças climáticas e da necessidade de utilização de métodos inovadores para aumentar a resiliência e a produtividade das culturas, este estudo revela um panorama de possibilidades e prepara o caminho para novas investigações envolvendo a bactéria promotora de crescimento *G. diazotrophicus* Pal 5 em cultura de tecidos, bem como sua utilização na biossíntese de nanopartículas e a utilização dessas nanoestruturas como fonte de nutrientes para as cultura.

REFERÊNCIAS

- ADU DONYINA, G., SZARVAS, A., OPOKU, V. A., MIKO, E., TAR, M., CZÓBEL, S., & MONOSTORI, T. Enhancing sweet potato production: a comprehensive analysis of the role of auxins and cytokinins in micropropagation. **Planta**, v. 261, n. 4, p. 74, 2025. <https://doi.org/10.1007/s00425-025-04650-z>
- AKDAŞCI, E., EKER, F., DUMAN, H., BECHELANY, M., & KARAV, S. Microbial-Based green synthesis of silver nanoparticles: A comparative review of Bacteria-and Fungi-Mediated approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 20, p. 10163, 2025. <https://doi.org/10.3390/ijms262010163>
- ALVES, E; PERINA, F. J. Curso introdutório de microscopia eletrônica de varredura e microanálise de raios x. Lavras, **UFLA**, 2012, p. 24-33.
- AMARO, G. B., FERNANDES, F. R., SILVA, G. O., MELLO, A. F., & CASTRO, L. A. Desempenho de cultivares de batata-doce na região do Alto Paranaíba-MG. **Horticultura Brasileira**, v. 35, p. 286-291, 2017. <https://doi.org/10.1590/S0102-053620170221>
- ARIF, M., RAZA, H., & AKHTER, T. UV-Vis spectroscopy in the characterization and applications of smart microgels and metal nanoparticle-decorated smart microgels: a critical review. **RSC advances**, v. 14, n. 51, p. 38120-38134, 2024. [10.1039/D4RA07643E](https://doi.org/10.1039/D4RA07643E)
- ARORA, N., MANCHANDA, H., & GUPTA, M. Recent advances in green synthesis, characterization and emerging applications of nanoparticles and derived nanofluids. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 226, p. 116354, 2026. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2025.116354>
- BALÁZS, V., HELYES, L., DAOOD, H. G., PÉK, Z., ILAHY, R., NEMÉNYI, A., ... & TAKÁCS, S. Cultivation technology and plant density affecting the yield and carotenoid content of beauregard sweet potato. **Agronomy**, v. 14, n. 11, p. 2485, 2024. <https://doi.org/10.3390/agronomy14112485>

CARVALHO, A. M. X. D., MENDES, F. Q., MENDES, F. Q., & TAVARES, L. D. F. SPEED Stat: a free, intuitive, and minimalist spreadsheet program for statistical analyses of experiments. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. e327420312, 2020.

CASTRO MOLINA, Y., DÓRIA, J., GÓMEZ SEPÚLVEDA, A. M., CARVALHO, L. Q., PASQUAL, M., & JESUS, E. D. C. Biotization with plant growth-promoting bacteria benefits the survival and production of potato (*Solanum tuberosum* L.) in vitro and in vivo. **Horticulturae**, v. 11, n. 4, p. 393, 2025. <https://doi.org/10.3390/>

CAVALCANTE, Vladimir A.; DOBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and soil**, v. 108, n. 1, p. 23-31, 1988. <https://doi.org/10.1007/BF02370096>

CEBALLOS-AGUIRRE, N., RESTREPO, G. M., PATIÑO, S., CUÉLLAR, J. A., & SÁNCHEZ, Ó. J. Utilization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in Tomato Crop: Interaction with Nitrogen and Phosphorus Fertilization. **Agriculture**, v. 15, n. 11, p. 1191, 2025. <https://doi.org/10.3390/agriculture15111191>

CEBALLOS-AGUIRRE, N., CUELLAR, J. A., RESTREPO, G. M., & SÁNCHEZ, Ó. J. Effect of the application of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and its interaction with nitrogen and phosphorus fertilization on carrot yield in the field. **International Journal of Agronomy**, v. 2023, n. 1, p. 6899532, 2023. <https://doi.org/10.1155/2023/6899532>

