

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

ANDRESSA NEGREIROS FLORES PILATI NAVARRO

**EFEITO DE NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA EM PLANTAS DE MILHO (*ZEAMAYS L.*) TRATADAS COM A RIZOBACTÉRIA *STREPTOMYCES (CLV16)***

Porto Alegre  
2020

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul

ANDRESSA NEGREIROS FLORES PILATI NAVARRO

Efeito de nanopartículas de sílica em plantas de milho (*Zea mays* L.) tratadas  
com a rizobactéria *Streptomyces* (CLV16)

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Biologia  
Celular e Molecular da Escola de  
Ciências da Saúde e da Vida, da  
Pontifícia Universidade Católica do  
Rio Grande do Sul como requisito  
para obtenção do título de Mestre.

ORIENTADOR: PROF. DR. LEANDRO VIEIRA ASTARITA

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. RICARDO MEURER PAPALEO

Porto Alegre

2020

## Ficha Catalográfica

N322e Navarro, Andressa Negreiros Flores Pilati

Efeito de nanopartículas de sílica em plantas de milho (*Zea mays* L.) tratadas com a rizobactéria *Streptomyces* (CLV16) / Andressa Negreiros Flores Pilati Navarro . – 2020.

64.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Vieira Astarita.

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Meurer Papaleo.

1. Nanosílica. 2. Estresse oxidativo. 3. Rizobactéria. I. Astarita, Leandro Vieira. II. Papaleo, Ricardo Meurer. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Clarissa Jesinska Selbach CRB-10/2051

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais, sem eles nada disso seria possível. Obrigada pela compreensão nos momentos de estresse e a flexibilidade de horários possibilitando a execução deste trabalho.

Ao meu marido, pelo apoio de todos os dias e incentivo nos dias difíceis.

Ao pessoal do laboratório pelo carinho e acolhimento; em especial à Vitória Rodrigues pela ajuda nos experimentos.

Agradeço imensamente a oportunidade que me foi dada pelos professores Leandro Astarita e Eliane Santarém ao me aceitarem como aluna, apesar do desafio de conciliar a rotina de trabalho com a pós-graduação. Obrigada pelos ensinamentos, pelo carinho e paciência. E pela inspiração como pessoas e profissionais, o brilho do olhar de quem ama o que faz é admirável.

## RESUMO

A nanotecnologia abrange diversos campos de conhecimento e traz inúmeros avanços tecnológicos. Com o atual cenário de crescimento populacional e demanda por alimentos, a utilização de nanopartículas vem sendo avaliada como uma ferramenta inovadora para sistemas agrícolas. A cultura do milho está em terceiro lugar na produção mundial de cereais, sendo considerado essencial na alimentação humana e animal. Grande parte dos vegetais absorvem e polimerizam o silício (elemento não-nutriente) em estruturas amorfas de sílica, incorporadas na parede celular das plantas. As nanopartículas artificiais de sílica (NPSiO<sub>2</sub>) são pequenas (<100 nm), apresentam grande razão superfície-volume e características reativas de superfície. As rizobactérias promotoras de crescimento influenciam positivamente o desenvolvimento de diversas culturas agrícolas através da liberação de substâncias que auxiliam contra patógenos ou na absorção mineral, o gênero *Streptomyces* se destaca dentre as diversas rizobactérias promotoras de crescimento. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial uso de NPSiO<sub>2</sub> em plantas de milho e sua interação com o isolado CLV16 de *Streptomyces*. A toxicidade das NPSiO<sub>2</sub> foi determinada através da avaliação da taxa de germinação, do crescimento das plantas e da atividade de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo. A interação com a bactéria foi avaliada através de testes *in vitro* e do crescimento de plantas. Os resultados demonstraram que as NPSiO<sub>2</sub> não afetam a taxa de germinação de sementes de milho. NPSiO<sub>2</sub> 63 nm e 110 nm prejudicaram o crescimento inicial das raízes das plântulas. Contudo, este efeito prejudicial não foi observado em plantas após 45 dias de cultivo. As NPSiO<sub>2</sub> não prejudicaram o crescimento do isolado CLV16, independentemente do tamanho e concentração. O isolado CLV16 promoveu o crescimento de plantas de milho de forma semelhante ao observado quando se utilizou somente NPSiO<sub>2</sub>. A associação de NPSiO<sub>2</sub>+CLV16 não apresentou diferenças significativas quanto a promoção do crescimento, comparado ao uso de NPSiO<sub>2</sub> ou CLV16 de forma isolada. Quando NPSiO<sub>2</sub> foram aplicadas nas sementes, o maior tamanho teve efeito deletério no crescimento das plantas. Sementes tratadas com NPSiO<sub>2</sub> 110 nm apresentaram incremento na matéria fresca e seca da parte aérea, assim como promoveram o crescimento das raízes. A aspersão de NPSiO<sub>2</sub> promoveu alterações nas atividades das enzimas antioxidantes, indicando que as nanopartículas foram agentes estressantes nas plantas. Contudo, as plantas aspergidas

com NPSiO<sub>2</sub> apresentaram um aumento no comprimento da parte aérea e no peso fresco das raízes. Assim, as NPSiO<sub>2</sub> modularam o crescimento de plantas de milho, apresentando melhores respostas quando utilizadas no tratamento de sementes, em comparação com a aspersão foliar.

Palavras-chave: Nanosílica; Estresse oxidativo; Rizobactéria

## ABSTRACT

Nanotechnology comprehend a broad range of areas and represents an innovative approach for food production and crop management in the modern agriculture. Maize is in third place in the world cereal production, being considered essential in food. Silicon (non-nutritive element) is absorbed by many plants and polymerized in amorphous silica structures, and incorporated into biological structures such as stem, leaves and roots. Nanoparticles present a high surface-volume ratio, with the size <100 nm. Rhizobacteria that promote plant growth, such as *Streptomyces*, are used in the management of many agricultural crops due to their beneficial effects by releasing of substances that help against pathogens or mineral absorption. The aim of this work was to evaluate the NPSiO<sub>2</sub> in maize plants and its interaction with the rhizobacteria *Streptomyces* (CLV16). The toxicity of NPSiO<sub>2</sub> was determined through the evaluation of germination rate, plant growth and enzyme activity related to oxidative stress. The interaction with the bacteria was evaluated through *in vitro* tests and plant growth. According to the results, NPSiO<sub>2</sub> does not affect the germination rate. NPSiO<sub>2</sub> 63 nm and 110 nm impaired the initial growth of seedling roots. However, this harmful effect was not observed in plants after 45 days of growth. NPSiO<sub>2</sub> did not interfere the growth of the CLV16, regardless of nanoparticle size and concentration. The CLV16 promoted the growth of maize plants in a similar way to that observed when using only NPSiO<sub>2</sub>. When seeds were exposed to NPSiO<sub>2</sub> 220 nm, plant growth was reduced. Plants germinated from seeds treated with NPSiO<sub>2</sub> 110 nm showed an increment in root growth and fresh and dry shoot mass. Plants sprayed with NPSiO<sub>2</sub> showed an increase in the activities of antioxidant enzymes, suggesting that these nanoparticles were plant stressors. However, plants sprayed with NPSiO<sub>2</sub> presented an increment in shoot length and fresh root mass. Thus, NPSiO<sub>2</sub> modulated the growth of maize plants, mainly when seeds were treated rather than leaves sprayed.

Keywords: Nanosilica; Oxidative stress; Rhizobacteria.

# SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>5</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1 NANOPARTÍCULAS</b> .....	<b>5</b>
1.1.1 <i>Silício</i> .....	6
1.1.2 <i>Nanopartículas de Sílica (NPSiO<sub>2</sub>)</i> .....	7
<b>1.2 MILHO</b> .....	<b>8</b>
<b>1.3 ESTRESSE OXIDATIVO</b> .....	<b>11</b>
<b>1.4 RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL (PGPR)</b> .....	<b>15</b>
<b>1.5 PGPR E NANOMATERIAIS</b> .....	<b>17</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>19</b>
<b>3 HIPÓTESES</b> .....	<b>20</b>
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
<b>4.1 OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>20</b>
<b>4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>20</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>21</b>
<b>CAPÍTULO II: MANUSCRITO A SER SUBMETIDO A PERIÓDICO CIENTÍFICO</b> .....	<b>29</b>
<b>2 MATERIALS AND METHODS</b> .....	<b>33</b>
<b>CAPÍTULO III</b> .....	<b>55</b>
<b>1 CONCLUSÕES</b> .....	<b>55</b>
<b>2 PERSPECTIVAS</b> .....	<b>56</b>
<b>3 MATERIAL SUPLEMENTAR</b> .....	<b>57</b>



## CAPÍTULO I

### 1 INTRODUÇÃO

#### 1.1 Nanopartículas

As nanopartículas ou nanomateriais particulados (1) são estruturas com um tamanho entre 1-100 nm, em pelo menos uma de suas dimensões (2). As nanopartículas podem ser classificadas em três tipos, dependendo da sua origem: i) as que ocorrem naturalmente e podem estar presentes na poeira vulcânica, poeira terrestre proveniente de tempestades, compostos minerais, entre outros; ii) as acidentais, que podem ocorrer por processos industriais como combustão de carvão, escape de gasolina, exaustão industrial, e outros; iii) e as projetadas, que podem ser de cinco categorias: as de carbono, metais, magnéticas, dendrímeras, e as compostas. As compostas podem ser feitas de dois ou mais materiais, como por exemplo, sílica e um elemento inorgânico (2).

Certas características das nanopartículas como o tamanho, estrutura e superfície as tornam diferentes da maioria das partículas dos mesmos materiais (1). Materiais nesta escala manifestam efeitos de limitação do movimento dos elétrons (confinamento quântico), gerando diferentes propriedades físicas na nanoestrutura. O aumento na razão entre a área de superfície e o volume em nanomateriais, afeta tanto as propriedades das partículas isoladas quanto sua interação com outros sistemas. Os átomos na superfície participam de todas as interações físicas e químicas do material com o meio no qual ele está inserido (1).

Devido a isso, intensas pesquisas vêm sendo realizadas com nanotecnologia nas áreas da eletrônica, medicina (3) e energia, dentre outras (4). Na área agrícola, a nanotecnologia vem sendo aplicada no desenvolvimento de técnicas de melhoramento genético de plantas (4), nanofertilizantes (5) e na remediação ambiental (6, 7). As nanopartículas podem ser utilizadas como carreadoras de substâncias como proteínas e DNA (8).

Devido às características peculiares das nanoestruturas, diversos trabalhos vêm explorando o uso destas nanopartículas na agricultura, como agentes promotores do crescimento e da defesa vegetal. A aplicação de nanotubos de carbono em

lavouras de tomate (*Solanum lycopersicum*) promoveu o aumento no número de flores e frutos, indicando o seu uso como possível regulador de crescimento de plantas (9). Este efeito regulador de crescimento foi observado em nanopartículas de óxido de zinco aplicadas em plantas de cebola (*Allium cepa*), promovendo a redução no tempo de crescimento e de floração (10). De forma semelhante, a aplicação de nanopartículas de ferro, cobre e cobalto em sementes de soja (*Glycine max*) promoveu o desenvolvimento, crescimento e o aumento dos níveis de clorofila, melhorando o rendimento das plantas (11). Nanopartículas de zinco aspergidas em plantas de café (*Coffea arabica*) e arroz (*Oryza sativa*) promovem um aumento da massa seca e fresca tanto de folhas quanto de raízes (12,13). Nanopartículas de prata também estão sendo amplamente testadas, apresentando ação antifúngica e antimicrobiana (14–16). Esta ação antimicrobiana também é observada em nanopartículas de óxido de zinco (17).

As nanopartículas também podem ter efeitos na estrutura e na função das membranas celulares, podendo levar a um aumento da formação de espécies reativas de oxigênio nos tecidos (18). Nanopartículas de zinco aspergidas em plantas de batata (*Solanum tuberosum*) causaram estresse oxidativo, com o aumento na atividade de enzimas antioxidantes, como a catalase e a peroxidase, além de promover o acúmulo de açúcares nos tecidos das plantas (19). Por outro lado, plantas de grão-de-bico (*Cicer arietinum*) também aspergidas com nanopartículas de zinco apresentaram um aumento de biomassa que foi atribuído à presença de baixos níveis de espécies reativas de oxigênio, conseqüentemente uma diminuição nas enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase e a peroxidase (20).

O conhecimento das interações de nanomateriais com células vegetais é essencial para o aproveitamento das propriedades das nanopartículas, possibilitando o desenvolvimento de produtos “inteligentes” que possam servir de ferramenta para o manejo de culturas agrícolas.

### 1.1.1 Silício

O Silício (Si) é um dos elementos mais encontrados na crosta terrestre, e mesmo em altas concentrações não apresenta toxicidade (21). Em diversas espécies vegetais foi demonstrado que este elemento auxilia no crescimento,

desenvolvimento, rendimento e resistência a patógenos; contudo não é considerado um elemento essencial (22), mas é utilizado amplamente na agricultura, na forma de silicatos (23). Em ambientes salinos, o uso deste elemento melhora a tolerância em plantas de cevada e tomate, promovendo a atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase e a catalase (19, 20).

As plantas podem precipitar e acumular o silício nas paredes celulares sob a forma de  $\text{SiO}_2$ , dependendo da capacidade de absorção da raiz. Espécies das famílias Poaceae e Cyperaceae são conhecidas por acumularem elevados níveis deste elemento (22). O silício atua como uma barreira física na planta, pois se deposita sob a cutícula, através de ligações com a hemicelulose, formando uma dupla camada de proteção, impedindo assim a entrada de patógenos, como fungos (22). Este acúmulo na planta também promove a redução da palatabilidade e da digestibilidade das folhas, apresentando assim, uma menor frequência de herbivoria (26).

### 1.1.2 Nanopartículas de Sílica ( $\text{NPSiO}_2$ )

O uso do silício em estruturas como as nanopartículas representa uma nova abordagem de uso deste elemento, pois à medida que o tamanho da partícula é reduzido, ocorre um aumento da superfície de contato, levando a alterações nos padrões de absorção e transporte do elemento nos tecidos vegetais (27).

As nanopartículas de sílica ( $\text{NPSiO}_2$ ) menores que 50 nm são absorvidas pelas células vegetais através dos poros da parede celular, enquanto estruturas de até 300 nm podem ser absorvidas por endocitose (28). A exposição de sementes de tomate e abóbora (*Cucurbita pepo*) às  $\text{NPSiO}_2$  com tamanho de 12 nm, promoveu o aumento na taxa de germinação (24, 25). Plantas de trigo (*Triticum aestivum*) apresentaram aumento na massa seca da parte aérea e das raízes, bem como de espigas e grãos, quando foram aspergidas com  $\text{NPSiO}_2$  (29). Plantas de manjeriço (*Ocimum basilicum*) aspergidas com  $\text{NPSiO}_2$  apresentaram um aumento tanto no crescimento vegetativo quanto no rendimento do óleo fresco e seus componentes (30). Em *Arabidopsis thaliana*,  $\text{NPSiO}_2$  com tamanhos de 14, 50 e 200 nm não demonstraram efeitos fitotóxicos e foram acumuladas nas células radiculares com translocação, embora mínima, para outros tecidos da planta (31).

As nanopartículas podem também reduzir danos causados por estresses. Plantas de soja aspergidas com NPSiO<sub>2</sub> (20 – 30 nm) apresentaram uma diminuição nos danos causados pelo estresse salino devido ao aumento nas atividades de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, a catalase, a peroxidase e a ascorbato peroxidase. Entretanto, estes mesmos autores observaram que concentrações de 120 mg/L causaram toxicidade (32). NPSiO<sub>2</sub> promoveram um efeito protetor em plantas de bambu (*Pleioblastus pygmaeus*) expostas ao chumbo, devido ao aumento nos níveis de enzimas antioxidantes, como a catalase (33).

As NPSiO<sub>2</sub> também podem ser utilizadas como carreadoras de fertilizantes. Neste sentido, NPSiO<sub>2</sub> revestidas com nitrogênio, fósforo e potássio liberam lentamente estes nutrientes no solo, quando estas são encapsuladas em polímeros superabsorventes de água (34). Considerando os efeitos das NPSiO<sub>2</sub> em diferentes espécies vegetais, esta nanoestrutura vem despertando o interesse para o uso agrícola. Neste sentido, é essencial compreender o seu potencial uso em plantas comerciais, como o milho.

## 1.2 Milho

O milho (*Zea mays*) é uma espécie pertencente à família Poaceae, originária da América do Norte, tendo seu espécime mais antigo proveniente do México há aproximadamente 6.250 anos (35). Tornou-se muito importante na alimentação humana, e posteriormente nas rações animais devido ao alto valor nutricional do grão, além de ter uma ampla utilização industrial, podendo ser utilizado na produção de óleo, farinha, amido, margarina, xarope de glicose, flocos para cereais matinais, fabricação de cosméticos e biocombustíveis (36). É uma das plantas mais eficientes em questão de armazenar energia, pois tem uma grande capacidade de acumular fotoassimilados. Contudo, para que a planta possa expressar ao máximo este potencial produtivo, as condições bióticas e abióticas devem ser adequadas para garantir seus processos fisiológicos e bioquímicos ao longo de todo o ciclo do cultivo (37).

O milho é o terceiro cereal mais cultivado mundialmente. Levantamentos do USDA (*U. S. Department of Agriculture*) para o ano de 2019/2020 indicam que a safra global terá uma produção de 1,11 bilhão de toneladas, sendo o Brasil o terceiro

maior produtor com 101 milhões de toneladas, depois da China com 260,8 milhões de toneladas e os Estados Unidos com 347,8 milhões de toneladas. Em questão de consumo, o Brasil é o quarto no ranking, com 66,5 milhões de toneladas, sendo assim, a maior parte do que se produz é utilizado para o consumo interno (38).

As plantas de milho possuem diversas fases de crescimento (fenofases), sendo divididas em fase vegetativa ( $V_E$ ,  $V_1$  a  $V_{10}$ ,  $V_T$ ) e fase reprodutiva ( $R_1$  a  $R_6$ ), conforme Fig. 1. Na fase vegetativa, as subdivisões são caracterizadas conforme as folhas são expandidas: a primeira é representada por  $V_E$  (fase vegetativa de emergência) e as subdivisões subsequentes são designadas numericamente como  $V_1$ ,  $V_2$ ,  $V_3$ , até  $V_{10}$ , o qual é a última folha antes do pendoamento, e a última subdivisão é representada por  $V_T$  (fase vegetativa de pendoamento) (39).

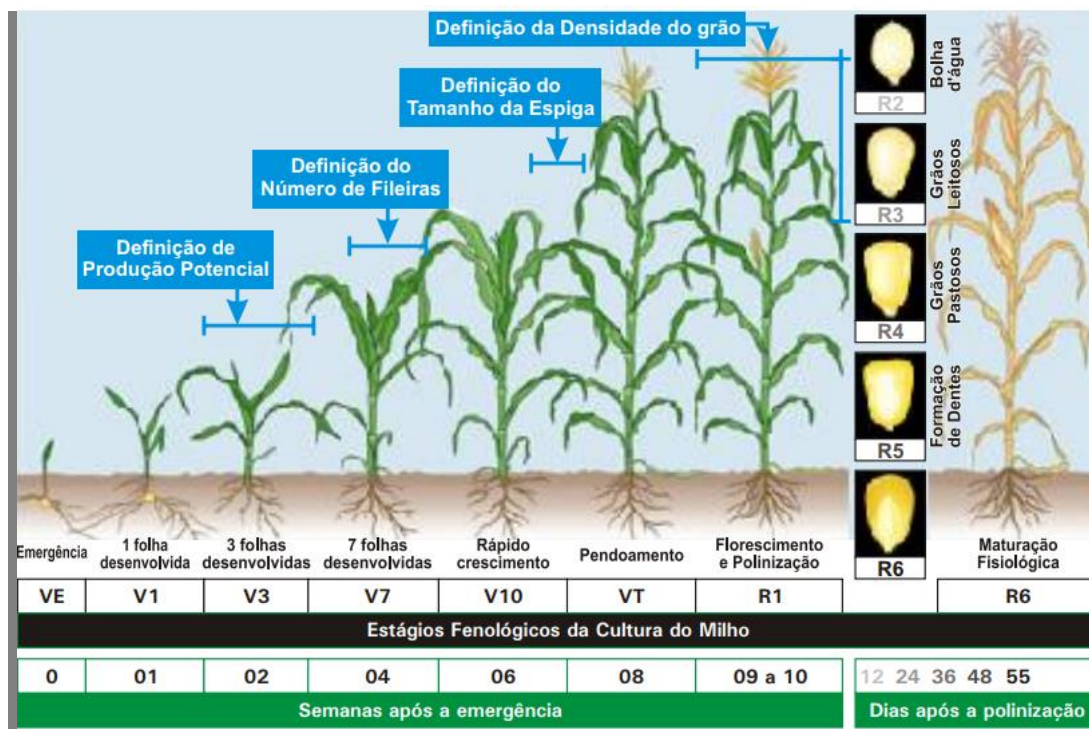


Figura 1: Estádios morfológicos de plantas de milho (fenofases) (40).

