



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA/FITOTECNIA**

**GABRIELLY ALICE LIMA RIBEIRO**

**SELEÇÃO DE ESTIRPES DE RIZÓBIO, ACTINOBACTÉRIA E *BACILLUS* PARA  
COINOCULAÇÃO EM FEIJÃO-CAUPI**

**FORTALEZA  
2025**

GABRIELLY ALICE LIMA RIBEIRO

SELEÇÃO DE ESTIRPES DE RIZÓBIO, ACTINOBACTÉRIA E *BACILLUS* PARA  
COINOCULAÇÃO EM FEIJÃO-CAUPI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia/Fitotecnia. Área de concentração: Fisiologia, Bioquímica e Biotecnologia Vegetal

Orientadora: Prof. Dra. Cândida Hermínia Campos de Magalhães  
Coorientador: Dr. Wardsson Lustrino Borges

FORTALEZA

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

R369s Ribeiro, Gabrielly Alice Lima.  
Seleção de estírpes de rizóbio, actinobactéria e bacillus para coinoculação em feijão-caupi / Gabrielly Alice Lima Ribeiro. – 2025.  
91 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Fitotecnia), Fortaleza, 2025.  
Orientação: Profa. Dra. Cândida Hermínia Campos de Magalhães.  
Coorientação: Prof. Dr. Wardsson Lustrino Borges.

1. *Vigna unguiculata*. 2. região nordeste. 3. fixação biológica de nitrogênio. 4. consórcio bacteriano. 5. promoção de crescimento. I. Título.

CDD 630

---

GABRIELLY ALICE LIMA RIBEIRO

**SELEÇÃO DE ESTIRPES DE RIZÓBIO, ACTINOBACTÉRIA E *BACILLUS* PARA  
COINOCULAÇÃO EM FEIJÃO-CAUPI**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia/Fitotecnia. Área de concentração: Fisiologia, Bioquímica e Biotecnologia Vegetal

Orientadora: Prof. Dra. Cândida Hermínia Campos de Magalhães  
Coorientador: Dr. Wardsson Lustrino Borges

Aprovada em 08/08/2025

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cândida Hermínia Campos de Magalhães (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Claudia Miranda Martins  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Arthur Prudêncio de Araújo Pereira  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr.<sup>a</sup> Vanessa de Abreu Pereira  
Embrapa Agroindústria Tropical – CNPAT

---

Prof. Dr. Wardsson Lustrino Borges (Coorientador)  
Embrapa Agroindústria Tropical – CNPAT

À Deus.

Aos meus pais, Ernane e Maria; aos meus  
amigos próximos.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à minha família: aos meus pais, que nunca mediram esforços para me apoiar em todas as etapas da vida, e à minha irmã, Ana Kerssy, por sempre me incentivar a seguir no caminho acadêmico. Vocês são meu alicerce e minha maior motivação. Meu eterno agradecimento e amor.

Aos meus pets, principalmente ao meu cachorro: Nescau, que faz parte da minha vida há 10 anos e é um verdadeiro amigo e companheiro, com um amor incondicional. Aos meus gatinhos, Lala, Lua e Manoel por todas as demonstrações de amor únicas.

Ao meu amor, Alvaedson, que chegou na minha vida e a transformou de forma profunda. Obrigada por compreender cada dificuldade, estar ao meu lado nos momentos mais desafiadores e me fazer sentir um amor genuíno todos os dias.

Aos meus amigos que se tornaram parte da minha família — Thiago, Vitória, Guilherme e Arlene — por estarem ao meu lado desde a graduação e por todo o apoio incondicional ao longo dessa caminhada, amo vocês.

À minha família do Gabinete, obrigado por tudo, eu não consigo colocar em palavras o quão sortuda e feliz eu sou por ter vocês como amigos, uma honra ser eleita a cola do grupo.

Aos amigos engenheiros agrônomos que tive o privilégio de conhecer durante o mestrado, em especial à Érika e à Leslyene, pelo acolhimento, pela ajuda nas mais diversas etapas e, sobretudo, pela amizade sincera. Muito obrigado por tudo!

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Microbiologia do Solo, pelo constante suporte, acolhimento e pelas conversas que tornaram os dias mais leves e contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional. Em especial, agradeço à Vanessa, ao Joseph, à Lilian e ao Gabriel, que foram fundamentais na execução deste trabalho e transformaram as longas rotinas em momentos mais agradáveis e produtivos.