CEBALLOS-AGUIRRE, N., HURTADO-SALAZAR, A., RESTREPO, G. M., SÁNCHEZ, Ó. J., HERNÁNDEZ, M. C., & MONTOYA, M. Technical and Economic Assessment of Tomato Cultivation Through a Macro-Tunnel Production System with the Application of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Horticulturae**, v. 10, n. 10, 2024. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10101110>

CERIOTTI, G., BORISOV, S. M., BERG, J. S., & DE ANNA, P. Morphology and size of bacterial colonies control anoxic microenvironment formation in porous media. **Environmental Science & Technology**, v. 56, n. 23, p. 17471-17480, 2022. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c05842>

CHAKRABORTY, N., BANERJEE, J., CHAKRABORTY, P., BANERJEE, A., CHANDA, S., RAY, K., ... & SARKAR, J. Green synthesis of copper/copper oxide nanoparticles and their applications: a review. **Green Chemistry Letters and Reviews**, v. 15, n. 1, p. 187-215, 2022. <https://doi.org/10.1080/17518253.2022.2025916>

COUTO JUNIOR, Moacir C. do et al. Nanofertilizers in Modern Agriculture: A Technological Revolution in Plant Nutrition and Resource Efficiency. **ACS Omega**, 2025. <https://doi.org/10.1021/acsomega.5c08087>

EL OUARDY, K., AKHROUF, A., FAIK, A., & MIR, Y. Green synthesis of metal and metal oxide nanoparticles: a pathway to sustainable energy and sensing applications. **Nanotechnology Reviews**, v. 15, n. 1, p. 20250207, 2026. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2025-0207>

ELNAHAL, A. S., EL-SAADONY, M. T., SAAD, A. M., DESOKY, E. S. M., EL-TAHAN, A. M., RADY, M. M., ... & EL-TARABILY, K. A. The use of microbial inoculants for biological control, plant growth promotion, and sustainable agriculture: A review. **European Journal of Plant Pathology**, v. 162, n. 4, p. 759–792, 2022. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02393-7>

ESPOSITO-POLESI, N. P. Contaminação versus manifestação endofítica: implicações no cultivo in vitro de plantas. **Rodriguésia**, v. 71, p. e00562018, 2020. <https://doi.org/10.1590/2175-7860202071072>

EWEIS, A. A., EL-RAHEEM, H. A., AHMAD, M. S., HOZZEIN, W. N., & MAHMOUD, R. Green fabrication of nanomaterials using microorganisms as nano-factories. **Journal of Cluster Science**, v. 35, n. 7, p. 2149-2176, 2024. <https://doi.org/10.1007/s10876-024-02660-7>

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. FAOSTAT, **Crops**. 2022. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 14 jul 2024.

GARCÍA-TORRA, V., CANO, A., ESPINA, M., ETTCHETO, M., CAMINS, A., BARROSO, E., ... & SOUTO, E. B. State of the art on toxicological mechanisms of metal and metal oxide nanoparticles and strategies to reduce toxicological risks. **Toxics**, v. 9, n. 8, p. 195, 2021. <https://doi.org/10.3390/toxics9080195>

GHORBANI, H. R., FAZELI, I., & FALLAHI, A. A. Biosynthesis of copper oxide nanoparticles using extract of *E. coli*. **Orient J Chem**, v. 31, n. 1, p. 515-517, 2015. <http://dx.doi.org/10.13005/ojc/310163>

GONG, C., LI, M., TIAN, J., CAI, B., WU, J., ZHANG, B., ... & LIU, P. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles: Advances, applications, and AI-driven innovations for sustainability. **Results in Chemistry**, p. 103028, 2026. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2026.103028>

GOSWAMI, S., BISHNOI, A., TANK, D., PATEL, P., CHAHAR, M., KHATURIA, S., ... & YADAV, K. K. Recent trends in the synthesis, characterization and commercial applications of zinc oxide nanoparticles-a review. **Inorganica Chimica Acta**, v. 573, p. 122350, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2024.122350>