Em condições favoráveis, a semente madura é dispersada, irá absorver água para começar a germinar. A radícula é a primeira a se alongar, seguida pelo coleóptilo. O estágio  $V_E$  é atingido pelo alongamento do mesocótilo que impulsiona o coleóptilo para a superfície do solo. Assim que a emergência ocorre, expondo a extremidade do coleóptilo, o mesocótilo para de crescer. As folhas embrionárias se desenvolvem rapidamente através da extremidade do coleóptilo (Fig. 2) (39,41).

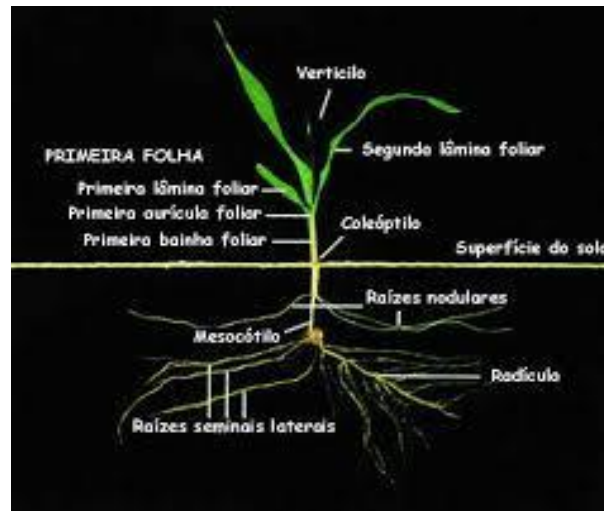


Figura 2: Morfologia da plântula de milho (41).

Uma das vantagens da cultura de milho é a possibilidade de crescimento das plantas em uma ampla faixa de ambientes. Neste sentido, o clima tropical brasileiro apresenta vantagens se comparado ao clima temperado dos Estados Unidos. Por exemplo, em climas tropicais o período de cultivo e de semeadura são mais longos do que em climas temperados, embora haja desvantagem se consideradas a imprevisibilidade das condições climáticas e maior variação das condições edáficas (42).

No Brasil, o milho é cultivado principalmente nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul (36), sendo que a região Sul concentra 43% da produção total (43). Ocorrem dois plantios por ano, um no início do verão, que é uma das épocas mais chuvosas, considerado a primeira safra e um no final do verão, considerado a segunda safra ou também chamado de “safrinha”. A segunda safra é logo após a colheita da soja, tendo assim uma área plantada menor se comparada com a primeira safra (43).

Esta cultura representa um dos principais insumos tanto na agroindústria quanto nas pequenas propriedades, sendo também primordial em rotações de cultura e sistema de semeadura direta. Portanto, é estratégico o investimento em tecnologias para a otimização da produção e a redução de custos, garantindo a produtividade. Dentre os principais problemas desta cultura, o manejo inadequado da adubação representa perda de produtividade e elevação de custos para o produtor (44). Além destes problemas, as influências dos fatores ambientais desempenham um papel fundamental no seu crescimento e desenvolvimento. Fatores bióticos como danos

causados por herbivoria e o ataque de patógenos, são comuns na cultura do milho (45).

Estratégias de manejo utilizadas para proteger o milho, tais como melhorias na nutrição mineral, disponibilidade hídrica, práticas de rotação de culturas e a utilização de fungicidas, não têm sido muito eficientes no incremento da produtividade. Por outro lado, a aplicação da sílica em culturas de milho, promove o aumento da síntese de antioxidantes (46). Da mesma forma, o uso de nanopartículas de sílica (20 – 40 nm) tem aumentado a resistência de plantas de milho, devido à síntese de compostos de defesa, como fenóis e orgânicos voláteis (47,48).

### 1.3 Estresse oxidativo

As plantas estão expostas a diversos estresses ambientais que influenciam seu crescimento, metabolismo, e conseqüentemente, rendimento. Estresses que podem ser tanto de origem biótica (ataque de patógenos) quanto abiótica (déficit hídrico) (49).

As respostas das plantas a estresses são mediadas por diferentes processos. Agentes bióticos são percebidos através de receptores de reconhecimento padrão na membrana celular capazes de reconhecerem padrões moleculares associados a patógenos, a microrganismos ou sinais endógenos decorrentes de danos (50,51). Após a percepção do microrganismo, a resposta é rápida e eficiente para iniciar processos de sinalização (52). Uma das respostas de estresse é o aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS, *Reactive Oxygen Species*) como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o superóxido ( $O_2^-$ ) em processos metabólicos que ocorrem nas mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos (53).

Por outro lado, agentes abióticos são caracterizados por causarem perturbações através de modificações significativas do metabolismo, desenvolvimento e rendimento da planta. Este estresse é geralmente acompanhado por um aumento na produção de ROS e espécies reativas de nitrogênio, que levam a um desequilíbrio entre sua produção e eliminação (*scavenging*) (54). As espécies reativas de oxigênio possuem papéis variados tanto no crescimento das plantas quanto no estresse ambiental. Sob condições normais, as plantas mantêm o equilíbrio entre a produção e a remoção das ROS. Quando sob condições de estresse, este

equilíbrio é interrompido, e as ROS fazem o papel de moléculas sinalizadoras, como nas respostas de defesa contra patógenos ou nas respostas a alta luminosidade (55). As plantas possuem mecanismos de neutralização da citotoxicidade das espécies reativas de oxigênio, através de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (53). O mecanismo enzimático envolve a ativação da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APx) e de peroxidases (POX) (56).

A SOD é uma das primeiras na linha de defesa das plantas, pois ela catalisa a dismutação do superóxido em peróxido de hidrogênio e água. Está presente nas mitocôndrias, nos cloroplastos, no citosol e nos peroxissomos. A CAT faz a conversão do peróxido de hidrogênio a água e oxigênio. Por não necessitar de um agente redutor, a CAT é uma via energeticamente eficiente para as plantas manterem o status redox. A APx também age diminuindo os níveis de peróxido de hidrogênio nas células, porém necessita de um doador de elétrons, o ácido ascórbico, para desempenhar sua atividade. Esta enzima pode estar localizada nos cloroplastos, no citosol e nas paredes das células vegetais (53). Por outro lado, a família de enzimas POX catalisa a redução do peróxido de hidrogênio utilizando diversas moléculas como doadoras de elétrons, como precursores de lignina, auxina, metabólitos secundários ou compostos fenólicos, como o guaiacol (57). As POX podem ser encontradas principalmente na parede celular e no vacúolo das células vegetais (53). Estas enzimas participam de diversos processos fisiológicos como formação de lignina e suberina, metabolismo da auxina, alongamento celular, assim como defesa contra patógenos. Apresentando atividades desde o início da germinação até a senescência da planta (57).

A enzima APx possui um papel fundamental em respostas a estresses abióticos. Plantas de *A. thaliana* deficientes em APx são mais sensíveis ao calor e à seca, comparado a plantas selvagens, acumulando níveis elevados de peróxido de hidrogênio (58). O aumento da atividade das enzimas SOD, CAT, APx, guaiacol-peroxidase e glutathione redutase em plantas de amoreira (*Morus alba*), reduziu o estresse causado por altas temperaturas (59). Em plantas de arroz, o pré-tratamento térmico de plantas promove o aumento das enzimas glutathione redutase, CAT e APx, levando a proteção contra o estresse causado por metal pesado (60).

Em plantas de milheto (*Panicum sumatrense*) expostas à seca, o estresse causou um aumento nas enzimas antioxidantes como a CAT e a POX; tanto na parte



aérea como na parte radicular das plantas (61). Em plantas de soja também expostas à seca, foi visto um aumento na quantidade e atividade de APx (62). Plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) tratadas com metassilicato de cálcio e expostas à seca, apresentaram um aumento da atividade das enzimas antioxidantes CAT, POX e SOD, protegendo as plantas contra o estresse, conforme as doses de silício utilizadas (63). O aumento das atividades das enzimas antioxidantes CAT e POX em plantas de couve chinesa (*Brassica rapa*) reduziu o estresse causado pelo déficit hídrico, porém as enzimas APx e SOD não apresentaram aumento de atividade (64). Da mesma forma, plantas de canola (*Brassica napus*) apresentaram aumento das enzimas SOD e guaiacol-peroxidase causado pelo estresse hídrico, ocorrendo a diminuição na atividade da CAT (65).

O sistema de defesa antioxidante vegetal também desempenha um importante papel na proteção a estresses salinos. Neste sentido, foram estudados os níveis de peróxido de hidrogênio e enzimas antioxidantes em plantas com alta tolerância ao cloreto de sódio (*Chlorella* sp., *Najas graminea*, e *Suaeda maritima*). Estas plantas aumentam significativamente a atividade tanto da SOD quanto da CAT em resposta ao tratamento salino (66). Plantas de grão-de-bico (*Cicer arietinum*) submetidas à salinidade, apresentaram um aumento na atividade da enzima SOD nos tecidos foliares e radiculares. Contudo, as enzimas glutatona redutase e APx, aumentaram suas atividades somente no tecido foliar desta espécie, enquanto a enzima CAT aumentou somente no tecido radicular (67). Plantas de milho (*Zea mays*) tratadas com cloreto de sódio apresentaram um aumento nas enzimas CAT e desidroascorbato redutase em todos tecidos, enquanto as enzimas SOD e POX aumentaram de atividade nos tecidos radiculares (68).

As plantas são capazes de minimizar o estresse causado por metais pesados através do sistema antioxidante. A exposição de plantas de soja ao cádmio, promoveu um aumento geral das enzimas relacionadas ao sistema antioxidante, tendo a CAT apresentado a maior atividade nas maiores concentrações do metal. Contudo, a APx apresentou a maior atividade somente nos menores níveis de cádmio (69). Da mesma forma, plantas de caniço (*Phragmites australis*) expostas ao cádmio, apresentaram aumento nas enzimas SOD, APx e CAT tanto nos tecidos radiculares quanto foliares (70). Diferentes cultivares de pimenta (*Capsicum annuum*) foram expostos ao cádmio, onde a maior concentração resultou em um aumento na

atividade das enzimas antioxidantes glutaciona redutase e guaiacol-peroxidase. Entretanto a CAT e a SOD apresentaram uma diminuição (71). Plantas de *A. thaliana* resistentes ao cádmio, apresentaram elevada atividade das enzimas SOD, guaiacol-peroxidase, APx e glutaciona redutase (72). Da mesma forma, plantas de mostarda (*Brassica juncea*) e trigo também reduziram o estresse causado por este metal pesado através do aumento das atividades de APx, CAT e glutaciona redutase (73,74).

O aumento na atividade da CAT e da APx em partes aéreas e raízes de plantas de azevém (*Lolium perene*) reduziu os danos causados pelo alumínio (75). Plantas de mirtilo (*Vaccinium corymbosum*) expostas ao alumínio, também apresentaram um aumento nas enzimas SOD e CAT (76). Da mesma forma, plantas de feijão-mungo (*Vigna radiata*) aumentaram as atividades das enzimas antioxidantes CAT, POX e SOD quando expostas a este metal (77). Em *Camellia sinensis* (chá verde) exposta ao alumínio, ocorreu a elevação das atividades da CAT e da guaiacol-peroxidase na fase inicial de exposição, seguido de um decréscimo conforme o aumento das concentrações de alumínio. A APx e a glutaciona oscilaram com o aumento das concentrações de alumínio, enquanto a enzima SOD se manteve constante. Estes resultados indicam que, em concentrações baixas de alumínio, o sistema de defesa antioxidante vegetal é capaz de eliminar as ROS, protegendo as plantas; porém em concentrações mais elevadas do metal pesado, ocorre um desequilíbrio entre a formação e desintoxicação do ROS, ocasionando danos à planta (78).

O estresse causado por radiações não ionizantes pode também modular as respostas do sistema antioxidante vegetal. Plantas de cássia (*Cassia auriculata*) e de soja expostas à radiação ultravioleta (UV-B) apresentaram um aumento da atividade das enzimas SOD, CAT e POX, levando a proteção das plantas contra este estresse (79,80). Da mesma forma, cotilédones de girassol (*Helianthus annuus*) expostos à UV-B, apresentaram um aumento de atividade das enzimas antioxidantes, como a glutaciona desidrogenase, a CAT e a guaiacol-peroxidase. Enquanto a APx e a glutaciona redutase não apresentaram alterações em seus níveis de atividade. Assim, a ativação do sistema de defesa antioxidante nestas plantas permitiu a sobrevivência apesar das condições de estresse (81).

O uso do silício na adubação mineral de plantas auxilia na diminuição de estresses ambientais. Neste sentido, a aplicação de silício em plantas de tomate, evita a diminuição das atividades das enzimas antioxidantes SOD e CAT, quando as plantas são submetidas ao déficit hídrico (82). Plantas de trigo tratadas com silício apresentaram uma menor absorção do metal pesado cádmio. Este efeito do silício promoveu também o aumento das enzimas CAT, APx, guaiacol-peroxidase e SOD (83). A aplicação de silício em plantas de arroz resultou na diminuição da toxicidade do arsênico e na promoção das atividades das enzimas SOD, CAT, POX, glutatona, assim como ácido ascórbico (84). Quando expostas à radiação UV-B, as plantas de trigo apresentaram uma diminuição nas enzimas SOD e APX e um aumento na CAT e guaiacol-peroxidase. Contudo, o tratamento prévio com  $\text{NPSiO}_2$ , antes da exposição à radiação, evitou a diminuição tanto da SOD quanto da APX nestas plantas. Este resultado indica que as  $\text{NPSiO}_2$  desencadearam o sistema de defesa antioxidante, protegendo as plantas contra a radiação (85).

#### **1.4 Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPR)**

A rizosfera consiste em uma complexa associação entre plantas e microrganismos do solo, com propriedades de manter e promover o crescimento e a saúde vegetal (86). As PGPR (*Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*) são bactérias que vivem na rizosfera das plantas, apresentando capacidade de influenciar o desenvolvimento vegetal de forma direta ou indireta. Como forma indireta, podem atuar na supressão de patógenos através da liberação de substâncias antagônicas como proteases ou quitinases e até mesmo induzir a resistência sistêmica vegetal. A forma direta pode ser caracterizada pela capacidade de fixação de nitrogênio, síntese de fitormônios, solubilização mineral, entre outros. Estas bactérias podem auxiliar também na absorção de água e minerais, através do crescimento e ramificação do sistema radicular das plantas (86,87).

A utilização de PGPR em plantas pode auxiliar no crescimento e na sanidade vegetal. Em plantas de milho, cultivadas em solo com deficiência de ferro, a aplicação de PGPR melhora o crescimento em altura, diâmetro e peso seco nos tecidos foliares e radiculares (87). A utilização de PGPR (*Pseudomonas plecoglossicida*) em plantas de milho cultivadas em solo salino e com presença de

alumínio, promoveu o crescimento e o aumento da biomassa fresca e seca das raízes; assim como aumento nos parâmetros relacionados à fotossíntese, como clorofila e carboidratos (88). Neste sentido, PGPR isoladas da rizosfera de plantas de milho, foram capazes de produzir ácido indolacético, cianeto de hidrogênio, solubilizar fosfato e produzir sideróforos. Estas bactérias foram capazes de agir em plantas de arroz, aumentando o peso e o comprimento da parte aérea e raiz (89).

Várias espécies do gênero *Streptomyces* são consideradas PGPR. Este gênero pertence ao filo Actinobacteria, são em geral bactérias Gram-positivas com filamentos e produção de esporos. Estas PGPR promovem o crescimento das plantas pois tem capacidade de produzir diversos metabólitos secundários, como hormônios vegetais, antibióticos e compostos orgânicos que agem no crescimento (90).

Diversas linhagens de *Streptomyces* foram descritas como eficazes em estimular o crescimento de plantas, como em *A. thaliana*, arroz e tomate, promovendo o aumento na biomassa das plantas (91–95). Além do crescimento, estas bactérias também têm propriedades que auxiliam na defesa das plantas, como a produção de compostos orgânicos voláteis com propriedade antifúngica (92). Em plantas de trigo (*Triticum aestivum*), bactérias *Streptomyces* estimularam o crescimento e o aumento de biomassa vegetal através da produção de fitase, quitinase e ácido indolacético, bem como a absorção mineral pela produção de sideróforos e a solubilização de fosfato (94).

Em relação ao estresse hídrico, duas linhagens de *Streptomyces* melhoraram o crescimento de plantas de hortelã-pimenta (*Mentha piperita*), assim como a composição de óleos essenciais e o teor de mentol (96). Da mesma forma, dois isolados de *Streptomyces*, obtidos da rizosfera de plantas halófitas (*Cucumis sativus* e *Salicornia europaea*), promoveram o crescimento de Stevia (*Stevia rebaudiana*) mesmo sob estresse salino (97).

Isolados de *Streptomyces* promoveram o crescimento de plantas de alho (*Allium sativum*) através da fixação biológica de nitrogênio e da síntese de ácido indolacético (98). Além da *Streptomyces* promover o crescimento de plantas de pepino (*Cucumis sativus*), também apresentou propriedades antifúngicas contra *Sclerotinia sclerotiorum* devido a produção de ácido jasmônico e ácido salicílico (99). Em plantas de tomate, desafiadas com *Fusarium oxysporum*, isolados de

*Streptomyces* promoveram tanto a defesa vegetal quanto o crescimento, produzindo quitinase, protease, sideróforos e o ácido indolacético (100).

### 1.5 PGPR e nanomateriais

Os benefícios das rizobactérias na agricultura podem ser impactados pelo aumento do uso de produtos tecnológicos contendo nanomateriais. Neste sentido, o resultado das interações entre nanopartículas e bactérias são pouco conhecidos, mas dependem das propriedades físico-químicas dos materiais, grupo bacteriano e estado fisiológico dos microrganismos (18). Nanopartículas de prata (NPAg) estão sendo largamente utilizadas em produtos agrícolas para controle de doenças devido a propriedade bactericida. A adição de NPAg ao solo promoveu alterações na riqueza e na estrutura da comunidade bacteriana, diminuindo a presença de bactérias benéficas, como as envolvidas na ciclagem de carbono, nitrogênio e fósforo, bem como nas relacionadas à inibição de patógenos. Estas alterações podem afetar o crescimento das plantas quanto a absorção de nutrientes e tolerância a estresses (101). Em álamo (*Populus nigra*) exposto a NPAg, as plantas apresentaram uma redução nos grupos de bactérias e na diversidade de fungos (102).

Além da prata, existe uma grande diversidade de elementos utilizados nas nanopartículas. Burke e colaboradores (103) investigaram o efeito de nanopartículas de ferro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) carregadas positiva e negativamente, sobre bactérias fixadoras de nitrogênio em plantas de soja. As nanopartículas de ferro com carga negativa diminuíram a colonização radicular, indicando que o tipo de nanopartícula e a carga podem também influenciar na colonização destas bactérias no sistema radicular (103). O efeito de nanopartículas de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) foi também avaliado em plantas de trigo (*Triticum aestivum*) com e sem a presença de PGPR (*Bacillus thuringiensis* e *Paenibacillus polymyxa*), em solos de turfa e areia, sob estresse hídrico, salino e biótico (patógeno *Fusarium culmorum*). As nanopartículas auxiliaram na adesão radicular das PGPR. As PGPR formuladas com as nanopartículas de titânio apresentaram um efeito positivo na biomassa das plântulas em todas as situações de estresse (104). Nanopartículas de zinco ( $\text{ZnO}$ ), de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) e de cério ( $\text{CeO}_2$ ) aplicados em solo agrícola, prejudicaram o metabolismo termogênico microbiano e reduziu a quantidade de bactérias do gênero *Azotobacter*.