Ao meu orientador, Dr. Wardsson Lustrino, por acreditar no meu potencial, pelos conselhos, ensinamentos e por todo o apoio prestado em cada etapa deste projeto. Agradeço, ainda, pelas oportunidades e experiências valiosas proporcionadas, que contribuíram significativamente para minha formação acadêmica e profissional.

À minha orientadora, Dr.<sup>a</sup> Cândida Hermínio, pelo voto de confiança ao aceitar me orientar, pelo suporte, pelos conselhos valiosos e pelos aprendizados compartilhados ao longo desses dois anos.

Aos integrantes da banca examinadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Claudia Miranda Martins, Prof. Dr. Arthur Prudêncio de Araújo Pereira e Dr.<sup>a</sup> Vanessa de Abreu Pereira pelo pronto aceite do convite e pelas relevantes considerações que enriqueceram este trabalho.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a execução deste trabalho, meu sincero agradecimento. Foi uma jornada desafiadora e, ao mesmo tempo, maravilhosa, marcada por aprendizados e companheirismo.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo apoio financeiro concedido, o qual foi fundamental para a realização desta pesquisa (Edital *Mulheres na Ciência* Nº 01/2022, Processo MLC-0191-00282.01.00/22 - SPU Nº: 06268900/2022).

À Universidade Federal do Ceará (UFC) e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) pelo apoio estrutural e financeiro para realização desse projeto de pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## RESUMO

No Brasil, o feijão representa um dos principais componentes da dieta da população, sendo amplamente consumido devido ao seu baixo custo e elevado teor de nutrientes, contribuindo para a segurança alimentar e nutricional. Os tipos de feijão mais consumidos no país são o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) e feijão-caupi (*Vigna unguiculata*). Neste contexto, o uso de bioinsumos baseados em microrganismos promotores de crescimento vegetal destaca-se como uma estratégia promissora para redução de custos, dos impactos ambientais e melhorias na qualidade dos alimentos. A fixação biológica de nitrogênio (FBN) desempenha um papel fundamental no ciclo biogeoquímico do nitrogênio e promove o aumento da fertilidade do solo. Diante disso, o presente estudo tem como objetivo selecionar estirpes de rizóbios, actinobactérias e *Bacillus* spp., para a coinoculação visando à promoção do crescimento do feijão-caupi. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, foi realizada uma triagem em duas etapas para seleção das estirpes de rizóbios com melhor desempenho simbiótico, a partir de um total de 58 estirpes. Posteriormente, as estirpes de rizóbio selecionadas foram caracterizadas por meio do sequenciamento do genoma. Foram conduzidos ensaios de coinoculação utilizando rizóbio em associação com 21 estirpes de actinobactérias e com sete estirpes de *Bacillus* spp. sendo avaliado a biomassa seca da parte aérea, das raízes, de nódulos (g por planta) e acúmulo de nitrogênio na parte aérea (mg por planta). Os mecanismos de promoção do crescimento como produção de ácido indolacético (AIA), sideróforos, biossurfactantes, solubilização e mineralização de fósforo e capacidade de fixação de nitrogênio de vida livre foram avaliadas. Três estirpes de rizóbio promoveram acúmulo de biomassa seca superior ao tratamento não inoculado nas duas fases de seleção e foram classificados com base no genoma com pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*. Não foram observadas diferenças estatísticas significativa entre os tratamentos nos dois experimentos de coinoculação do rizóbio com actinobactérias e *Bacillus* spp. As estirpes de *Bradyrhizobium* spp. apresentaram elevada capacidade de produção de biossurfactantes, as estirpes de actinobactérias apresentaram elevada capacidade de solubilização e mineralização de fosfatos e as estirpes de *Bacillus* spp. apresentaram elevada capacidade de produção de AIA. Com isso, a seleção de bactérias promotoras de crescimento vegetal multifuncionais e a composição de consórcios bacterianos constituem estratégias eficientes e sustentáveis para promoção da produtividade, qualidade e redução de custo do feijão-caupi.

**Palavras-chave:** *Vigna unguiculata*; região nordeste; fixação biológica de nitrogênio; consórcio bacteriano; promoção de crescimento; inoculantes.