GUNASENA, M. D. K. M., ALAHAKOON, A. M. P. D., POLWATHTHA, K. P. G. D. M., GALPAYA, G. D. C. P., PRIYANJANI, H. A. S. A., KOSWATTAGE, K. R., & SENARATH, W. T. P. S. K. Transforming plant tissue culture with nanoparticles: a review of current applications. **Plant Nano Biology**, v. 10, p. 100102, 2024. [https://doi-org.ez26.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.plana.2024.100102](https://doi.org.ez26.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.plana.2024.100102)

GURU, G. R., RAMTEKE, P. W., VERES, C., & VÁGVÖLGYI, C. Potential impacts of nanoparticles integration on micropropagation efficiency: Current achievements and

prospects. **Frontiers in Plant Science**, v. 16, p. 1629548, 2025. <https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1629548>

HIGASHIKAWA, F. S., KURTZ, C., ALVES, D. P., WAMSER, G. H., & MANFIO, C. E. Effect of potassium fertilization on sweet potato cultivation. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 54, p. e78455, 2024. <https://doi.org/10.1590/1983-40632024v5478455>

HUMIA, B. V., SANTOS, K. S., SCHNEIDER, J. K., LEAL, I. L., DE ABREU BARRETO, G., BATISTA, T., ... & PADILHA, F. F. Physicochemical and sensory profile of Beauregard sweet potato beer. **Food Chemistry**, v. 312, p. 126087, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126087>

IBGE- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal – Pam**, 2022. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9117-producao-agricola-municipal-culturas-temporarias-epermanentes.html?=&t=o-que-e>>. Acesso em: 14 jul. 2024.

INTORNE, A. C., DE OLIVEIRA, M. V. V., PEREIRA, L. D. M., & DE SOUZA FILHO, G. A. Essential role of the czc determinant for cadmium, cobalt and zinc resistance in *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5. **Int Microbiol**, v. 15, n. 2, p. 69-78, 2012. [10.2436/20.1501.01.160](https://doi.org/10.2436/20.1501.01.160)

JALAL, L. K., FAQE SALIH, L. I., & HASSAN, P. B. Enterococcus hirae-Mediated ZnO and CuO/ZnO Nanoparticles: Synergistic Antimicrobial Combinations Against MDR Pathogens. **International Journal of Microbiology**, v. 2026, n. 1, p. 1969553, 2026. <https://doi.org/10.1155/ijm/1969553>

JEEVARATHINAM, M.; ASHARANI, I. V. Synthesis of CuO, ZnO nanoparticles, and CuO-ZnO nanocomposite for enhanced photocatalytic degradation of Rhodamine B: a comparative study. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 9718, 2024. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-60008-7>

KOUL, B., POONIA, A. K., YADAV, D., & JIN, J. O. Microbe-mediated biosynthesis of nanoparticles: Applications and future prospects. **Biomolecules**, v. 11, n. 6, p. 886, 2021. <https://doi.org/10.3390/biom11060886>

KRZEPIŁKO, A; PRAŽAK, R; MATYSZCZUK, K. Influence of zinc oxide nanoparticles in in vitro culture and bacteria *Bacillus thuringiensis* in ex vitro conditions on the growth and development of blackberry (*Rubus fruticosus* L.). **Applied Sciences**, v. 14, n. 9, p. 3743, 2024. <https://doi.org/10.3390/app14093743>

LAHIRI, D., NAG, M., SHEIKH, H. I., SARKAR, T., EDINUR, H. A., PATI, S., & RAY, R. R. Microbiologically-synthesized nanoparticles and their role in silencing the biofilm signaling cascade. **Frontiers in microbiology**, v. 12, p. 636588, 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.636588>

LI, H., TANG, C., & XU, Z. The effects of different light qualities on rapeseed (*Brassica napus* L.) plantlet growth and morphogenesis in vitro. **Scientia Horticulturae**, v. 150, p. 117-124, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.10.009>

MAHANTA, MANISHA; GANTAIT, SAIKAT. Trends in plant tissue culture and genetic improvement of gerbera. **Horticultural Plant Journal**, v. 11, n. 3, p. 974-988, 2025. <https://doi-org.ez26.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.hpj.2024.03.003>

MARTINS FILHO, J. B., COSTA, R. N., DE SOUSA, A. B., & GONDIM, R. S. Effect of NPK fertilizer rates and growth regulator concentrations on sweet potato crop yield. **Revista Caatinga**, v. 36, n. 2, p. 329-338, 2023 <https://doi.org/10.1590/1983-21252023v36n210rc>