Contudo, de forma geral, nanopartículas de sílica promovem o aumento na atividade microbiana do solo (105). Estes resultados indicam uma grande variedade de respostas na interação entre planta-microrganismo-nanopartícula, sendo necessário o entendimento desta interação para prever o efeito e o destino destas nanopartículas no ambiente. Entretanto, poucos trabalhos quantitativos têm sido realizados nesta área (18).

## 2 JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento sustentável é cada vez mais urgente, visto que até 2050 a população mundial chegará em 9 bilhões. Neste sentido, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho (36), com 80 milhões de hectares plantados (106). Sendo assim, é importante novas abordagens para a melhoria da produção desta lavoura. A nanotecnologia tem tido um papel importante nesse aspecto, como a utilização de produtos com nanopartículas (107). Neste contexto, a nanotecnologia tem se mostrado como uma área ampla e promissora, gerando novas possibilidades para transformar práticas agrícolas convencionais. Contudo, ainda se conhece pouco em relação ao impacto das nanoestruturas sobre os microrganismos autóctones que podem ser empregados no manejo da lavoura de milho, como as bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPR). Dentre os potenciais microrganismos com características PGPR em milho, destacamos as bactérias do gênero *Streptomyces*. Para tanto, avaliou-se a interação entre nanopartículas de sílica (NPSiO<sub>2</sub>), PGPR e o crescimento de plantas de milho.

### 3 HIPÓTESES

- 1) Nanopartículas de sílica possuem baixa fitotoxicidade em plantas de milho;
- 2) Nanopartículas de sílica modulam o crescimento de plantas de milho;
- 3) Nanopartículas de sílica não interferem na promoção do crescimento de plantas de milho mediado por rizobactérias *Streptomyces* (CLV16).

### 4 OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos de nanopartículas de sílica em sementes e plantas de milho, assim como na presença e ausência do isolado de *Streptomyces* CLV16.

#### 4.2 Objetivos específicos

- Avaliar a toxicidade de nanopartículas de sílica na germinação de sementes de milho;
- Avaliar a toxicidade de nanopartículas de sílica no desenvolvimento inicial de plântulas de milho
- Avaliar o crescimento de plantas de milho tratadas com nanopartículas de sílica;
- Determinar a atividade de enzimas de estresse oxidativo em plantas de milho tratadas com nanopartículas de sílica;
- Avaliar a interação entre nanopartículas de sílica e bactéria *Streptomyces* CLV16 no crescimento de plantas de milho;
- Avaliar o crescimento de plantas de milho tratadas com nanopartículas de sílica e bactéria *Streptomyces* CLV16.



## REFERÊNCIAS

- (1) Qian, H.; Peng, X.; Han, X.; Ren, J.; Sun, L.; Fu, Z. Comparison of the Toxicity of Silver Nanoparticles and Silver Ions on the Growth of Terrestrial Plant Model *Arabidopsis thaliana*. *J. Environ. Sci. (Beijing, China)* **2013**, *25* (9), 1947–1955. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(12\)60301-5](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(12)60301-5).
- (2) Kole, C.; Kumar, S.; Khodakovskaya, M. V.; Banerjee, J. *Nanotechnology*; Springer International Publishing Switzerland, 2016.
- (3) Caruthers, S. D.; Wickline, S. A.; Lanza, G. M. Nanotechnological Applications in Medicine. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2007**, *18* (1), 26–30. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.01.006>.
- (4) Nair, R.; Varghese, S. H.; Nair, B. G.; Maekawa, T.; Yoshida, Y.; Kumar, D. S. Nanoparticulate Material Delivery to Plants. *Plant Sci.* **2010**, *179* (3), 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.04.012>.
- (5) Li, P.; Du, Y.; Huang, L.; Mitter, N.; Xu, Z. P. Nanotechnology Promotes the R&D of New-Generation Micronutrient Foliar Fertilizers. *RSC Adv.* **2016**, *6* (73), 69465–69478. <https://doi.org/10.1039/C6RA09428G>.
- (6) Hughes, D. L.; Afsar, A.; Laventine, D. M.; Shaw, E. J.; Harwood, L. M.; Hodson, M. E. Metal Removal from Soil Leachates Using DTPA-Functionalised Maghemite Nanoparticles, a Potential Soil Washing Technology. *Chemosphere* **2018**, *209*, 480–488. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.121>.
- (7) Zhang, W. X. Nanoscale Iron Particles for Environmental Remediation: An Overview. *J. Nanoparticle Res.* **2003**, *5* (3–4), 323–332. <https://doi.org/10.1023/A:1025520116015>.
- (8) Wang, P.; Lombi, E.; Zhao, F. J.; Kopittke, P. M. Nanotechnology: A New Opportunity in Plant Sciences. *Trends Plant Sci.* **2016**, *21* (8), 699–712. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.04.005>.
- (9) Khodakovskaya, M. V.; Kim, B.-S.; Kim, J. N.; Alimohammadi, M.; Dervishi, E.; Mustafa, T.; Cernigla, C. E. Carbon Nanotubes as Plant Growth Regulators: Effects on Tomato Growth, Reproductive System, and Soil Microbial Community. *Small* **2013**, *9* (1), 115–123. <https://doi.org/10.1002/smll.201201225>.
- (10) Laware, S. L.; Raskar, S. Influence of Zinc Oxide Nanoparticles on Growth, Flowering and Seed Productivity in Onion. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **2014**, *3* (7), 874–881.
- (11) Ngo, Q. B.; Dao, T. H.; Nguyen, H. C.; Tran, X. T.; Van Nguyen, T.; Khuu, T. D.; Huynh, T. H. Effects of Nanocrystalline Powders (Fe, Co and Cu) on the Germination, Growth, Crop Yield and Product Quality of Soybean (Vietnamese Species DT-51). *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* **2014**, *5* (1). <https://doi.org/10.1088/2043-6262/5/1/015016>.
- (12) Rossi, L.; Fedenia, L. N.; Sharifan, H.; Ma, X.; Lombardini, L. Effects of Foliar Application of Zinc Sulfate and Zinc Nanoparticles in Coffee (*Coffea Arabica* L.) Plants. *Plant Physiol. Biochem.* **2019**, *135*, 160–166. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.12.005>.
- (13) Ali, S.; Rizwan, M.; Noureen, S.; Anwar, S.; Ali, B.; Naveed, M.; Fathi, E.; Allah, A.; Alqarawi, A. A.; Ahmad, P. Combined Use of Biochar and Zinc Oxide Nanoparticle Foliar Spray Improved the Plant Growth and Decreased the Cadmium Accumulation in Rice (*Oryza sativa* L.) Plant. *Environ. Sci.*

- Pollut. Res.* **2019**, 1–12.
- (14) Ali, S. M.; Yousef, N. M. H.; Nafady, N. A. Application of Biosynthesized Silver Nanoparticles for the Control of Land Snail *Eobania vermiculata* and Some Plant Pathogenic Fungi. *J. Nanomater.* **2015**, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/218904>.
  - (15) El-Rahman, A. F. A.; Mohammad, T. G. M. Green Synthesis of Silver Nanoparticle Using *Eucalyptus globulus* Leaf Extract and its Antibacterial Activity. *J. Appl. Sci. Res.* **2014**, 10, 6437–6440.
  - (16) Khadri, H.; Alzohairy, M.; Janardhan, A.; Kumar, A. P.; Narasimha, G. Green Synthesis of Silver Nanoparticles with High Fungicidal Activity from Olive Seed Extract. *Adv. Nanoparticles* **2013**, 02 (03), 241–246. <https://doi.org/10.4236/anp.2013.23034>.
  - (17) Hafez, E. E.; Hassan, H. S.; Elkady, M. F.; Salama, E. Assessment of Antibacterial Activity for Synthesized Zinc Oxide Nanorods Against Plant Pathogenic Strains. *Int. J. Sci. Technol. Res.* **2014**, 3 (9), 318–324.
  - (18) Aruguete, D. M.; Hochella, M. F. Bacteriananoparticle Interactions and Their Environmental Implications. *Environ. Chem.* **2010**, 7 (1), 3–9. <https://doi.org/10.1071/EN09115>.
  - (19) Raigond, P.; Raigond, B.; Kaundal, B.; Singh, B.; Joshi, A.; Dutt, S. Effect of Zn Nanoparticles on Antioxidative System of Potato Plants. *J. Env. Biol.* **2017**, 38, 435–439.
  - (20) Burman, U.; Saini, M.; Kumar, P. Effect of Zinc Oxide Nanoparticles on Growth and Antioxidant System of Chickpea Seedlings. *Toxicol. Environ. Chem.* **2013**, 95 (4), 605–612. <https://doi.org/10.1080/02772248.2013.803796>.
  - (21) Miwa, K.; Kamiya, T.; Fujiwara, T. Homeostasis of the Structurally Important Micronutrients, B and Si. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2009**, 12 (3), 307–311. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.04.007>.
  - (22) Ma, J. F.; Yamaji, N. Silicon Uptake and Accumulation in Higher Plants. *Trends Plant Sci.* **2006**, 11 (8), 392–397. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.06.007>.
  - (23) Ma, J. F. Role of Silicon in Enhancing the Resistance of Plants to Biotic and Abiotic Stresses. *Soil Sci. Plant Nutr.* **2004**, 50 (1), 11–18. <https://doi.org/10.1080/00380768.2004.10408447>.
  - (24) Al-aghabary, K.; Zhu, Z.; Shi, Q. Influence of Silicon Supply on Chlorophyll Content, Chlorophyll Fluorescence, and Antioxidative Enzyme Activities in Tomato Plants under Salt Stress. *J. Plant Nutr.* **2004**, 27 (12), 2101–2115. <https://doi.org/10.1081/LPLA-200034641>.
  - (25) Liang, Y.; Chen, Q.; Liu, Q.; Zhang, W.; Ding, R. Exogenous Silicon (Si) Increases Antioxidant Enzyme Activity and Reduces Lipid Peroxidation in Roots of Salt-Stressed Barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Plant Physiol.* **2003**, 160 (10), 1157–1164. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-01065>.
  - (26) Liang, Y.; Nikolic, M.; Bélanger, R.; Gong, H.; Song, A. *Silicon in Agriculture*; 2015; Vol. 8. [https://doi.org/10.1016/S0928-3420\(01\)80010-0](https://doi.org/10.1016/S0928-3420(01)80010-0).
  - (27) Subbenaik, S. C. Physical and Chemical Nature of Nanoparticles. In: *Plant Nanotechnology*, Kole, C.; Kumar, S.; Khodakovskaya, M. V., Eds., Springer International Publishing Switzerland, 2016, p. 15-28
  - (28) Shukla, P. K.; Misra, P.; Kole, C. Uptake, Translocation, Accumulation, Transformation, and Generational Transmission of Nanoparticles in Plants. In: *Plant Nanotechnology*, Kole, C.; Kumar, S.; Khodakovskaya, M. V., Eds., Springer International Publishing Switzerland, 2016, p. 219-256.

- (29) Ali, S.; Rizwan, M.; Hussain, A.; Zia, M.; Ali, B.; Yousaf, B.; Wijaya, L.; Nasser, M.; Ahmad, P. Silicon Nanoparticles Enhanced the Growth and Reduced the Cadmium Accumulation in Grains of Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol. Biochem.* **2019**, *140*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.04.041>.
- (30) Mahmoud, M. A.; Shala, A. Y.; Rashed, N. M. The Mutual Effect of Irrigation Scheduling and Foliar Spray of Silica Nanoparticles on Basil Plant. *J. Plant Prod.* **2018**, *8* (12), 1303–1313.
- (31) Slomberg, D. L.; Schoenfisch, M. H. Silica Nanoparticle Phytotoxicity to *Arabidopsis thaliana*. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46* (18), 10247–10254. <https://doi.org/10.1021/es300949f>.
- (32) Farhangi-Abriz, S.; Torabian, S. Nano-Silicon Alters Antioxidant Activities of Soybean Seedlings under Salt Toxicity. *Protoplasma* **2018**, *255* (3), 953–962. <https://doi.org/10.1007/s00709-017-1202-0>.
- (33) Emamverdian, A.; Ding, Y.; Mokhberdoran, F.; Xie, Y.; Zheng, X.; Wang, Y. Silicon Dioxide Nanoparticles Improve Plant Growth by Enhancing Antioxidant Enzyme Capacity in Bamboo (*Pleioblastus pygmaeus*) under Lead Toxicity. *Trees - Struct. Funct.* **2019**, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s00468-019-01929-z>.
- (34) Mushtaq, A.; Jamil, N.; Rizwan, S.; Mandokhel, F.; Riaz, M.; Hornyak, G. L.; Malghani, M. N.; Shahwani, M. N. Engineered Silica Nanoparticles and Silica Nanoparticles Containing Controlled Release Fertilizer for Drought and Saline Areas. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* **2018**, *414* (1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/414/1/012029>.
- (35) Piperno, D. R.; Flannery, K. V. The Earliest Archaeological Maize (*Zea mays* L.) from Highland Mexico: New Accelerator Mass Spectrometry Dates and Their Implications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98* (4), 2101–2103. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.4.2101>.
- (36) Silveira, D. C.; Bonetti, L. P.; Tragnago, J. L.; Neto, N.; Monteiro, V. Caracterização Agromofológica de Variedades de Milho Crioulo (*Zea mays* L.) Na Região Noroeste Do Rio Grande Do Sul. *Rev. Ciência e Tecnol.* **2015**, *1* (1), 01–11.
- (37) Baldo, M. N. Comportamento Anatômico, Fisiológico e Agrônômico Do Milho (*Zea mays* L.) Submetido a Estresses de Ambiente Em Diferentes Estádios Fenológicos., Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- (38) FEDERAÇÃO DAS INDÚSTRIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO. Boletim informativo Safra Mundial de Milho. Informativo fevereiro 2020. [Online], **2020**. <http://www.fiesp.com.br/indices-pesquisas-e-publicacoes/safra-mundial-de-milho-2/>. (acesso em 17 fev 2020).
- (39) Magalhães, P. C.; Durães, F. O. M. Fisiologia da Produção de Milho. *Circ. Técnicas Embrapa* **2006**, *76*, 10. <https://doi.org/ISSN 1679-1150>.
- (40) Schiessl, M. Fenologia-milho <https://blog.aegro.com.br/controle-de-spodoptera-frugiperda-no-milho/2-fenologia-milho/> (accessed Sep 13, 2018).
- (41) Ritchie, S. W.; Hanway, J. J.; Benson, G. O. Como a Planta de Milho Se Desenvolve. *Arq. do Agrônomo* **2003**, *15* (103), 1–20.
- (42) Paterniani, E.; Nass, L. L.; Santos, M. X. O Valor dos Recursos Genéticos de Milho Para o Brasil: Uma Abordagem Histórica da Utilização do Germoplasma. In: *Uma História Brasileira do Milho: O Valor dos Recursos Genéticos*, Bahia, A., Filho; Paterniani, E.; Cordeiro, C. M. T.; Garcia, J. C.;

- Magalhães, J. R.; Nass, L. L.; Santos, M. X.; Andrade, R. V.; Parentoni, S.; Abadie, T., Eds., Brasília: Paralelo, 2000, p.11-41.
- (43) Garcia, J. C.; Mattoso, M. J.; Duarte, J. de O.; Cruz, J. C. Aspectos Econômicos Da Produção e Utilização Do Milho. *Circ. Técnica Embrapa* **2006**, 12.
- (44) De Quadros, P. D.; Roesch, L. F. W.; Da Silva, P. R. F.; Vieira, V. M.; Roehrs, D. D.; Camargo, F. A. O. Desempenho Agrônômico a Campo de Híbridos de Milho Inoculados com *Azospirillum*. *Rev. Ceres* **2014**, 61 (2), 209–218. <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2014000200008>.
- (45) Schulze, E.-D.; Beck, E.; Müller-Hohenstein, K. *Plant Ecology*; Springer Berlin Heidelberg, 2005.
- (39) Coelho, A. M. Nutrição e Adubação do Milho. *Circ. Técnica Embrapa* **2006**, 10.
- (46) Habibi, G. Effect of Foliar-Applied Silicon on Photochemistry, Antioxidant Capacity and Growth in Maize Plants Subjected to Chilling Stress. *Acta Agric. Slov.* **2016**, 107 (1), 33–43. <https://doi.org/10.14720/aas.2016.107.1.04>.
- (47) Suriyaprabha, R.; Karunakaran, G.; Yuvakkumar, R.; Prabu, P.; Rajendran, V.; Kannan, N. Growth and Physiological Responses of Maize (*Zea mays* L.) to Porous Silica Nanoparticles in Soil. *J. Nanoparticle Res.* **2012**, 14 (12). <https://doi.org/10.1007/S11051-012-1294-6>.
- (48) Rangaraj, S.; Gopalu, K.; Rathinam, Y.; Periasamy, P.; Venkatachalam, R.; Narayanasamy, K. Effect of Silica Nanoparticles on Microbial Biomass and Silica Availability in Maize Rhizosphere. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2014**, 61 (6), 668–675. <https://doi.org/10.1002/bab.1191>.
- (49) Vasconcelos, A. C. F. de; Zhang, X.; Ervin, E. H.; Kiehl, J. de C. Enzymatic Antioxidant Responses to Biostimulants in Maize and Soybean Subjected to Drought. *Sci. Agric.* **2009**, 66 (3), 395–402. <https://doi.org/10.1590/s0103-90162009000300015>.
- (50) Jones, J. D. G.; Dangl, J. L. The Plant Immune System. *Nat. Publ. Gr.* **2006**, 444, 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>.
- (51) Zipfel, C.; Felix, G. Plants and Animals: A Different Taste for Microbes? *Curr. Opin. Plant Biol.* **2005**, 8, 353–360. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.05.004>.
- (52) Meena, K. K.; Sorty, A. M.; Bitla, U. M.; Choudhary, K.; Gupta, P.; Pareek, A.; Singh, D. P.; Prabha, R.; Sahu, P. K.; Gupta, V. K.; et al. Abiotic Stress Responses and Microbe-Mediated Mitigation in Plants: The Omics Strategies. *Front. Plant Sci.* **2017**, 8 (February), 1–25. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00172>.
- (53) Barbosa, M. R.; Willadino, L.; Ulisses, C.; Camara, T. R. Geração e Desintoxicação Enzimática de Espécies Reativas de Oxigênio em Plantas. *Ciência Rural* **2014**, 44 (3), 453–460.
- (54) Laxa, M.; Liebthal, M.; Telman, W.; Chibani, K.; Dietz, K. J. The Role of the Plant Antioxidant System in Drought Tolerance. *Antioxidants* **2019**, 8 (4). <https://doi.org/10.3390/antiox8040094>.
- (55) Pandhair, V.; Sekhon, B. S. Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Plants: An Overview. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* **2006**, 15, 71–78.
- (56) Jha, Y.; Subramanian, R. B. Reduced Cell Death and Improved Cell Membrane Integrity in Rice under Salinity by Root Associated Bacteria. *Theor. Exp. Plant Physiol.* **2015**, 27 (3), 227–235. <https://doi.org/10.1007/s40626-015-0047-1>.
- (57) Passardi, F.; Cosio, C.; Penel, C.; Dunand, C. Peroxidases Have More

- Functions than a Swiss Army Knife. *Plant Cell Rep.* **2005**, *24* (5), 255–265. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0972-6>.
- (58) Koussevitzky, S.; Suzuki, N.; Huntington, S.; Armijo, L.; Sha, W.; Cortes, D.; Shulaev, V.; Mittler, R. Ascorbate Peroxidase 1 Plays a Key Role in the Response of *Arabidopsis thaliana* to Stress Combination. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (49), 34197–34203. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806337200>.
- (59) Chaitanya, K. V.; Sundar, D.; Masilamani, S.; Reddy, A. R. Variation in Heat Stress-Induced Antioxidant Enzyme Activities among Three Mulberry Cultivars. *Plant Growth Regul.* **2002**, *36*, 175–180.
- (60) Hsu, Y. T.; Kao, C. H. Heat Shock-Mediated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Accumulation and Protection against Cd Toxicity in Rice Seedlings. *Plant Soil* **2007**, *300* (1–2), 137–147. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9396-0>.
- (61) Ajithkumar, I. P.; Panneerselvam, R. ROS Scavenging System, Osmotic Maintenance, Pigment and Growth Status of *Panicum sumatrense* Roth . Under Drought Stress. *Cell Biochem. Biophys.* **2014**, *68*, 587–595. <https://doi.org/10.1007/s12013-013-9746-x>.
- (62) Kausar, R.; Hossain, Z.; Makino, T.; Komatsu, S. Characterization of Ascorbate Peroxidase in Soybean under Flooding and Drought Stresses. *Mol. Biol. Rep.* **2012**, *39*, 10573–10579. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-1945-9>.
- (63) Verma, K. K. .; Singh, R. K.; Song, Q. Q.; Singh, P.; Zhang, B.-Q.; Song, X.-P.; Chen, G.-L.; Li, Y. R. Silicon Alleviates Drought Stress of Sugarcane Plants by Improving Antioxidant Responses. *Biomed. J. Sci. Tech. Res.* **2019**, *17* (1), 12580–12586. <https://doi.org/10.26717/bjstr.2019.17.002957>.
- (64) Shawon, R. A.; Kang, B. S.; Lee, S. G.; Kim, S. K.; Lee, H. J.; Katrich, E.; Gorinstein, S.; Ku, Y. G. Influence of Drought Stress on Bioactive Compounds, Antioxidant Enzymes and Glucosinolate Contents of Chinese Cabbage (*Brassica rapa*). *Food Chem.* **2020**, *308* (125657), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125657>.
- (65) Abedi, T.; Pakniyat, H. Antioxidant Enzyme Changes in Response to Drought Stress in Ten Cultivars of Oilseed Rape (*Brassica napus* L.). *Czech J. Genet. Plant Breed.* **2010**, *46* (1), 27–34.
- (66) Mallik, S.; Nayak, M.; Sahu, B. B.; Panigrahi, A. K.; Shaw, B. P. Response of Antioxidant Enzymes to High NaCl Concentration in Different Salt-Tolerant Plants. *Biol. Plant.* **2011**, *55* (1), 191–195.
- (67) Eyidogan, F.; Öz, M. T. Effect of Salinity on Antioxidant Responses of Chickpea Seedlings. *Acta Physiol. Plant.* **2007**, *29* (5), 485–493. <https://doi.org/10.1007/s11738-007-0059-9>.
- (68) AbdElgawad, H.; Zinta, G.; Hegab, M. M.; Pandey, R.; Asard, H.; Abuelsoud, W. High Salinity Induces Different Oxidative Stress and Antioxidant Responses in Maize Seedlings Organs. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7* (MAR2016), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00276>.
- (69) Balestrasse, K. B.; Gardey, L.; Gallego, S. M.; Tomaro, M. L. Response of Antioxidant Defence System in Soybean Nodules and Roots Subjected to Cadmium Stress. *Aust. J. Plant Physiol.* **2001**, *28*, 497–504.
- (70) Ianelli, M. A.; Pietrini, F.; Fiore, L.; Pettrilli, L.; Massacci, A. Antioxidant Response to Cadmium in *Phragmites australis* Plants. *Plant Physiol. Biochem.* **2002**, *40*, 977–982.
- (71) León, A. M.; Palma, J. M.; Corpas, F. J.; Gómez, M.; Romero-Puertas, M. C.; Chatterjee, D.; Mateos, R. M.; Luis, A.; Sandalio, L. M. Antioxidative

- Enzymes in Cultivars of Pepper Plants with Different Sensitivity to Cadmium. *Plant Physiol. Biochem.* **2002**, *40*, 813–820.
- (72) Cho, U.; Seo, N. Oxidative Stress in *Arabidopsis thaliana* Exposed to Cadmium is Due to Hydrogen Peroxide Accumulation. *Plant Sci.* **2005**, *168*, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.07.021>.
- (73) Mobin, M.; Khan, N. A. Photosynthetic Activity, Pigment Composition and Antioxidative Response of Two Mustard (*Brassica juncea*) Cultivars Differing in Photosynthetic Capacity Subjected to Cadmium Stress. *J. Plant Physiol.* **2007**, *164* (5), 601–610. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.03.003>.
- (74) Khan, N. A.; Samiullah; Singh, S.; Nazar, R. Activities of Antioxidative Enzymes, Sulphur Assimilation, Photosynthetic Activity and Growth of Wheat (*Triticum aestivum*) Cultivars Differing in Yield Potential under Cadmium Stress. *J. Agron. Crop Sci.* **2007**, *193* (6), 435–444. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2007.00272.x>.
- (75) Pontigo, S.; Godoy, K.; Jiménez, H.; Gutiérrez-Moraga, A.; Mora, M. D. L. L.; Cartes, P. Silicon-Mediated Alleviation of Aluminum Toxicity by Modulation of Al/Si Uptake and Antioxidant Performance in Ryegrass Plants. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8* (April), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00642>.
- (76) Ulloa-Inostroza, E. M.; Alberdi, M.; Ivanov, A. G.; Reyes-Díaz, M. Protective Effect of Methyl Jasmonate on Photosynthetic Performance and Its Association with Antioxidants in Contrasting Aluminum-Resistant Blueberry Cultivars Exposed to Aluminum. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* **2019**, *19* (1), 203–216. <https://doi.org/10.1007/s42729-019-0006-z>.
- (77) Ali, B. Salicylic Acid Induced Antioxidant System Enhances the Tolerance to Aluminium in Mung Bean (*Vigna radiata* L. Wilczek) Plants. *Indian J. Plant Physiol.* **2017**, *22* (2), 178–189. <https://doi.org/10.1007/s40502-017-0292-1>.
- (78) Li, C.; Xu, H.; Xu, J.; Chun, X.; Ni, D. Effects of Aluminium on Ultrastructure and Antioxidant Activity in Leaves of Tea Plant. *Acta Physiol. Plant.* **2011**, *33* (3), 973–978. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0629-0>.
- (79) Agarwal, S. Increased Antioxidant Activity in *Cassia* Seedlings under UV-B Radiation. *Biol. Plant.* **2007**, *51* (1), 157–160. <https://doi.org/10.1007/s10535-007-0030-z>.
- (80) Prasad, S. M.; Dwivedi, R.; Zeeshan, M. Growth, Photosynthetic Electron Transport, and Antioxidant Responses of Young Soybean Seedlings to Simultaneous Exposure of Nickel and UV-B Stress. *Photosynthetica* **2005**, *43* (2), 177–185. <https://doi.org/10.1007/s11099-005-0031-0>.
- (81) Costa, H.; Gallego, S. M.; Tomaro, M. L. Effect of UV-B Radiation on Antioxidant Defense System in Sunflower Cotyledons. *Plant Sci.* **2002**, *162* (6), 939–945. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00051-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00051-1).
- (82) Cao, B. li; Wang, L.; Gao, S.; Xia, J.; Xu, K. Silicon-Mediated Changes in Radial Hydraulic Conductivity and Cell Wall Stability are Involved in Silicon-Induced Drought Resistance in Tomato. *Protoplasma* **2017**, *254* (6), 2295–2304. <https://doi.org/10.1007/s00709-017-1115-y>.
- (83) Naeem, A.; Saifullah; Zia-ur-Rehman, M.; Akhtar, T.; Zia, M. H.; Aslam, M. Silicon Nutrition Lowers Cadmium Content of Wheat Cultivars by Regulating Transpiration Rate and Activity of Antioxidant Enzymes. *Environ. Pollut.* **2018**, *242*, 126–135. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.06.069>.
- (84) Geng, A.; Wang, X.; Wu, L.; Wang, F.; Wu, Z.; Yang, H.; Chen, Y.; Wen, D.; Liu, X. Silicon Improves Growth and Alleviates Oxidative Stress in Rice

- Seedlings (*Oryza sativa* L.) by Strengthening Antioxidant Defense and Enhancing Protein Metabolism under Arsanilic Acid Exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2018**, *158* (20), 266–273. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.050>.
- (85) Tripathi, D. K.; Singh, S.; Singh, V. P.; Prasad, S. M.; Dubey, N. K.; Chauhan, D. K. Silicon Nanoparticles More Effectively Alleviated UV-B Stress than Silicon in Wheat (*Triticum aestivum*) Seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* **2017**, *110*, 70–81. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.06.026>.
- (86) Kalam, S.; Das, S. N.; Basu, A.; Podile, A. R. Population Densities of Indigenous Acidobacteria Change in the Presence of Plant Growth Promoting Rhizobacteria ( PGPR ) in Rhizosphere. *J. Basic Microbiol.* **2017**, *9999*, 1–10. <https://doi.org/10.1002/jobm.201600588>.
- (87) Amogou, O.; Agbodjato, N. A.; Dagbénonbakin, G.; Noumavo, P. A.; Sina, H.; Sylvestre, A. A.; Adoko, M. Y.; Nounagnon, M.; Kakai, R. G.; Adjanohoun, A.; et al. Improved Maize Growth in Condition Controlled by PGPR Inoculation on Ferruginous Soil in Central Benin. *Food Nutr. Sci.* **2019**, *10*, 1433–1451. <https://doi.org/10.4236/fns.2019.1012102>.
- (88) Zerrouk, I. Z.; Rahmoune, B.; Khelifi, L.; Mounir, K.; Baluska, F. Algerian Sahara PGPR Confers Maize Root Tolerance to Salt and Aluminum Toxicity via ACC Deaminase and IAA. *Acta Physiol. Plant.* **2019**, *41* (6), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11738-019-2881-2>.
- (89) Karnwal, A. Isolation and Identification of Plant Growth Promoting Rhizobacteria from Maize (*Zea mays* L.) Rhizosphere and Their Plant Growth Promoting Effect on Rice (*Oryza sativa* L.). *J. Plant Prot. Res.* **2017**, *57* (2), 144–151. <https://doi.org/10.1515/jppr-2017-0020>.
- (90) Viaene, T.; Langendries, S.; Beirinckx, S.; Maes, M.; Goormachtig, S. *Streptomyces* as a Plant's Best Friend? *FEMS Microbiol. Ecol.* **2016**, *92*, 1–10. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw119>.
- (91) Lin, L.; Xu, X. Indole-3-Acetic Acid Production by Endophytic *Streptomyces* Sp . En-1 Isolated from Medicinal Plants. *Curr Microbiol* **2013**, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0348-z>.
- (92) Cordovez, V.; Carrion, V. J.; Etalo, D. W.; Mumm, R.; Zhu, H. Diversity and Functions of Volatile Organic Compounds Produced by *Streptomyces* from a Disease-Suppressive Soil. *Front. Microbiol.* **2015**, *6* (October), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01081>.
- (93) Gopalakrishnan, S.; Vadlamudi, S.; Bandikinda, P.; Sathya, A.; Vijayabharathi, R.; Rupela, O.; Kudapa, H.; Katta, K.; Varshney, R. K. Evaluation of *Streptomyces* Strains Isolated from Herbal Vermicompost for Their Plant Growth-Promotion Traits in Rice. *Microbiol. Res.* **2014**, *169* (1), 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.008>.
- (94) Jog, R.; Pandya, M.; Nareshkumar, G.; Rajkumar, S. Mechanism of Phosphate Solubilization and Antifungal Activity of *Streptomyces* Spp . Isolated from Wheat Roots and Rhizosphere and Their Application in Improving Plant Growth. *Microbiology* **2014**, *160*, 778–788. <https://doi.org/10.1099/mic.0.074146-0>.
- (95) Palaniyandi, S. A.; Damodharan, K.; Yang, S. H.; Suh, J. W. *Streptomyces* Sp. Strain PGPA39 Alleviates Salt Stress and Promotes Growth of ' Micro Tom ' Tomato Plants. *J. Appl. Microbiol.* **2014**, *117*, 766–773. <https://doi.org/10.1111/jam.12563>.
- (96) Zade, N. S. E.; Sadeghi, A.; Moradi, P. *Streptomyces* Strains Alleviate Water

- Stress and Increase Peppermint (*Mentha piperita*) Yield and Essential Oils. *Plant Soil* **2018**.
- (97) Tolba, S. T. M.; Ibrahim, M.; Amer, E. A. M.; Ahmed, D. A. M. First Insights into Salt Tolerance Improvement of Stevia by Plant Growth-promoting *Streptomyces* Species. *Arch. Microbiol.* **2019**, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01696-y>.
- (98) Condori-Pacsi, S. J., Fernández-Guzman, P. R., Valderrama-Valencia, M. R. Aislamiento y Caracterización de *Streptomyces* Spp Rizosféricos Promotores Del Crecimiento Vegetal. *IDESIA (Chile)* **2019**, 37 (2), 109–116.
- (99) Mun, B.-G.; Lee, W.-H.; Kang, S.-M.; Lee, S.-U.; Lee, S.-M.; Lee, D. Y.; Shahid, M.; Yun, B.-W.; Lee, I.-J. *Streptomyces* Sp . LH 4 Promotes Plant Growth and Resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* in Cucumber via Modulation of Enzymatic and Defense Pathways. *Plant Soil* **2020**, 1–17.
- (100) Abbasi, S.; Safaie, N.; Sadeghi, A.; Shamsbakhsh, M. *Streptomyces* Strains Induce Resistance to *Fusarium oxysporum* f . Sp . *lycopersici* Race 3 in Tomato Through Different Molecular Mechanisms. *Front. Microbiol.* **2019**, 10 (1505), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01505>.
- (101) Zhang, H.; Huang, M.; Zhang, W.; Gardea-Torresdey, J. L.; White, J. C.; Ji, R.; Zhao, L. Silver Nanoparticles Alter Soil Microbial Community Compositions and Metabolite Profiles in Unplanted and Cucumber-Planted Soil. *Environ. Sci. Technol.* **2020**, 1–33. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b07562>.
- (102) Vitali, F.; Raio, A.; Sebastiani, F.; Cherubini, P.; Cavalieri, D.; Coccozza, C. Environmental Pollution Effects on Plant Microbiota: The Case Study of Poplar Bacterial-Fungal Response to Silver Nanoparticles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, 103 (19), 8215–8227.
- (103) Burke, D. J.; Pietrasiak, N.; Situ, S. F.; Abenojar, E. C.; Porche, M.; Kraj, P.; Lakliang, Y.; Samia, A. C. S. Iron Oxide and Titanium Dioxide Nanoparticle Effects on Plant Performance and Root Associated Microbes. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, 16 (10), 23630–23650. <https://doi.org/10.3390/ijms161023630>.
- (104) Timmusk, S.; Seisenbaeva, G.; Behers, L. Titania (TiO<sub>2</sub>) Nanoparticles Enhance the Performance of Growth-Promoting Rhizobacteria. *Sci. Rep.* **2018**, 8 (1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18939-x>.
- (105) Chai, H.; Yao, J.; Sun, J.; Zhang, C.; Liu, W.; Zhu, M.; Ceccanti, B. The Effect of Metal Oxide Nanoparticles on Functional Bacteria and Metabolic Profiles in Agricultural Soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2015**, 94 (4), 490–495. <https://doi.org/10.1007/s00128-015-1485-9>.
- (106) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. **2020**. [Online] <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618#resultado>. (acesso em 17 fev 2020).
- (107) Su, Y.; Ashworth, V.; Kim, C.; Adeleye, A. S.; Rolshausen, P.; Roper, C.; Jassby, D. Delivery, Uptake, Fate, and Transport of Engineered Nanoparticles in Plants: A Critical Review and Data Analysis. *Environ. Sci. Nano* **2019**. <https://doi.org/10.1039/C9EN00461K>.



**CAPÍTULO II****Manuscrito a ser submetido a periódico científico****Impact of silica nanoparticles on rhizobacterium *Streptomyces* CLV16 and maize plants (*Zea mays* L.)**

Andressa Negreiros Flores Pilati Navarro<sup>a</sup>, Vitória Elsner Rodrigues<sup>a</sup>, Elisa Magno Nunes de Oliveira<sup>b</sup>, Ricardo Meurer Papaleo<sup>b</sup>, Leandro Vieira Astarita<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Plant Biotechnology, School of Health and Life Sciences, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul

<sup>b</sup>Interdisciplinary Center for Nanoscience and Micro-Nanotechnology, School of Technology, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul

\*Corresponding Author.

E-mail address: [astarita@pucrs.br](mailto:astarita@pucrs.br) (L.V. Astarita).

Journal of agricultural and food chemistry (JCR 3.57 – Qualis A1)

<https://pubs.acs.org/journal/jafcau>

## ABSTRACT

Nanotechnology has been incorporated in numerous technological products that represent innovative tools for food production. NPSiO<sub>2</sub> in agriculture is still considered a novel approach as they are more reactive than their bulk counterparts. Plant growth promoting rhizobacteria, such as *Streptomyces*, are used in the management of many agricultural crops due to their beneficial effects. The aim of this work was to evaluate the NPSiO<sub>2</sub> in maize plants and its interaction to the rhizobacteria *Streptomyces* (CLV16). The results showed that NPSiO<sub>2</sub> have no effect on seed germination rate, although NPSiO<sub>2</sub> 63 nm and 110 nm impaired the initial growth of seedling roots. When seeds were exposed to NPSiO<sub>2</sub>, the 220 nm showed a deleterious effect on plant growth at 45 days. However, plants germinated from seeds treated with NPSiO<sub>2</sub> 110 nm showed an increment in root growth and fresh and dry shoot mass at 45 days. NPSiO<sub>2</sub> did not interfere the growth of the CLV16, regardless of nanoparticle size and concentrations. NPSiO<sub>2</sub> promoted growth of maize plants in a similar way to that observed when only CLV16 was used. The promotion of plant growth observed with NPSiO<sub>2</sub>+CLV16 treatments did not differ from that with single NPSiO<sub>2</sub> or CLV16. Plants sprayed with NPSiO<sub>2</sub> showed an initial increasing in the activities of antioxidant enzymes at 72 h, suggesting that these nanoparticles were plant stressors. However, plants sprayed with NPSiO<sub>2</sub> presented an increment in shoot length and fresh root mass after 45 days growth. Thus, the short deleterious impact of NPSiO<sub>2</sub> in maize is quickly overcome and the NPSiO<sub>2</sub> 110 nm can act as growth promoters in maize, mainly when seeds are treated rather than when leaves sprayed.

Keywords: Nanosilica; Oxidative stress; Rhizobacteria.

## 1 INTRODUCTION

Nanotechnology is rapidly showing promise to revolutionize many areas, such as agriculture, medicine and food systems (1,2). Among various materials and structures used in nanoparticles, the World Health Organization (WHO) considers amorphous silica nanoparticles (NPSiO<sub>2</sub>) safe for human consumption (3). Silica

(SiO<sub>2</sub>) is part of the diet of most people through vegetables, whole grains, and seafood, reaching approximately 200 mg per day for peoples whose diet is plant-based (4). NPSiO<sub>2</sub> in agriculture is still considered a novel approach as they are more reactive than their bulk counterparts (5).

Silica is an interesting particle to use in plant culture, as it is considered chemically inert, therefore a potential load carrier. In many species, plant cell wall may accumulate silica from the precipitation and polymerization of silicon (orthosilicic acid - H<sub>4</sub>SiO<sub>4</sub>) absorbed by plant roots, but information on pathways related to this phenomenon is still fragmented (6). The main products of Si accumulation are the phytoliths, or silica bodies embedded in the cell wall. However, it is unknown whether plant cells have the capability of integrating free silica into the walls matrix, or if its dependent on pathways linked to Si (OH)<sub>4</sub> present in the cell. The silica bodies promote the reinforcing of cell walls, leading to the increase of plant resistance against herbivores and pathogens (7,8). Although silicon is important to plants, known as non-essential beneficial plant nutrient, the effect of applying silica SiO<sub>2</sub> directly on the plants is still a puzzle, considering that it is not supposed plants use SiO<sub>2</sub> as silicon source (9).

It is well documented that nanoparticles exhibit toxicity to living organisms mainly because of their small size (<100 nm), large surface-to-volume ratio and highly reactive facets (10). Although amorphous phytolith silica are found naturally and therefore may be relatively benign to plants (11), manufactured spherical SiO<sub>2</sub> (NPSiO<sub>2</sub>) ranging from 50 to 200 nm, is harmful to some plant species, such as *Arabidopsis* and cotton (12,13). On the other hand, there are many reports showing that silica nanomaterials can promote seed germination (14), increase corn and wheat resistance to salinity stress and protect peas plants from oxidative stress (15). NPSiO<sub>2</sub> also promotes root elongation and increase leaf chlorophyll and carotenoid content in corn (16,17). The contrasting results observed when plants are treated with NPSiO<sub>2</sub> may be attributed to the particle size and interactions between the cell surface and the silica colloids formed in a saturated solution (18).