MOHAMMADIAN, M., ES'HAGHI, Z., & HOOSHMAND, S. Green and chemical synthesis of zinc oxide nanoparticles and size evaluation by UV–vis spectroscopy. **J Nanomed Res**, v. 7, n. 1, p. 00175, 2018. <https://doi.org/10.15406/jnmr.2018.07.00175>

MOREIRA, J. R., SOARES, F. S., DE CASTRO MARTINS, K. M., PIMENTEL, V. R., DE SOUZA VESPOLI, L., ANDRADE, L. F., ... & DE SOUZA FILHO, G. A. The pentose phosphate pathway is essential for the resistance of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 to zinc. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 10, p. 331, 2025. <https://doi.org/10.1007/s11274-025-04547-9>

MOUSA, A. M., AZIZ, O. A. A., AL-HAGAR, O. E., GIZAWY, M. A., ALLAN, K. F., & ATTALLAH, M. F. Biosynthetic new composite material containing CuO nanoparticles produced by *Aspergillus terreus* for ⁴⁷Sc separation of cancer theranostics application from irradiated Ca target. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 166, p. 109389, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2020.109389>

MSIMANGO, L. D., ABOLARINWA, T. O., OJELERE, O., OGWUEGBU, M. C., MTHIYANE, D. M., & ONWUDIWE, D. C. Structural characterisation of green-synthesised CuO nanoparticles from different precursor sources and their antibacterial activity. **Nano Express**, v. 6, n. 4, p. 045006, 2025. <https://doi.org/10.1088/2632-959X/ae15ad>

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures." **Physiologia Plantarum**, [S.l.], v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NORDINE, Aicha. Trends in plant tissue culture, production, and secondary metabolites enhancement of medicinal plants: a case study of thyme. **Planta**, v. 261, n. 4, p. 84, 2025. <https://doi-org.ez26.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s00425-025-04655-8>

OKOROAFOR, U. E. Microbial contamination in plant tissue culture and elimination strategies. **Nigeria Agricultural Journal**, v. 53, n. 2, p. 348-355, 2022. <https://www.ajol.info/index.php/naj/article/view/243321>

PALLUCCHINI, M., FRANCHINI, M., EL-BALLAT, E. M., NARRAIDOO, N., POINTER-GLEADHILL, B., PALFRAMAN, M. J., ... & HILL, P. J. *Gluconacetobacter diazotrophicus* AZ0019 requires functional *nifD* gene for optimal plant growth promotion in tomato

plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 15, p. 1469676, 2024.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1469676>

PERIAKARUPPAN, R., GOVINDHARAJ, K., MARTIN, J. A., VIJAI SELVARAJ, K. S., & AL-DAYAN, N. Utilization of *Ulva rigida* for Fabrication of Iron Oxide Nanoparticles and Its Physicochemical Characterization. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 1-11, 2025.
<https://doi.org/10.1007/s12010-025-05253-w>

PERMADI, N., PRISMANTORO, D., VASALL, P. R. N., SHEELMAREVAA, F. A., NURJANAH, S., NURZAMAN, M., ... & JULAEHA, E. Modern and traditional strategies for controlling microbial contamination in plant Micropropagation: Current insights and future Perspectives. **Current Research in Biotechnology**, p. 100337, 2025.
<https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2025.100337>

PHILLIPS, GREGORY C.; GARDA, MARTINA. Plant tissue culture media and practices: an overview. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 55, n. 3, p. 242-257, 2019.
<https://doi-org.ez26.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s11627-019-09983-5>

PONMURUGAN, P., MANJUKARUNAMBIKA, K., ELANGO, V., & GNANAMANGAI, B. M. Antifungal activity of biosynthesised copper nanoparticles evaluated against red root-rot disease in tea plants. **Journal of Experimental Nanoscience**, v. 11, n. 13, p. 1019-1031, 2016.
<https://doi.org/10.1080/17458080.2016.1184766>

QUEIROGA, R. C. F. D., SANTOS, M. A. D., MENEZES, M. A. D., VIEIRA, C. P. G., & SILVA, M. D. C. Fisiologia e produção de cultivares de batata-doce em função da época de colheita. **Horticultura Brasileira**, v. 25, p. 371-374, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362007000300010>

RAJIVGANDHI, G., GNANAMANGAI, B. M., PRABHA, T. H., POORNIMA, S., MARUTHUPANDY, M., ALHARBI, N. S., ... & LI, W. J. Biosynthesized zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) using actinomycetes enhance the anti-bacterial efficacy against K.

Pneumoniae. **Journal of King Saud University-Science**, v. 34, n. 1, p. 101731, 2022. [10.1016/j.jksus.2021.101731](https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101731)

RODRIGUEZ-SEIJO, A., SANTAS-MIGUEL, V., ARENAS-LAGO, D., ARIAS-ESTEVEZ, M., & PEREZ-RODRIGUEZ, P. Use of nanotechnology for safe agriculture and food production: Challenges and limitations. **Pedosphere**, v. 35, n. 1, p. 20-32, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.pedsph.2024.09.005>

ROLLINS, M. B., MORALES, J. V., BURKS, T., HOY, J. W., SINGH, R., & GAMA, A. B. Identifying to Manage: Characterization of Bacterial Contaminants in Sugarcane Meristem Tissue Culture and Antibiotic Sensitivity of *Bacillus* spp. **PhytoFrontiers™**, p. PHYTOFR-07-25-0064-R, 2026. <https://doi.org/10.1094/PHYTOFR-07-25-0064-R>

SAAD, E. L., SALEM, S. S., FOUDA, A., AWAD, M. A., EL-GAMAL, M. S., & ABDO, A. M. New approach for antimicrobial activity and bio-control of various pathogens by biosynthesized copper nanoparticles using endophytic actinomycetes. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 11, n. 3, p. 262-270, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2018.05.003>

SCOPEL, W., BARBOSA, J. Z., & VIEIRA, M. L. Extração de pigmentos foliares em plantas de canola. **Unoesc & Ciência-ACET**, v. 2, n. 1, p. 87-94, 2011.

SELMANI, ATİDA; KOVAČEVIĆ, DAVOR; BOHINC, KLEMEN. Nanoparticles: From synthesis to applications and beyond. **Advances in colloid and interface science**, v. 303, p. 102640, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102640>

SOUZA, A. G. D., VIANA, D. J. S., SANTOS, A. S. D., ANDRADE, V. C. D., & ROSA, D. D. S. Structure and properties of starch and flour of four Brazilian sweet potatoes (*Ipomoea batatas*) cultivars. **Matéria (Rio De Janeiro)**, v. 25, n.03, p. e–12828, 2020. <https://doi.org/10.1590/S1517-707620200003.1128>

SWAIN, M., MISHRA, D., & SAHOO, G. A review on green synthesis of ZnO nanoparticles. **Discover Applied Sciences**, v. 7, n. 9, p. 997, 2025. <https://doi.org/10.1007/s42452-025-06957-8>

TANK, D., BISHNOI, A., GOSWAMI, S., AMBEGAONKAR, N. J., PATEL, P., CHAHAR, M., ... & YADAV, V. K. Recent advances in phyto-and microorganisms-mediated synthesis of copper nanoparticles and their emerging applications in healthcare, environment, agriculture and food industry. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, p. 1-34, 2025. <https://doi.org/10.1007/s00449-025-03196-4>

ULLAH, J., GUL, A., KHAN, I., SHEHZAD, J., KAUSAR, R., AHMED, M. S., ... & MUSTAFA, G. Green synthesized iron oxide nanoparticles as a potential regulator of callus growth, plant physiology, antioxidative and microbial contamination in *Oryza sativa* L. **BMC Plant Biology**, v. 24, n. 1, p. 939, 2024. <https://doi.org/10.1186/s12870-024-05627-y>

WANG, L., LU, P., FENG, S., HAMEL, C., SUN, D., SIDDIQUE, K. H., & GAN, G. Y. Strategies to improve soil health by optimizing the plant–soil–microbe–anthropogenic activity nexus. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 359, p. 108750, 2024 <https://doi.org/10.1016/j.agee.2023.108750>

WU, C., SHEN, X., FENG, W., LI, P., & CHEN, Y. Agricultural nanotechnology. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 543, p. 216906, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2025.216906>