Another possibility may be the specific plant inability to absorb and accumulate silicon. Plants of the family Poaceae, such as *Zea mays*, show high Si accumulation (>4 % Si), while species from the orders Cucurbitales and Malvales

show intermediate Si accumulation (1– 4 % Si), and most other species demonstrate little accumulation, such as belonging to the Brassicales order (19).

The cellular toxicity of manufactured nanoparticles is also attributed to cell membrane disruption and ROS-mediated oxidative damage (20). When nanoparticles cross the plant cell membrane, they can induce reactive oxygen species (ROS) via NADPH oxidases. In plants, nanoparticles are passively absorbed by cells through the cell wall pores with size <50 nm. However, plant cells are also able to absorb larger particles up to 300 nm in size, such as carbon nanotubes of 500 nm in length (21).

The disturbance promoted by nanoparticles in the cytoplasmic ROS homeostasis affect the redox regulatory state and antioxidant system of the cell. In order to mitigate the effects of oxidative stress, plants activate both enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense machinery to scavenge excess ROS (22). Soybean plants sprayed with NPSiO<sub>2</sub> showed an increase in the activities of the enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX) and ascorbate peroxidase (APx), which protect the plant against salt stress (23). The increase of CAT and APx activities in corn plants assisted against lipid peroxidation induced by CeO<sub>2</sub> nanoparticle (10 nm) (24).

Wheat roots exposed to Cu nanoparticle (50 nm) showed an increment in CAT activity, protecting cells from oxidative damage (24). In addition to plant stress, nanoparticles may also interfere to soil microorganism community. It has been shown that small nanoparticles (20 nm) are toxic to microorganisms, such as *B. subtilis*, *E. coli* and *P. fluorescens*, however soils supplemented with NPSiO<sub>2</sub> (9 nm) show a slightly increase in microbial activity (25). In addition to silica, soil silicon stimulates the growth of both aerobic and facultative anaerobic soil bacteria (26). These results suggest that NPSiO<sub>2</sub> may have a favorable effect on beneficial bacterial population and nutrient value of soil (8).

This study was conducted to better understanding the effects of NPSiO<sub>2</sub> on seed germination and plant growth of maize. For this purpose, silica nanoparticles were synthesized and characterized. Then, the effect of NPSiO<sub>2</sub> in seed germination and plant growth, as well as the interaction between nanoparticles and rhizobacteria were evaluated. The modulation of the antioxidant system as part of plant response to the nanoparticles were also analyzed.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Synthesis and characterization of silica nanoparticles (NPSiO<sub>2</sub>)

The NPSiO<sub>2</sub> were synthesized by the Interdisciplinary Center for Nanoscience and Micro-Nanotechnology at PUCRS, using the method of Stöber (27). Briefly, ultrapure water, absolute ethanol and ammonium hydroxide were mixed in the proportion of 1:1:0.1 (v/v) and shaken to form a homogeneous solution. The compound TEOS (tetraethyl orthosilicate) in ethanol (1:15 (v/v)) was added to the previous mixture and the system was kept under constant agitation for different periods of time, 4 h (220 and 110 nm) and 12 h (63 nm), at room temperature. After, NPSiO<sub>2</sub> were purified by centrifugation (14,000 rpm for 20 min) and washed with ethanol. The NPSiO<sub>2</sub> were characterized in terms of elemental and chemical composition, morphology, size distribution and colloidal stability. For this, the techniques of transmission and scanning electron microscopy, dynamic light scattering, electrophoretic mobility, spectroscopy in the IR to UV range, atomic absorption and thermogravimetric analysis were used (Supplementary material, S\_01).

### 2.2 Effect of NPSiO<sub>2</sub> on seed germination

Maize seeds (Syngenta, VIP3) were washed in distilled water and exposed by immersion in suspensions containing NPSiO<sub>2</sub> (12 mL/kg seed). Treatments consisted of NPSiO<sub>2</sub> with average sizes of 63, 110 and 220 nm, at concentrations of 100, 500 and 1,000 mg/L. For this, 40 seeds from each treatment were placed in Erlenmeyers flasks and kept under agitation (100 rpm) for 15 min. The NPSiO<sub>2</sub> suspensions were supplemented with 0.1% (v/v) of the commercial silicone adhesive Silwet L-77 (Momentive®). The control consisted of seeds exposed to sterile distilled water, supplemented with 0.1% (v/v) Silwet L-77. After exposure, seeds were transferred to Magenta boxes (10 seeds per box) with filter paper moistened with sterile distilled water (15 mL), and at  $\pm 25$  °C with a 16 h photoperiod. Measurements were taken

considering the parameters: seed germination rate (%) at 3 and 7 days, shoot and root length (cm) at 7 days. Data were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SE).

### **2.3 Effect of inoculation with *Streptomyces* CLV16 and NPSiO<sub>2</sub> on plant growth**

The rhizobacterium *Streptomyces* spp. (CLV16, Collection of Microorganisms from the Plant Biotechnology Laboratory, PUCRS) was previously isolated from roots of *Cortaderia selloana* (Poaceae) collected at Pró-Mata (Center for Research and Nature Conservation, PUCRS). The rhizobacterium was isolated by cultivation in ISP2 selection medium (28,29) and stored at -80 °C in glycerol: ISP2 medium (1:1 v/v). This isolate CLV16 was chosen due to previous studies in greenhouse and field experiments, where its ability to promote growth of maize plants was demonstrated (30)

The isolate CLV16 was cultivated on plates with semi-solid ISP2 medium, at 28 °C for fifteen days in order to sporulation. To remove the endospores, the medium surface was washed with 10 mL of sterile distilled water. Subsequently, the solution was filtered using cotton wool (0.32g/cm<sup>2</sup>), to eliminate debris and pseudohyphae, obtaining a homogeneous suspension with endospores. The concentration used for seed inoculation was adjusted to 10<sup>17</sup> endospores. mL<sup>-1</sup>.

Maize seeds (Syngenta, VIP3) were washed in distilled water and inoculated by immersion in endospores suspension. For that, 50 seeds were placed in Erlenmeyer with 7.5 ml of endospores suspension supplemented with 0.1% (v/v) of the commercial silicone adhesive Silwet L-77 to increase the adhesion of the endospores to the seed coat. The flasks were kept under agitation (100 rpm) for 30 min. Afterwards, seeds (16 per treatment) were transferred to Erlenmeyers containing NPSiO<sub>2</sub> with average sizes of 63, 110 and 220 nm, at a concentration of 100 mg/L (12 mL solution/Kg seed), kept under agitation (100 rpm) for 30 min. The control treatment consisted of seeds exposed to distilled water. Seeds were sown in plastic bags (2 L) with commercial substrate consisted in organic soil and carbonized rice husk (2:1) and maintained in greenhouse. Irrigation was performed three times a week.

Plant growth was evaluated at 45 days (stage V<sub>10</sub>) post-emergence. Measurements were taken considering the parameters: fresh weight (g), length (cm)

and dry weight (g) of the root and aerial parts. For the dry mass determination, plants were dry in an oven (40 °C) for 15 days. Data were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SE).

### **1.1 Toxicity of NPSiO<sub>2</sub> to *Streptomyces* CLV16**

Disc-diffusion method was used to evaluate the effect of NPSiO<sub>2</sub> on growth of CLV16 isolate. Sterile paper-discs (7 mm diameter) were soaked with NPSiO<sub>2</sub> suspension and placed on the surface of a semi-solid ISP2 medium in a petri dish. Each plate received four paper-discs and each one was soaked with 20  $\mu$ L of NPSiO<sub>2</sub> suspensions. Treatments consisted of NPSiO<sub>2</sub> with 63, 110 and 220 nm at 100, 500 and 1,000 mg/L. Control consisted in paper-discs soaked in sterile distilled water. Plates were inoculated with a plug of semi-solid medium with CLV16. For this, the CLV16 was cultivated for three days, at 28 °C in semi-solid ISP2 medium. Medium plugs were cut from the culture using a sterile 7 mm diameter cork borer. One plug was placed on the medium surface, surrounded by paper-discs. Plates were incubated at 28 °C for 25 days. Measurements were taken considering the *Streptomyces* growth area. Data were expressed as mean of the growth area  $\pm$  standard error of the mean (SE).

### **1.2 Effect of NPSiO<sub>2</sub> on plant development**

For the following experiments, maize plants (Syngenta, VIP3) at stage V<sub>3</sub> (approximately 15 days post-emergence), were sprayed with NPSiO<sub>2</sub> suspension (500  $\mu$ L/plant). After spraying, plants were kept in greenhouse for 30 days, under irrigation. Each treatment consisted of 16 plants. Treatments consisted of suspensions of NPSiO<sub>2</sub> with average sizes of 63, 110 and 220 nm, at concentrations of 100, 500 and 1,000 mg/L. The NPSiO<sub>2</sub> suspensions were supplemented with 0.1% (v/v) of the commercial silicone adhesive Silwet L-77 (Momentive®). Spraying was performed with the aid of an atomizer. The control treatment consisted of plants sprayed with sterile distilled water, supplemented with 0.1% (v/v) Silwet L-77. Plants were grown in plastic bags (2 L) with organic substrate in a greenhouse. After 30 days post-spraying, the plant shoots and roots (stage V<sub>10</sub>) were evaluated for fresh

mass (MF) and dry mass (MS) parameters, as well as the plant length (cm). In order to determine the dry mass, plants were kept in an oven at 40 °C for 15 days.

### 1.3 Oxidative stress of plants exposed to NPSiO<sub>2</sub>

In order to determine the oxidative stress in plants sprayed with NPSiO<sub>2</sub>, the enzymatic activities of guaiacol-peroxidase (POX), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APx) were evaluated. For this propose, corn plants (Syngenta, VIP3) were grown in organic substrate in a greenhouse. Plants at the stage V<sub>3</sub> were sprayed with NPSiO<sub>2</sub> suspension (500 µL/plant) with average sizes of 63, 110 and 220 nm, at concentrations of 100 and 500 mg/L. Control treatment consisted in plants sprayed with sterile distilled water. Both NPSiO<sub>2</sub> and control solutions were supplemented with 0.1% (v/v) Silwet L-77. For enzymatic analyzes, leaves were sampled at 24, 48 and 72 h after spraying. Samples were weighed and immediately frozen in liquid nitrogen. Subsequently, they were stored at -80 °C until the analysis. Treatments were repeated three times. Each repetition consisted in a sample. Samples comprised in a pool of tissues taken from fully expanded leaves.

The activities of the enzymes POX (EC 1.11.17) was determined according to Salla et al. (31). Briefly, extracts were prepared from leaves (0.5 g) ground in 2.5 mL of 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7) with 2% polyvinylpyrrolidone (PVP) and centrifuged at 3,200 g for 16 min at 5 °C. The activity of guaiacol-peroxidase was determined in a reaction mixture containing 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6), 1% (v/v) guaiacol as substrate and 10 mM hydrogen peroxide, using the crude extract described above. Oxidation of guaiacol was measured by the increase in absorbance at 420 nm for 30 s at an interval of 5 s. Specific enzyme activity was expressed as µkatal mg<sup>-1</sup> protein. Total protein concentration was determined according to Bradford's method (32), using bovine serum albumin as standard.

CAT (EC 1.11.1.6) and APx (EC 1.11.1.11) activities were evaluated in leaves samples (0.5 g). Samples were homogenized in 1.8 mL of 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) containing 1% PVP and 0.1 mM EDTA. The homogenate was centrifuged at 3,200 g for 26 min at 5 °C and the supernatants were used for enzyme assays. The activity of CAT was estimated by measuring the rate of decomposition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 240 nm (33). The reaction solution contained 50 mM



potassium phosphate buffer (pH 7.0), 12 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and plant extract. Total APx activity was estimated by monitoring the decrease in absorbance at 290 nm (34). The reaction contained 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ascorbate (2 mM) and plant extract. One unit of APx was defined as the amount of enzyme required to oxidize 1  $\mu$ mol of ascorbate. min<sup>-1</sup>.

#### 1.4 Statistical analysis

\*Experiments were performed in a fully randomized design, tested for variance homogeneity by Kolmogorov-Smirnov test ( $\alpha \leq 0.05$ ). A t-test was performed separately for the early growth parameters versus the control. Variables such as seed germination rate, plant growth parameters and enzymatic activity were transformed by square root ( $\sqrt{x+0.5}$ ) in order to adjust to the normal distribution. The measurements expressed as percentage were transformed by arcsine  $\sqrt{x}/100$ . The occurrence of univariate outliers was determined by BoxPlot and the extreme values (more than 3 box-lengths from the edge of the box) were removed. The effect of factors was examined by the two-way analysis of variance test (ANOVA). The means were compared using Student's t-test and one-way ANOVA, complemented by Duncan's test, with  $p \leq 0.05$ . Data were analyzed using the SPSS software version 22.0.

## 2 RESULTS AND DISCUSSION

### 2.1 Effect of NPSiO<sub>2</sub> on seed germination

In order to evaluate the toxicity of NPSiO<sub>2</sub> in maize, seeds were exposed to nanoparticles and germination rate and seedling growth were determined. Neither speed ( $p=0.141$ ) nor germination rate ( $p=0.189$ ) were not affected by seed exposition to different levels of NPSiO<sub>2</sub> (100, 500 or 1,000 mg/L), regardless the nanoparticle size (63, 110 or 220 nm). Germination rate ranged from 80% to 100% in the treatments of 220 nm (1,000 mg/L) and 110 nm (500 mg/L), respectively (Supplementary material, S\_02). However, growth of seedlings was reduced seven days after NPSiO<sub>2</sub> -seed treatment (Fig. 1). Seeds treated with NPSiO<sub>2</sub> 220 nm

(1,000 mg/L) resulted in plants with shorter shoot length when compared to the control treatment (Fig. 1a). Moreover, root growth was reduced with the largest sizes of NPSiO<sub>2</sub> (110 and 220 nm), mainly at the concentration of 1,000 mg/L (Fig. 1b).

Negative effect of nanoparticles on seed germination and seedling early development have been reported. In rice, for example, these parameters decreased as the size and concentration of silver nanoparticles increased (35). Small-sized nanoparticles (30 to 60 nm) can enter plant cells through endocytosis, while penetration by the ones ranging from (70 to 150 nm) can cause cell disruption, leading to tissue damage (35). Indeed, it has been shown that 18 nm zinc oxide nanoparticles, applied to *Allium cepa* seeds, promoted plant growth (36). On the other hand, an increase in the toxicity of silver nanoparticles in *A. thaliana* plants was observed, as the nanostructure size increased (37). Nevertheless, NPSiO<sub>2</sub> with sizes of 14, 50 and 200 nm did not demonstrate phytotoxic effects in this species (12). Nonetheless, the germination rate in tomato and squash can be increased by treating seeds with NPSiO<sub>2</sub> 12 nm (38,39). Thus our study showed that, although treatment with NPSiO<sub>2</sub> had no deleterious effect on germination rate of maize seeds, it impaired seedlings growth when seeds were exposed to large sizes and high concentrations of particles.

## 2.2 Toxicity of NPSiO<sub>2</sub> to *Streptomyces* CLV16

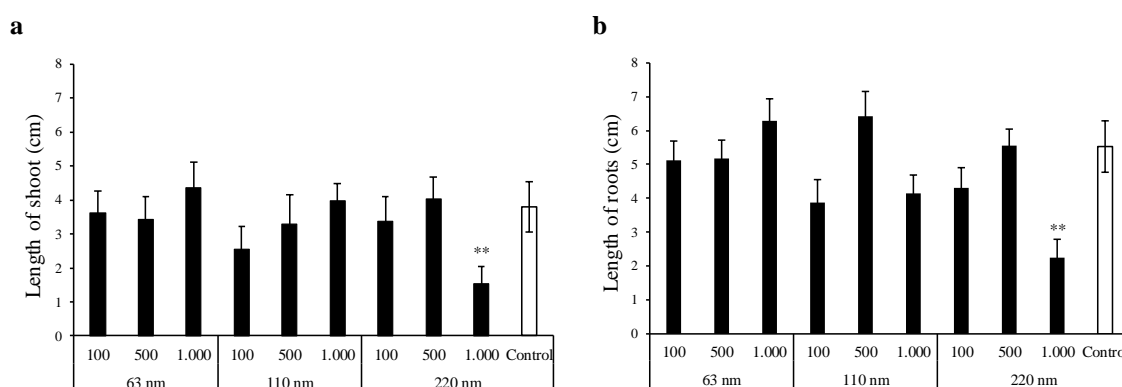


Figure 1 – Early growth of maize seedlings. Length of a) shoots and b) roots. Seedlings were originated from seeds treated with NPSiO<sub>2</sub> (63, 110 or 220 nm) in different concentrations (100; 500 or 1,000 mg/L). Growth parameters were evaluated 7 days after germination. Seeds from the control were treated with water. Asterisk in the column represents significant differences from control (\* =  $p \leq 0.05$ , \*\* =  $p \leq 0.001$ , Student's t-test). Bars in the columns represent the standard error of the mean.

### 2.3 Effect of inoculation with *Streptomyces* CLV16 and NPSiO<sub>2</sub> on plant growth

Inoculation of microorganisms on seeds is a procedure widely used in agriculture to improve plant growth. The inoculation of CLV16 on maize seeds resulted in an increment in both fresh and dry mass of shoots and roots, compared to the control (Figs. 2a, b, d, e). Among the rhizobacteria, *Streptomyces* spp. are widely recognized for their capacity to produce bioactive compounds such as streptomycin, auxin, extracellular proteases and volatile compounds (40). This genus was also reported to induce plant growth in *Araucaria angustifolia* (29). PGPR (*Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens* and *Bacillus subtilis*) applied to rice increased the mass and length of plant shoot and roots (41). Many isolates of *Streptomyces* have been described as effective in stimulating plant growth, as in *A. thaliana*, wheat and tomato, promoting an increase in plant biomass (42–46). *Streptomyces* were also able to promote growth in garlic plants (47). Previous experiments have shown that CLV16 inoculated in maize seeds promoted an increase in plant biomass (48).

The interaction between rhizobacterium and NPSiO<sub>2</sub> was evaluated through cultivating bacteria in the presence of nanoparticles. Our results indicated that nanoparticles had no effect either on growth ( $p = 0.402$ ) or on morphology of CLV16 (Supplementary material, S\_03), regardless of the sizes and concentrations of nanoparticles (Fig. 3) (Supplementary material, S\_04).

In order to evaluate the interaction between nanoparticles and *Streptomyces* on plant growth, seeds were inoculated with the rhizobacteria and then exposed to nanoparticle (treatment NP+CLV16). NPSiO<sub>2</sub> applied to seeds, resulted in increased root biomass in plants at 45 days after seed treatment (Figs. 2d, e), compared to water control. However, no significant difference was observed in root biomass when compared to the CLV16 alone. The use of silica nanomaterials in plants has shown promising results, such as the promotion of tomato seed germination (14), improve the resistance of maize and wheat plants to saline stress (15,16). Silica nanoparticles also promote growth and productivity in plants under stress (49). Our results indicate that NPSiO<sub>2</sub> 220 nm caused a decrease in fresh mass and shoot length of maize plants (Fig. 2a, c), although application of spherical silica (SiO<sub>2</sub>)

nanoparticles in many plants shows little or no effects (50). There is evidence that high concentrations of NPSiO<sub>2</sub> are toxic to some eudicots, such as *A. thaliana* (51) and cotton (13). The contrasting results may be due to the specific inability of plants on absorbing and accumulating silicon. Compared to monocots, most eudicots cannot accumulate Si in large amounts due to differences in the Si uptake ability of the roots (52). Promotion of growth observed when maize plants were treated with NPSiO<sub>2</sub> may be related to the ability of this plant to accumulate silica. These results show that maize seeds treated with smallest sizes of NPSiO<sub>2</sub> (63 nm and 110 nm) show an increment in root and shoot masses.

The seed treatment with NPSiO<sub>2</sub>+CLV16 did not affect the plant growth, compared to control CLV16 (Fig. 2). The simultaneous use of 110 nm nanoparticles and NPSiO<sub>2</sub>+CLV16 in the seeds, led to the increment of fresh and dry shoot mass (Fig. 2a, b), compared to the water control. This treatment was also efficient to promote root growth (Fig. 2d, e, f). Interestingly, the effect of the single use of NPSiO<sub>2</sub> with 63 or 110 nm in seed treatment, did not differ from the CLV16 control (Fig. 2b, d, e, f), suggesting that the effect of NPSiO<sub>2</sub> was similar to the bacteria regarding the plant growth promoting ability.

There are few quantitative studies relating the effect of nanoparticles on soil microorganisms (53). The type and surface charge of nanoparticles can modify the behavior of bacteria in the soil. For instance, negatively charged iron nanoparticles (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) reduce the colonization of the root system by nitrogen fixing bacteria in soybeans (54). However, titanium nanoparticles (TiO<sub>2</sub>) promoted the root adhesion of bacteria *B. thuringiensis* and *P. polymyxa* in wheat plants. This nanoparticle caused the increment in seedling biomass even under water deficit, salinity and pathogen attack (55). Silica nanoparticles are found naturally and therefore may be relatively benign (11). Interestingly, it has been shown that manufactured SiO<sub>2</sub> nanoparticles (20 nm) are toxic to *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens* (25). In contrast, soils supplemented with SiO<sub>2</sub> nanoparticles (9 nm) showed a slightly boost in microbial activity (25). Our results did not identify any deleterious effects of NPSiO<sub>2</sub> on the growth of the *Streptomyces* CLV16, at least considering the evaluated concentrations. Moreover, the association NPSiO<sub>2</sub>+CLV16 showed better results when using the smaller size nanoparticle (63 or 110 nm).

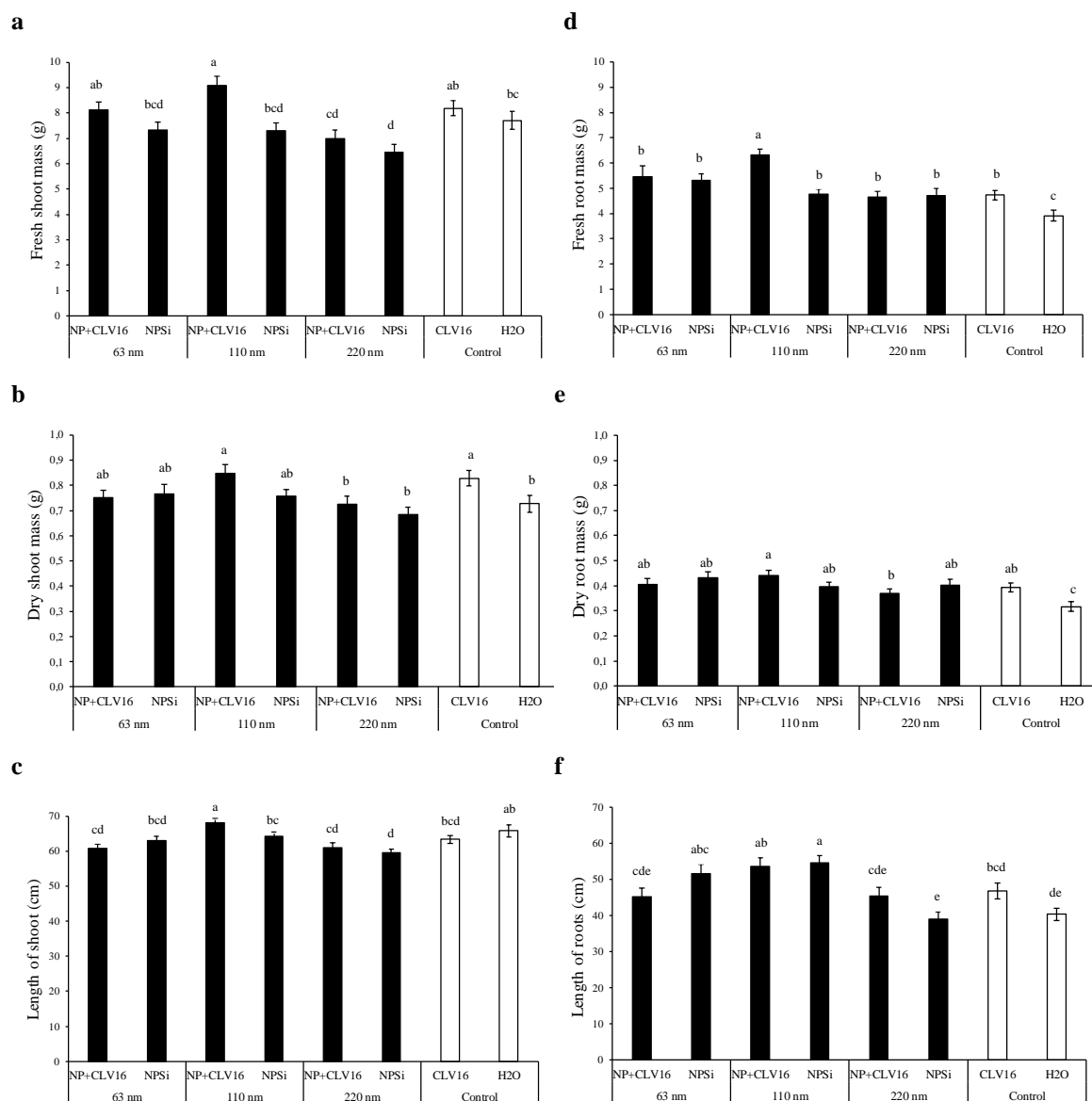


Figure 2 – Growth of maize plants germinated from seeds treated with *Streptomyces* (CLV16) and silica nanoparticles (NP). Seeds were inoculated with CLV16 ( $10^{17}$  endospores/mL) and NPSiO<sub>2</sub> (63, 110 or 220 nm) at concentration of 100 mg/L. Growth parameters were evaluated 45 days after seed germination. Seeds from the control were treated with water. Different letters in the columns represent significant differences between the means ( $\alpha=0.05$ , ANOVA, Duncan). Bars in the columns represent the standard error of the mean.

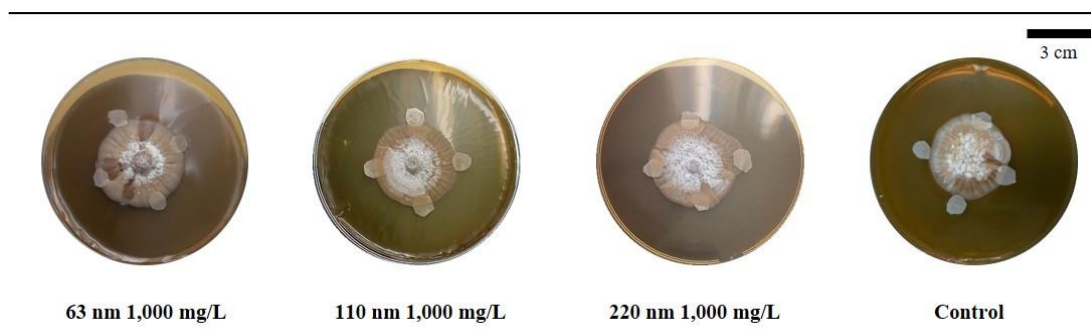


Figure 3 – Growth of CLV16 exposed to disc-diffusion (black arrow) impregnated with 1,000 mg/L silica nanoparticles (63, 110 or 220 nm). Control discs were soaked with distilled water. (Supplementary material, S\_02).

## 2.4 Effect of NPSiO<sub>2</sub> on the plant development

The phytotoxicity of NPSiO<sub>2</sub> was assessed by spraying maize plants and evaluating the plant growth. The spraying of NPSiO<sub>2</sub> solutions in maize plants do not show phytotoxicity in the tested sizes and concentrations. NPSiO<sub>2</sub> had no effect on the fresh and dry shoot mass (Fig. 4a, b). Moreover, root dry mass and root length were also not affected by any treatment (Fig. 4e, f). Plants sprayed with NPSiO<sub>2</sub> at a concentration of 100 mg/L showed an increase in the shoot length, regardless the nanoparticle size (Fig. 4c). Nanoparticles of 110 nm (1,000 mg/L) and 220 nm (100 mg/L) promoted an increase in the fresh mass of the roots, whereas the size of 63 nm reduced this parameter, regardless the concentration tested (Fig. 4d). Coffee (*Coffea arabica*) and rice plants sprayed with zinc nanoparticles showed an increase of fresh and dry mass of roots and leaves (56,57). Promotion of growth and yield was also obtained in wheat plants sprayed with NPSiO<sub>2</sub> s (58). Basil plants (*Ocimum basilicum*) sprayed with NPSiO<sub>2</sub> showed enhanced vegetative growth, fresh and oil yield, stomatal resistance value and oil components, while transpiration rate was reduced (59). In addition, the lowest concentration (100 mg / L) was efficient to promote shoot length.

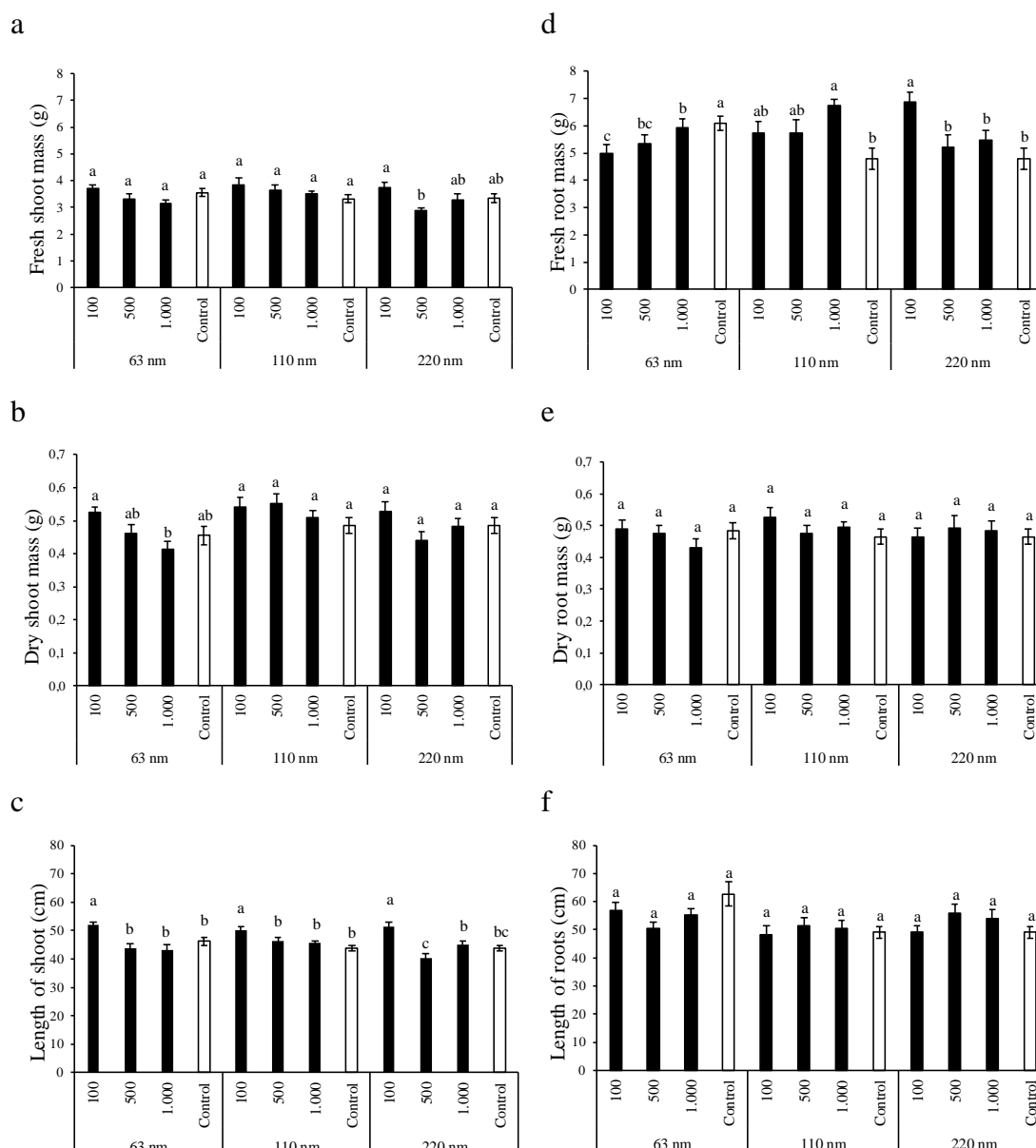


Figure 4 – Growth of maize plants sprayed with NPSiO<sub>2</sub> (63, 110 or 220 nm) in different concentrations (100; 500 or 1,000 mg/L). Growth parameters were evaluated 45 days after germination. Seeds from the control were treated with distilled water. Different letters in the columns represent significant differences between the means ( $\alpha=0.05$ , ANOVA, Duncan). Bars in the columns represent the standard error of the mean.

## 2.5 Oxidative stress of plants exposed to NPSiO<sub>2</sub>

The plant peroxidases (POX) are implicated in various vital processes of plant growth and development throughout the plant life cycle including cell wall metabolism, lignification, reactive oxygen species (ROS) metabolism, defense

against pathogens etc. (60). The spraying of NPSiO<sub>2</sub> at a concentration of 100 mg/L did not change the activity of the POX enzyme, regardless the particle size (Fig. 5a, b, c). However, in 72 h, there was a decrease in POX activity when the concentration of 500 mg/L was used, regardless of the size of the nanoparticle, compared to the control (Fig. 5c).

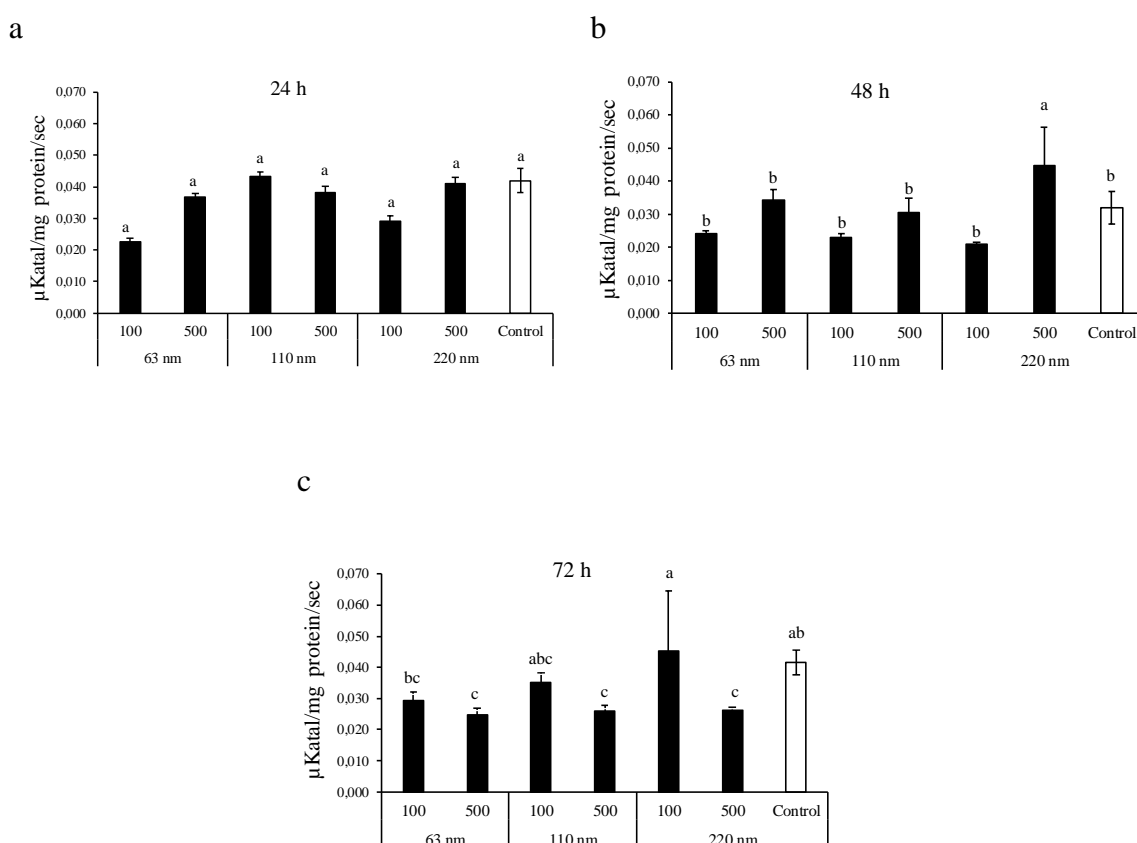


Figure 5 – Guaiacol-peroxidase (POX) activity evaluated in maize plants sprayed with NPSiO<sub>2</sub> (63, 110 or 220 nm) at concentrations of 100 or 500 mg/L. Enzymatic activities (μKatal/mg protein/sec) were determined in leaves sampled at 24; 48 and 72 h after spraying. Control plants were sprayed with water. Different letters in the columns represent significant differences between the means ( $\alpha=0.05$ , ANOVA, Duncan). Bars in the columns represent the standard error of the mean.

It is well known that nanoparticles can damage the structure and function of plant cell membranes, leading to increase the ROS levels (53) and impairing the plant growth (12,13). Catalase (CAT) is an antioxidant enzyme known to maintain the cell redox status in plants exposed to environmental stress. Plants sprayed with NPSiO<sub>2</sub> showed an increase in the activity of the CAT enzyme in 24 h and 72 h,



depending on the concentration and the nanoparticle size (Fig. 6a, c). NPSiO<sub>2</sub> of 63 and 110 nm stimulated CAT activity only at the highest concentration (500 mg/L) within 24 h after spraying, whereas 220 nm NPSiO<sub>2</sub> promoted an increase in CAT at the lowest concentration (100 mg/L) (Fig. 6a, c). There was no difference in CAT activity at 48 h (Fig. 6b).

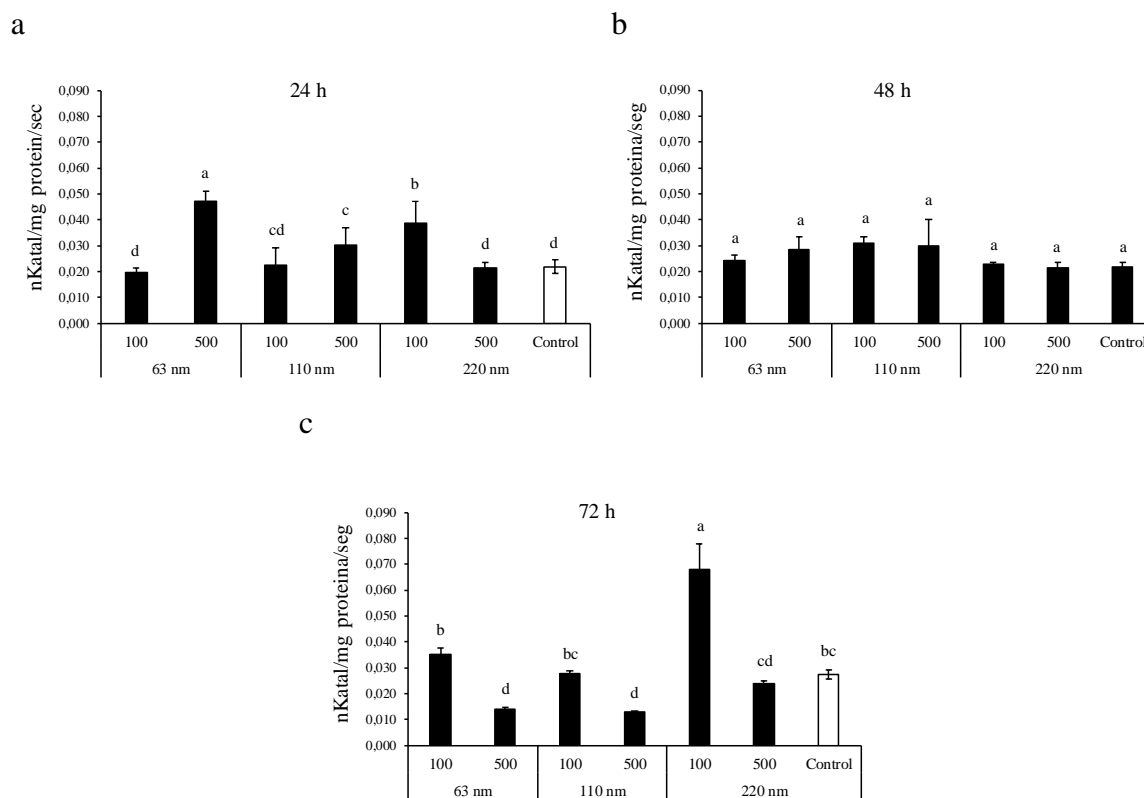


Figure 6 – Catalase (CAT) activity evaluated in maize plants sprayed with NPSiO<sub>2</sub> (63, 110 or 220 nm) at concentrations of 100 or 500 mg/L. Enzymatic activities (nKatal/mg protein/sec) were determined in leaves sampled at 24; 48 and 72 h after spraying. Control plants were sprayed with water. Different letters in the columns represent significant differences between the means ( $\alpha=0.05$ , ANOVA, Duncan). Bars in the columns represent the standard error of the mean.

The APx enzyme plays a key role in responding to abiotic stresses, decreasing the levels of hydrogen peroxide produced in cells. Plants sprayed with NPSiO<sub>2</sub> showed no difference in APx activity at 48 h, regardless of the size and concentrations tested (Fig. 7b). However, 24 h after spraying, the highest concentration of NPSiO<sub>2</sub> (500 mg/L) promoted a drastic reduction in APx activity (Fig. 7a). Nanoparticles with 220 nm induced an increase in APx activity in 72 h, regardless of the concentration tested (Fig. 7c).

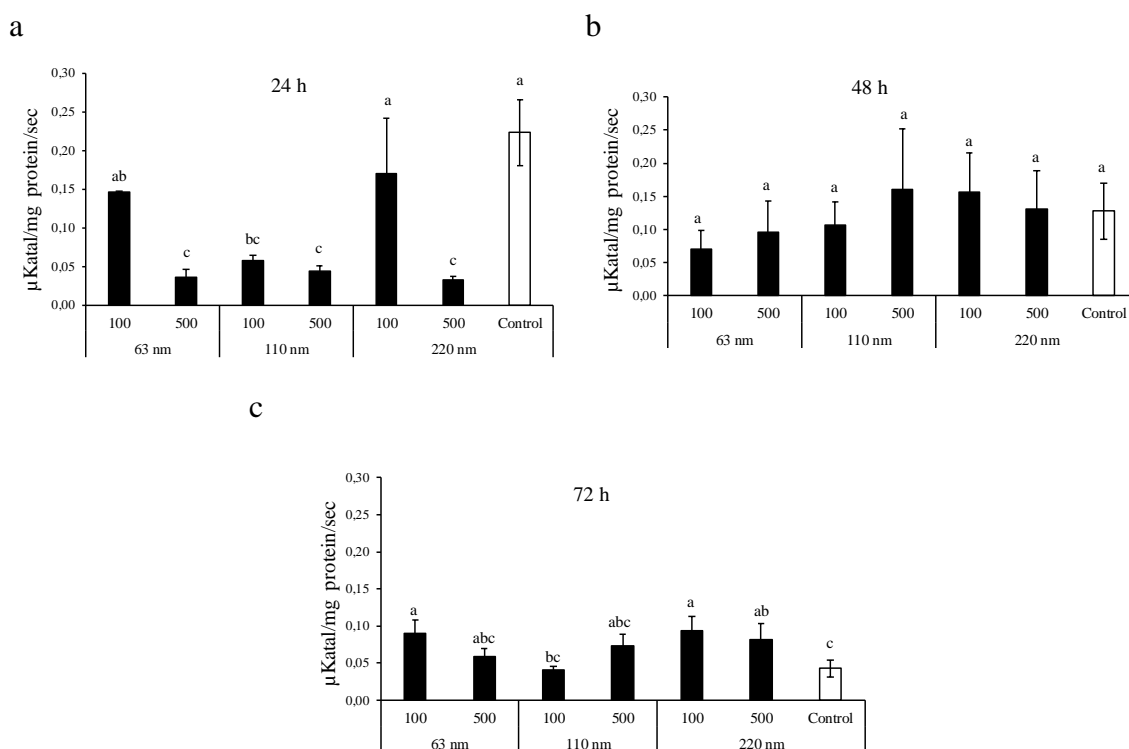


Figure 7 – Ascorbate peroxidase (APx) activity evaluated in maize plants sprayed with NPSiO<sub>2</sub> (63, 110 or 220 nm) at concentrations of 100 or 500 mg/L. Enzymatic activities (μKatal/mg protein/sec) were determined in leaves sampled at 24; 48 and 72 h after spraying. Control plants were sprayed with water. Different letters in the columns represent significant differences between the means ( $\alpha=0.05$ , ANOVA, Duncan). Bars in the columns represent the standard error of the mean.

Overall, the NPSiO<sub>2</sub> 220 nm promotes the activities of the antioxidant enzymes CAT and APx after 72 h of spraying. However, activity was decreased when plants were sprayed with this nanoparticle at a concentration of 500 mg/L. Regardless of the size and concentration of NPSiO<sub>2</sub> sprayed on the plants, POX showed no differences in activity within 24 h. Meantime, the activities of the CAT and APx enzymes showed the highest variation 24 h after spraying. Soybean plants sprayed with NPSiO<sub>2</sub> (20 – 30 nm) showed a reduction in the damage caused by salt stress due to the increase in SOD, CAT, POX and APx activities (23). Nevertheless, these same authors observed that concentrations of 120 mg/L of NPSiO<sub>2</sub> resulted in toxicity. NPSiO<sub>2</sub> showed a protective effect on bamboo plants (*Pleioblastus pygmaeus*), when exposed to lead, due to increased levels of antioxidant enzymes, such as CAT (61). However, the effect of nanoparticles depends on the type of material and the plant species. Zinc nanoparticles sprayed on potato plants caused oxidative stress, with increased activity of CAT and POX, in addition to promoting

the accumulation of sugars in plant tissues (62). On the other hand, chickpea plants (*Cicer arietinum*) sprayed with zinc nanoparticles showed an increase in biomass that was attributed to low levels of ROS, consequently a decrease in the enzymes SOD and POX (63). In plants, the cellular level of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is mostly regulated by enzymatic actions of catalases and peroxidases. Peroxidases are essential for plant defense as they are involved in the synthesis of lignin precursors and associated to antioxidative protection process (64). The lowest POX activity was observed at 72 h, when plants were treated with 500 g/L of NPSiO<sub>2</sub>. Similar decrease was also observed in CAT at 72 h in plants treated with 500 g/L of NPSiO<sub>2</sub> (63 nm and 10 nm). However, the decreasing in POX and CAT activities at 72 h did not impair the further plant growth, evaluated at 45 days. Our results also indicate that NPSiO<sub>2</sub> caused an increase in CAT activity and a decrease in APx activity at 24 h in the highest nanoparticle concentration (500 mg/L). These findings suggest, at some extension, that NPSiO<sub>2</sub> represented a stressor in maize plants. In addition, while the activity of the APx enzyme was recover at 48 h, CAT activity reached the lowest levels in these treatments, after 72 h of spraying. These results support the hypothesis that the oxidative stress caused by NPSiO<sub>2</sub> on maize plants is transient and restrict to a short period after plant exposition. In this context, the use of low concentration (110 nm) of NPSiO<sub>2</sub> may minimize the plant stress, mainly when nanoparticles are applied by spraying.

Overall, our results suggest that NPSiO<sub>2</sub> does not affect the germination rate. However, they may impair the initial root growth (7 days) and promote a transient oxidative stress. Despite that, NPSiO<sub>2</sub> do not appear to compromise the plant growth, when this parameter is evaluated at 45 days. On the other hand, NPSiO<sub>2</sub> can promote an increment in the shoot and root biomass (Fig. 2). In addition, maize seeds may be treated with NPSiO<sub>2</sub> in association to the rhizobacteria CLV16, without detrimental effects on microorganism or plants. Indeed, there is strong evidence to suggest that NPSiO<sub>2</sub> presented a similar effect to CLV16 for plant growth promotion. In conclusion, manufactured spherical NPSiO<sub>2</sub> can act as growth promoters in maize plants, mainly treating seeds with 110 nm – nanoparticles at 100 mg/L.

**Declaration of competing interest**

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

**Acknowledgments**

The authors greatly thank the Central Laboratory for Microscopy and Microanalysis (LabCEMM/PUCRS) for technical support. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

## REFERÊNCIAS

- (1) Rashidi, L.; Khosravi-Darani, K. The Applications of Nanotechnology in Food Industry. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2011**, *51* (8), 723–730. <https://doi.org/10.1080/10408391003785417>.
- (2) Wilson, N. Nanoparticles: Environmental Problems or Problem Solvers? *Bioscience* **2018**, *68* (4), 241–246. <https://doi.org/10.1093/biosci/biy015>.
- (3) Ghormade, V.; Deshpande, M. V.; Paknikar, K. M. Perspectives for Nano-Biotechnology Enabled Protection and Nutrition of Plants. *Biotechnol. Adv.* **2011**, *29*, 792–803. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.06.007>.
- (4) Croissant, J. G.; Fatieiev, Y.; Khashab, N. M. Degradability and Clearance of Silicon, Organosilica, Silsesquioxane, Silica Mixed Oxide, and Mesoporous Silica Nanoparticles. *Adv. Mater.* **2017**, *29* (9). <https://doi.org/10.1002/adma.201604634>.
- (5) Suriyaprabha, R.; Karunakaran, G.; Yuvakkumar, R.; Rajendran, V.; Kannan, N. Silica Nanoparticles for Increased Silica Availability in Maize (*Zea mays*. L) Seeds Under Hydroponic Conditions. *Curr. Nanosci.* **2012**, *8* (6), 902–908. <https://doi.org/10.2174/157341312803989033>.
- (6) Guerriero, G.; Hausman, J.-F.; Legay, S. Silicon and the Plant Extracellular Matrix. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7* (April), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00463>.
- (7) Callis-Duehl, K. L.; McAuslane, H. J.; Duehl, A. J.; Levey, D. J. The Effects of Silica Fertilizer as an Anti-Herbivore Defense in Cucumber. *J. Hortic. Res.* **2017**, *25* (1), 89–98. <https://doi.org/10.1515/johr-2017-0010>.
- (8) Suriyaprabha, R.; Karunakaran, G.; Kavitha, K.; Yuvakkumar, R.; Rajendran, V.; Kannan, N. Application of Silica Nanoparticles in Maize to Enhance Fungal Resistance. *IET Nanobiotechnology* **2014**, *8* (3), 133–137. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2013.0004>.
- (9) Suriyaprabha, R.; Karunakaran, G.; Yuvakkumar, R.; Prabu, P.; Rajendran, V.; Kannan, N. Growth and Physiological Responses of Maize (*Zea mays* L.) to Porous Silica Nanoparticles in Soil. *J. Nanoparticle Res.* **2012**, *14* (12). <https://doi.org/10.1007/S11051-012-1294-6>.
- (10) Niazi, J. H.; Gu, M. B. Toxicity of Metallic Nanoparticles in Microorganisms- A Review. In *Atmospheric and Biological Environmental Monitoring*; Springer Netherlands, 2009; pp 193–206. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9674-7\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9674-7_12).
- (11) Liang, J.; Wu, R.; Huang, T. S.; Worley, S. D. Polymerization of a Hydantoinylsiloxane on Particles of Silicon Dioxide to Produce a Biocidal Sand. *J. Appl. Polym. Sci.* **2005**, *97* (3), 1161–1166. <https://doi.org/10.1002/app.21814>.
- (12) Slomberg, D. L.; Schoenfisch, M. H. Silica Nanoparticle Phytotoxicity to *Arabidopsis thaliana*. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46* (18), 10247–10254.

- <https://doi.org/10.1021/es300949f>.
- (13) Le, V. N.; Rui, Y.; Gui, X.; Li, X.; Liu, S.; Han, Y. Uptake, Transport, Distribution and Bio-Effects of SiO<sub>2</sub> Nanoparticles in Bt-Transgenic Cotton. *J. Nanobiotechnology* **2014**, *12* (1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12951-014-0050-8>.
  - (14) Sheikh Mohamed, M.; Sakthi Kumar, D. Methods of Using Nanoparticles. In *Plant Nanotechnology*; Springer International Publishing: Cham, 2016; pp 65–93. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-42154-4\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-42154-4_4).
  - (15) Imtiaz, M.; Rizwan, M. S.; Mushtaq, M. A.; Ashraf, M.; Shahzad, S. M.; Yousaf, B.; Saeed, D. A.; Rizwan, M.; Nawaz, M. A.; Mehmood, S.; et al. Silicon Occurrence, Uptake, Transport and Mechanisms of Heavy Metals, Minerals and Salinity Enhanced Tolerance in Plants with Future Prospects: A Review. *J. Environ. Manage.* **2016**, *183*, 521–529. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.09.009>.
  - (16) Ghareeb, H.; Bozsó, Z.; Ott, P. G.; Repenning, C.; Stahl, F.; Wydra, K. Transcriptome of Silicon-Induced Resistance against *Ralstonia solanacearum* in the Silicon Non-Accumulator Tomato Implicates Priming Effect. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **2011**, *75* (3), 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2010.11.004>.
  - (17) Sharifi Rad, J.; Karimi, J.; Mohsenzadeh, S.; Sharifi Rad, M.; Moradgholi, J. Evaluating SiO<sub>2</sub> Nanoparticles Effects on Developmental Characteristic and Photosynthetic Pigment Contents of *Zea mays* L. *Bull. Environ. Pharmacol. Life Sci.* **2014**, *366* (3), 194–201.
  - (18) Van Hoecke, K.; De Schampelaere, K. A.; Van Der Meeren, P.; Phane Lucas, S.; Janssen, C. R. Ecotoxicity of Silica Nanoparticles To the Green Alga *Pseudokirchneriella subcapitata*: Importance of Surface Area. *Environ. Toxicol. Chem.* **2008**, *27* (9), 1948–1957. <https://doi.org/10.1897/07-634.1>.
  - (19) Hodson, M. J.; White, P. J.; Mead, A.; Broadley, M. R. Phylogenetic Variation in the Silicon Composition of Plants. *Ann. Bot.* **2005**, *96*, 1027–1046. <https://doi.org/10.1093/aob/mci255>.
  - (20) Kim, I.-Y.; Joachim, E.; Choi, H.; Kim, K. Toxicity of Silica Nanoparticles Depends on Size, Dose, and Cell Type. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2015**, *11* (6), 1407–1416. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.03.004>.
  - (21) Shukla, P. K.; Misra, P.; Kole, C. Uptake, Translocation, Accumulation, Transformation, and Generational Transmission of Nanoparticles in Plants. In *Plant Nanotechnology: Principles and Practices*; Springer International Publishing: Cham, 2016; pp 183–218. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-42154-4\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-42154-4_8).
  - (22) Marslin, G.; Sheeba, C. J.; Franklin, G. Nanoparticles Alter Secondary Metabolism in Plants via ROS Burst. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 832. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00832>.
  - (23) Farhangi-Abriz, S.; Torabian, S. Nano-Silicon Alters Antioxidant Activities of Soybean Seedlings under Salt Toxicity. *Protoplasma* **2018**, *255* (3), 953–962.

- <https://doi.org/10.1007/s00709-017-1202-0>.
- (24) Zhao, L.; Peng, B.; Hernandez-Viezcas, J. A.; Rico, C.; Sun, Y.; Peralta-Videa, J. R.; Tang, X.; Niu, G.; Jin, L.; Varela-Ramirez, A.; et al. Stress Response and Tolerance of Zea Mays to CeO<sub>2</sub> Nanoparticles: Cross Talk among H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Heat Shock Protein, and Lipid Peroxidation. *ACS Nano* **2012**, *6* (11), 9615–9622. <https://doi.org/10.1021/nn302975u>.
  - (25) Jiang, W.; Mashayekhi, H.; Xing, B. Bacterial Toxicity Comparison between Nano- and Micro-Scaled Oxide Particles. *Environ. Pollut.* **2009**, *157* (5), 1619–1625. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.12.025>.
  - (26) Manivasakan, P.; Karunakaran, G.; Yuvakkumar, R.; Prabu, P.; Suriyaprabha, R.; Kannan, N.; Rajendran, V. Effect of Nanosilica and Silicon Sources on Plant Growth Promoting Rhizobacteria, Soil Nutrients and Maize Seed Germination. *IET Nanobiotechnology* **2013**, *7* (3), 70–77. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2012.0048>.
  - (27) Stober, W.; Fink, A. Controlled Growth of Monodispersed Silica Spheres in the Micron Size Range. *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, *26*, 62–69. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(68\)90272-5](https://doi.org/10.1016/0021-9797(68)90272-5).
  - (28) Shirling, E. B.; Gottlieb, D. Methods for Characterization of Streptomyces Species. *Int. J.* **1966**, *16* (3), 313–340.
  - (29) Dalmas, F. R.; Pereira, T. C. B.; Bogo, M. R.; Astarita, L. V. Autochthonous Streptomyces Regulate the Metabolism of Seedlings of *Araucaria angustifolia* (Coniferales) during Root Colonisation. *Aust. J. Bot.* **2011**, *59*, 118–125. <https://doi.org/10.1071/BT10175>.
  - (30) Biomonte - Pesquisa e Desenvolvimento Ltda. Avaliação da eficiência e praticabilidade agrônômica de formulações com rizobactérias vivas promotoras de crescimento aplicados via tratamento de semente e no sulco de plantio, na cultura do milho (*Zea mays*) no município de Santa Maria/RS. Laudo Técnico de Praticabilidade e Eficiência Agrônômica. 2017.
  - (31) Salla, T. D.; da Silva, T. R.; Astarita, L. V.; Santarém, E. R. Streptomyces Rhizobacteria Modulate the Secondary Metabolism of Eucalyptus Plants. *Plant Physiol. Biochem.* **2014**, *85*, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.10.008>.
  - (32) Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2017.04.003>.
  - (33) Havir, E. A.; McHale, N. A. Biochemical and Developmental Characterization of Multiple Forms of Catalase in Tobacco Leaves. *Plant Physiol.* **1987**, *84* (2), 450–455. <https://doi.org/10.1104/pp.84.2.450>.
  - (34) Nakano, Y.; Asada, K. Hydrogen Peroxide Is Scavenged by Ascorbate-Specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* **1981**, *22* (May), 867–880. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>.
  - (35) Thuesombat, P.; Hannongbua, S.; Akasit, S.; Chadchawan, S. Effect of Silver

- Nanoparticles on Rice (*Oryza Sativa* L. Cv. KDML 105) Seed Germination and Seedling Growth. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2014**, *104* (1), 302–309. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.03.022>.
- (36) Laware, S. L.; Raskar, S. Influence of Zinc Oxide Nanoparticles on Growth, Flowering and Seed Productivity in Onion. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **2014**, *3* (7), 874–881.
- (37) Geisler-Lee, J.; Wang, Q.; Yao, Y.; Zhang, W.; Geisler, M.; Li, K.; Huang, Y.; Chen, Y.; Kolmakov, A.; Ma, X. Phytotoxicity, Accumulation and Transport of Silver Nanoparticles by *Arabidopsis thaliana*. *Nanotoxicology* **2013**, *7* (3), 323–337. <https://doi.org/10.3109/17435390.2012.658094>.
- (38) Siddiqui, M. H.; Al-Whaibi, M. H. Role of Nano-SiO<sub>2</sub> in Germination of Tomato (*Lycopersicum esculentum* Seeds Mill.). *Saudi J. Biol. Sci.* **2014**, *21* (1), 13–17. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2013.04.005>.
- (39) Siddiqui, M. H.; Al-Whaibi, M. H.; Faisal, M.; Al Sahli, A. A. Nano-Silicon Dioxide Mitigates the Adverse Effects of Salt Stress on *Cucurbita pepo* L. *Environ. Toxicol. Chem.* **2014**, *33* (11), 2429–2437. <https://doi.org/10.1002/etc.2697>.
- (40) de Oliveira, M. F.; da Silva, M. G.; Van Der Sand, S. T. Anti-Phytopathogen Potential of Endophytic Actinobacteria Isolated from Tomato Plants (*Lycopersicon esculentum*) in Southern Brazil, and Characterization of *Streptomyces* Sp. R18(6), a Potential Biocontrol Agent. *Research in Microbiology*. 2010, pp 565–572. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.05.008>.
- (41) Karnwal, A. Isolation and Identification of Plant Growth Promoting Rhizobacteria from Maize (*Zea mays* L.) Rhizosphere and Their Plant Growth Promoting Effect on Rice (*Oryza sativa* L.). *J. Plant Prot. Res.* **2017**, *57* (2), 144–151. <https://doi.org/10.1515/jppr-2017-0020>.
- (42) Khamna, S.; Yokota, A.; Peberdy, J. F.; Lumyong, S. Indole-3-Acetic Acid Production by *Streptomyces* Sp. Isolated from Some Thai Medicinal Plant Rhizosphere Soils. **2010**, *32* (February), 23–32. <https://doi.org/10.5053/ejobios.2010.4.0.4>.
- (43) Cordovez, V.; Carrion, V. J.; Etalo, D. W.; Mumm, R.; Zhu, H. Diversity and Functions of Volatile Organic Compounds Produced by *Streptomyces* from a Disease-Suppressive Soil. *Front. Microbiol.* **2015**, *6* (October), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01081>.
- (44) Gopalakrishnan, S.; Vadlamudi, S.; Bandikinda, P.; Sathya, A.; Vijayabharathi, R.; Rupela, O.; Kudapa, H.; Katta, K.; Varshney, R. K. Evaluation of *Streptomyces* Strains Isolated from Herbal Vermicompost for Their Plant Growth-Promotion Traits in Rice. *Microbiol. Res.* **2014**, *169* (1), 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.008>.
- (45) Jog, R.; Pandya, M.; Nareshkumar, G.; Rajkumar, S. Mechanism of Phosphate Solubilization and Antifungal Activity of *Streptomyces* Spp. Isolated from Wheat Roots and Rhizosphere and Their Application in Improving Plant Growth. *Microbiology* **2014**, *160*, 778–788.



<https://doi.org/10.1099/mic.0.074146-0>.

- (46) Palaniyandi, S. A.; Damodharan, K.; Yang, S. H.; Suh, J. W. Streptomyces Sp . Strain PGPA39 Alleviates Salt Stress and Promotes Growth of ‘ Micro Tom’ Tomato Plants. *J. Appl. Microbiol.* **2014**, *117*, 766–773. <https://doi.org/10.1111/jam.12563>.
- (47) Condori-Pacsi, Sandro J., Fernández-Guzman, Patrick R., Valderrama-Valencia, M. R. Aislamiento y Caracterización de Streptomyces Spp Rizosféricos Promotores Del Crecimiento Vegetal. *IDESIA (Chile)* **2019**, *37* (2), 109–116.
- (48) Sanchotene, D. M. *Avaliação de Eficiência e Praticabilidade Agronômica de Formulações Com Rizobactérias Vivas Promotoras de Crescimento Aplicadas via Tratamento de Semente e No Sulco de Plantio, Na Cultura Do Milho (Zea Mays) No Município de Santa Maria/RS*; Santa Maria, 2017.
- (49) DeRosa, M. C.; Monreal, C.; Schnitzer, M.; Walsh, R.; Sultan, Y. Nanotechnology in Fertilizers. *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5* (2), 91. <https://doi.org/10.1038/nnano.2010.2>.
- (50) Ma, X.; Geisler-lee, J.; Deng, Y.; Kolmakov, A. Interactions between Engineered Nanoparticles ( ENPs ) and Plants : Phytotoxicity , Uptake and Accumulation. *Sci. Total Environ.* **2010**, *408* (16), 3053–3061. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.03.031>.
- (51) Lee, C. W.; Mahendra, S.; Zodrow, K.; Li, D.; Tsai, Y. C.; Braam, J.; Alvarez, P. J. J. Developmental Phytotoxicity of Metal Oxide Nanoparticles to *Arabidopsis thaliana*. *Environ. Toxicol. Chem.* **2010**, *29* (3), 669–675. <https://doi.org/10.1002/etc.58>.
- (52) Ma, J. F.; Yamaji, N. Silicon Uptake and Accumulation in Higher Plants. *Trends Plant Sci.* **2006**, *11* (8), 392–397. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.06.007>.
- (53) Aruguete, D. M.; Hochella, M. F. Bacteriananoparticle Interactions and Their Environmental Implications. *Environ. Chem.* **2010**, *7* (1), 3–9. <https://doi.org/10.1071/EN09115>.
- (54) Burke, D. J.; Pietrasiak, N.; Situ, S. F.; Abenojar, E. C.; Porche, M.; Kraj, P.; Lakliang, Y.; Samia, A. C. S. Iron Oxide and Titanium Dioxide Nanoparticle Effects on Plant Performance and Root Associated Microbes. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16* (10), 23630–23650. <https://doi.org/10.3390/ijms161023630>.
- (55) Timmusk, S.; Seisenbaeva, G.; Behers, L. Titania (TiO<sub>2</sub>) Nanoparticles Enhance the Performance of Growth-Promoting Rhizobacteria. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18939-x>.
- (56) Rossi, L.; Fedenia, L. N.; Sharifan, H.; Ma, X.; Lombardini, L. Effects of Foliar Application of Zinc Sulfate and Zinc Nanoparticles in Coffee (*Coffea arabica* L.) Plants. *Plant Physiol. Biochem.* **2019**, *135*, 160–166. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.12.005>.
- (57) Ali, S.; Rizwan, M.; Noureen, S.; Anwar, S.; Ali, B.; Naveed, M.; Fathi, E.; Allah, A.; Alqarawi, A. A.; Ahmad, P. Combined Use of Biochar and Zinc

- Oxide Nanoparticle Foliar Spray Improved the Plant Growth and Decreased the Cadmium Accumulation in Rice (*Oryza sativa* L.) Plant. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2019**, 1–12.
- (58) Ali, S.; Rizwan, M.; Hussain, A.; Zia, M.; Ali, B.; Yousaf, B.; Wijaya, L.; Nasser, M.; Ahmad, P. Silicon Nanoparticles Enhanced the Growth and Reduced the Cadmium Accumulation in Grains of Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol. Biochem.* **2019**, *140*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.04.041>.
- (59) Mahmoud, M. A.; Shala, A. Y.; Rashed, N. M. The Mutual Effect of Irrigation Scheduling and Foliar Spray of Silica Nanoparticles on Basil Plant. *J. Plant Prod.* **2018**, *8* (12), 1303–1313.
- (60) Pandey, V. P.; Awasthi, M.; Singh, S.; Tiwari, S.; Dwivedi, U. N. A Comprehensive Review on Function and Application of Plant Peroxidases. *Biochem. Anal. Biochem.* **2017**, *06* (01), 1–16. <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000308>.
- (61) Emamverdian, A.; Ding, Y.; Mokhberdorran, F.; Xie, Y.; Zheng, X.; Wang, Y. Silicon Dioxide Nanoparticles Improve Plant Growth by Enhancing Antioxidant Enzyme Capacity in Bamboo (*Pleioblastus pygmaeus*) under Lead Toxicity. *Trees - Struct. Funct.* **2019**, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s00468-019-01929-z>.
- (62) Raigond, P.; Raigond, B.; Kaundal, B.; Singh, B.; Joshi, A.; Dutt, S. Effect of Zn Nanoparticles on Antioxidative System of Potato Plants. *J. Env. Biol.* **2017**, *38*, 435–439.
- (63) Burman, U.; Saini, M.; Kumar, P. Effect of Zinc Oxide Nanoparticles on Growth and Antioxidant System of Chickpea Seedlings. *Toxicol. Environ. Chem.* **2013**, *95* (4), 605–612. <https://doi.org/10.1080/02772248.2013.803796>.
- (64) Skelly, M. J.; Loake, G. J. Synthesis of Redox-Active Molecules and Their Signaling Functions during the Expression of Plant Disease Resistance. *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, *19*, 990–997. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5429>.

## CAPÍTULO III

### 1 CONCLUSÕES

O tratamento de sementes com NPSiO<sub>2</sub> não afetou a taxa de germinação. Contudo, o crescimento inicial (7 dias) das raízes foi prejudicado quando nanopartículas de tamanhos de 110 ou 220 nm nas maiores concentrações foram usadas. Esta inibição inicial não foi suficiente para comprometer o crescimento das raízes após 45 dias de cultivo. Por outro lado, a aplicação de NPSiO<sub>2</sub> nas sementes promoveu o aumento da biomassa das raízes em plantas com 45 dias. Plantas aspergidas com NPSiO<sub>2</sub> apresentam alterações nas enzimas relacionadas ao estresse oxidativo, indicando a produção de ROS pela exposição às nanopartículas. No entanto, este estresse não foi suficiente para comprometer o crescimento das plantas.

O tratamento de sementes com o CLV16 promoveu o crescimento das plantas, corroborando com resultados anteriores que demonstram a capacidade deste isolado bacteriano em promover o crescimento de plantas de milho. Os experimentos demonstram que as NPSiO<sub>2</sub> não prejudicam o crescimento do isolado bacteriano CLV16. O tratamento de sementes com a associação de NPSiO<sub>2</sub> (110 nm) e a bactéria CLV16 promoveu o incremento da matéria seca e fresca da parte aérea das plantas de milho. Da mesma forma, 45 dias após o tratamento destas sementes, as plantas apresentaram raízes com maior biomassa (comprimento, massa seca e fresca). O crescimento das plantas germinadas de sementes tratadas com NPSiO<sub>2</sub> de 63 ou 110 nm foi igual ao crescimento observado quando as sementes foram inoculadas somente com o CLV16, indicando que as NPSiO<sub>2</sub> podem igualar-se a bactéria como promotor de crescimento em milho.

Considerando os resultados, conclui-se que a melhor forma de utilização das NPSiO<sub>2</sub> em milho é no tratamento das sementes, utilizando nanopartículas de 110 nm na concentração de 100 mg/L. Esta utilização das NPSiO<sub>2</sub> pode promover o aumento da massa seca e fresca nas plantas.

## 2 PERSPECTIVAS

As nanopartículas de sílica não promoveram o incremento de biomassa de parte aérea, quando aspergidas em plantas de milho. Considerando que não avaliamos o tempo de permanência das nanopartículas na superfície das folhas, não podemos determinar o impacto de uma rápida remoção das NPSiO<sub>2</sub> das folhas nas respostas de crescimento da parte aérea.

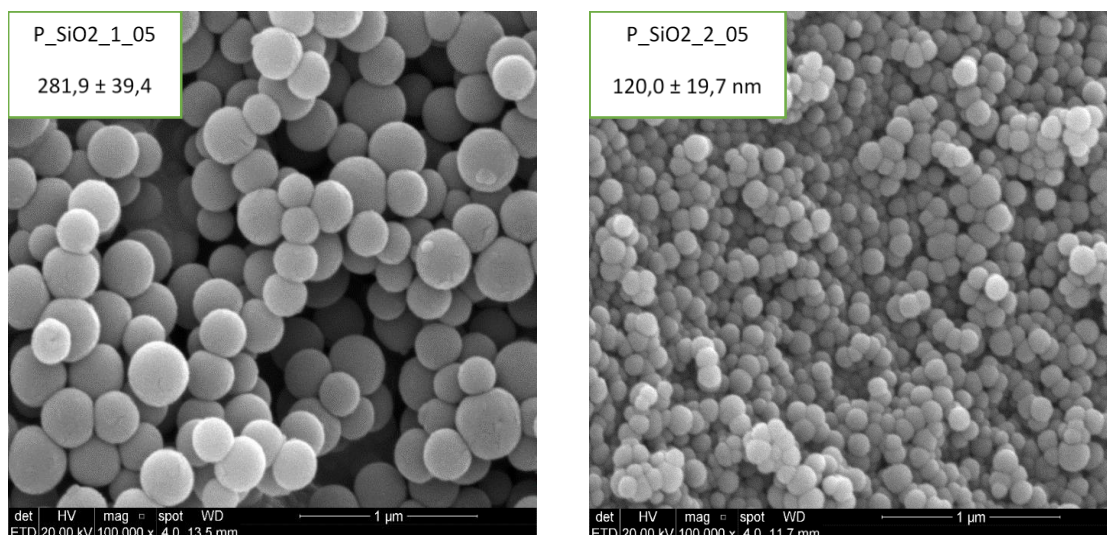
Seria necessário realizar a coleta de folhas aspergidas com NPSiO<sub>2</sub> de forma periódica em plantas cultivadas em lavoura, e a avaliação qualitativa em microscópio eletrônico de varredura. A avaliação das condições e do tempo para a permanência das NPSiO<sub>2</sub> em folhas de milho, pode indicar a necessidade de ampliar o número de aplicações desta nanopartícula e modificar as concentrações. Da mesma forma, o tempo de permanência pode sugerir o seu potencial uso como carreadoras de nutrientes.

O aumento do estresse oxidativo observado nas plantas causado pelas nanopartículas poderia ser avaliado no contexto de proteção contra estresses futuros, como já visto em outros estudos. Esta avaliação poderia ser realizada através da exposição de plantas previamente aspergidas com NPSiO<sub>2</sub>, ao ataque de patógenos ou submetidas a estresses abióticos, como salinidade.

Outra questão ainda a ser compreendida é a interação das nanopartículas com células e tecidos vegetais. Desta forma, poderia se determinar a absorção destes nanomateriais em relação ao tamanho ou características de superfície.

As nanopartículas de sílica não apresentaram toxicidade na interação com o isolado CLV16. Porém, existem diversos microrganismos promotores de crescimento de plantas utilizados em culturas agrícolas, como *Azospirillum* spp. e *Trichoderma* spp. A interação das NPSiO<sub>2</sub> com outros microrganismos também poderia ser avaliada *in vitro*. Além de estudos da interação das nanopartículas com bactérias presentes no solo.

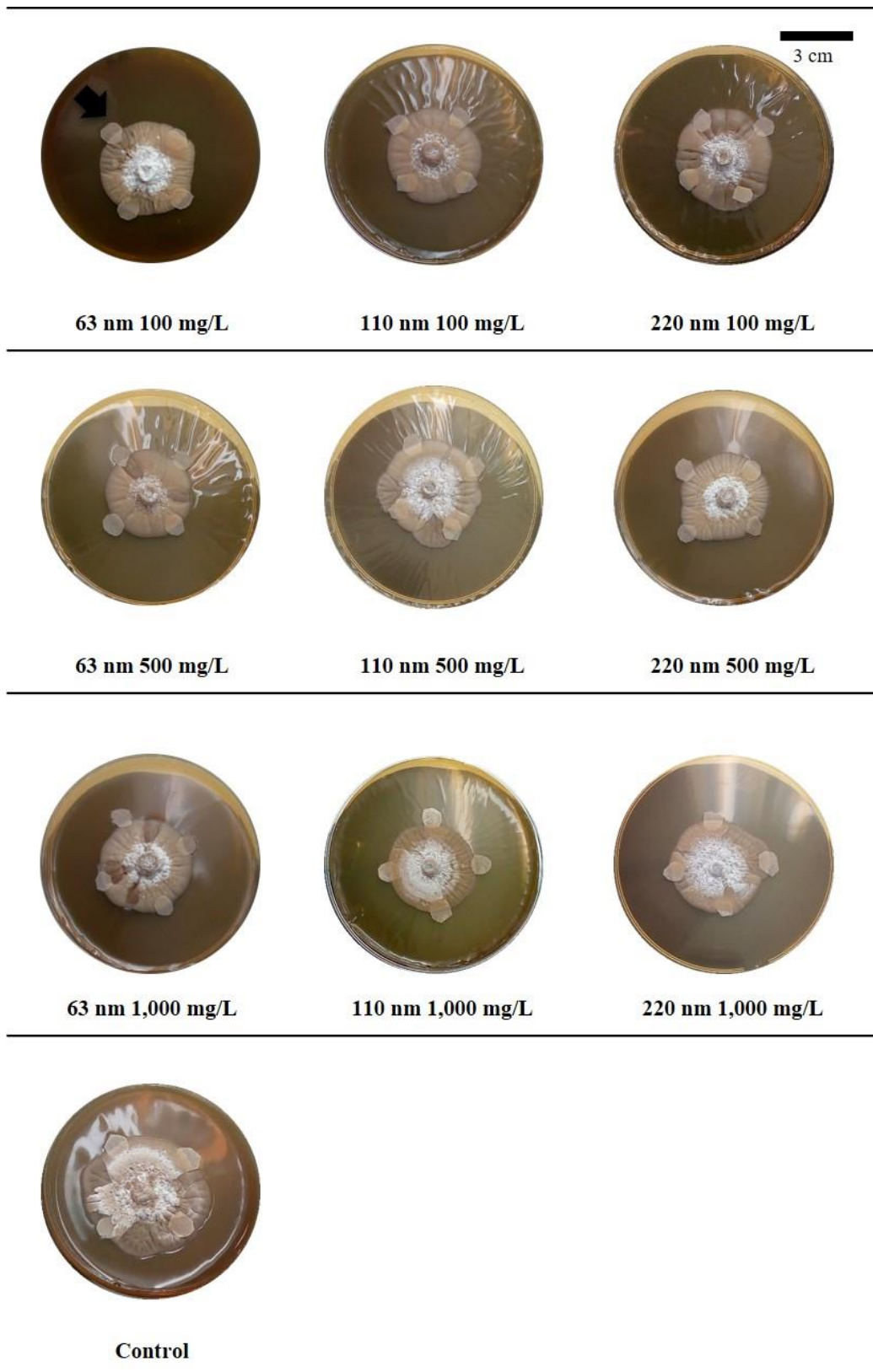
### 3 MATERIAL SUPPLEMENTAR



S\_01 – Silica nanoparticles (NPSiO<sub>2</sub>) synthesized using the method of Stöber (220 nm and 110 nm). Scanning Electron Microscopy. The nanoparticle of 63 nm is not shown.

NPSiO <sub>2</sub> SIZE	CONCENTRATION (mg/L)	GERMINATION RATE (3 days)	GERMINATION RATE (7 days)
<b>63 nm</b>	100	75% (± 0,05) a	93% (± 0,05) a
	500	83% (± 0,02) a	98% (± 0,01) a
	1,000	80% (± 0,07) a	95% (± 0,05) a
<b>110 nm</b>	100	73% (± 0,04) a	95% (± 0,03) a
	500	90% (± 0,04) a	100% (± 0,00) a
	1,000	78% (± 0,06) a	95% (± 0,03) a
<b>220 nm</b>	100	78% (± 0,06) a	95% (± 0,03) a
	500	73% (± 0,04) a	85% (± 0,09) a
	1,000	63% (± 0,07) a	80% (± 0,10) a
<b>CONTROL</b>	0	85% (± 0,06) a	95% (± 0,02) a

S\_02 – Germination rate (3 and 7 days) of seed exposed to silica nanoparticles (NPSiO<sub>2</sub> - 63, 110 or 220 nm) in three concentrations (100 mg/L, 500 mg/L and 1,000 mg/L). Control was exposed to water. Data expressed as mean (± standard error). Different letters in the columns represent significant differences between the means ( $\alpha=0.05$ , ANOVA, Duncan).



S\_03 – Growth area of CLV16 exposed to disc-diffusion (black arrow) impregnated with silica nanoparticles (63, 110 or 220 nm) in three concentrations (100 mg/L, 500 mg/L and 1,000 mg/L). Control discs were soaked in water.

<b>NPSiO<sub>2</sub> SIZE</b>	<b>CONCENTRATION (mg/L)</b>	<b>CLV16 GROWTH (cm<sup>2</sup>)</b>
<b>63 nm</b>	100	9,16 (± 1,05) a
	500	7,94 (± 3,03) a
	1,000	9,24 (± 1,11) a
<b>110 nm</b>	100	6,78 (± 0,05) a
	500	8,57 (± 1,43) a
	1,000	7,79 (± 0,86) a
<b>220 nm</b>	100	8,19 (± 0,77) a
	500	9,19 (± 1,59) a
	1,000	8,46 (± 2,06) a
<b>CONTROL</b>	0	9,56 (± 1,50) a

S\_04 – Growth area (cm<sup>2</sup>) of CLV16 exposed to disc-diffusion impregnated with silica nanoparticles (NPSiO<sub>2</sub> - 63, 110 or 220 nm) in three concentrations (100 mg/L, 500 mg/L and 1,000 mg/L). Control discs were impregnated with water. Data expressed as mean (± standard error). Different letters in the columns represent significant differences between the means ( $\alpha=0.05$ , ANOVA, Duncan).



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Pró-Reitoria de Graduação  
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar  
Porto Alegre - RS - Brasil  
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564  
E-mail: [prograd@pucrs.br](mailto:prograd@pucrs.br)  
Site: [www.pucrs.br](http://www.pucrs.br)