## ABSTRACT

In Brazil, beans are one of the main components of the population's diet, widely consumed due to their low cost and high nutrient content, contributing to food and nutritional security. The most commonly consumed types of beans in the country are common beans (*Phaseolus vulgaris*) and cowpeas (*Vigna unguiculata*). In this context, the use of bio-inputs based on plant growth-promoting microorganisms stands out as a promising strategy for reducing costs and environmental impacts and improving food quality. Biological nitrogen fixation (BNF) plays a key role in the biogeochemical cycle of nitrogen and promotes increased soil fertility. Given this, the present study aims to select strains of rhizobia, actinobacteria, and *Bacillus* spp. for co-inoculation to promote the growth of cowpea. The experiments were conducted in a greenhouse, and a two-stage screening was performed to select the rhizobium strains with the best symbiotic performance from a total of 58 strains. Subsequently, the selected rhizobium strains were characterized by genome sequencing. Co-inoculation trials were conducted using rhizobia in association with 21 strains of actinobacteria and seven strains of *Bacillus* spp. The dry biomass of the aerial parts, roots, nodules (g per plant), and nitrogen accumulation in the aerial parts (mg per plant) were evaluated. Growth promotion mechanisms such as indoleacetic acid (IAA) production, siderophores, biosurfactants, phosphorus solubilization and mineralization, and free-living nitrogen fixation capacity were evaluated. Three rhizobium strains promoted dry biomass accumulation higher than the non-inoculated treatment in both selection phases and were classified based on their genome as belonging to the genus *Bradyrhizobium*. No statistically significant differences were observed between treatments in the two experiments of co-inoculation of rhizobia with actinobacteria and *Bacillus* spp. *Bradyrhizobium* spp. strains showed high biosurfactant production capacity, actinobacteria strains showed high phosphate solubilization and mineralization capacity, and *Bacillus* spp. strains showed high AIA production capacity. Thus, the selection of multifunctional plant growth-promoting bacteria and the composition of bacterial consortia are efficient and sustainable strategies for promoting productivity, quality, and cost reduction in cowpea.

**Keywords:** *Vigna unguiculata*; northeast region; biological nitrogen fixation; bacterial consortium; growth promotion; inoculants.

## **LISTA DE GRÁFICOS**

Gráfico 1 - Resultados da massa seca da parte aérea (MSPA, g), de raízes (MSR, g) e de nódulos (MSN, g) do experimento de coinoculação do rizóbio selecionado (L47) e actinobactérias (SN). .....	55
Gráfico 2 - Valores da massa seca da parte aérea (MSPA, g), de raízes (MSR, g) e de nódulos (MSN, g) do ensaio de coinoculação do rizóbio selecionado (L47) e <i>Bacillus</i> spp. (LPPC)... .....	57
Gráfico 3 - Quantificação de AIA produzido pelas estirpes de rizóbio, actinobactérias e bactérias do gênero <i>Bacillus</i> . .....	60

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismos de ação promovidos por bactérias promotoras de crescimento vegetal (BCPV) que influenciam as plantas. ....	23
Figura 2 - Distribuição temporal das publicações sobre o uso de inoculante simples e consórcios microbianos em feijão-caupi obtidos no site Web of Science.....	30
Figura 3 - Visão geral dos experimentos realizados em casa de vegetação do CNPAT para seleção dos rizóbios em feijão-caupi. ....	38
Figura 4 - Disposição geral dos vasos para experimentos de coinoculação de rizóbio com actinobactérias e com <i>Bacillus</i> spp. em feijão-caupi na casa de vegetação do CNPAT. ....	40
Figura 5 - Representação esquemática dos testes qualitativos utilizados para avaliar a capacidade de produção de biossurfactantes pelas estirpes selecionadas.....	47
Figura 6 - Massa seca da parte aérea (MSPA, g) de feijão-caupi do primeiro screening com cultivo sucessivo realizado. ....	50
Figura 7 - Valores de massa seca da parte aérea (MSPA, g), de nódulos (MSN, g) e nitrogênio presente na parte aérea (N na MSPA, mg) de feijão-caupi do segundo screening com dois solos. ....	52
Figura 8 - Heatmap de identidade genômica média (ANI) entre as estirpes de rizóbio selecionadas (L41, L47 e L76) neste estudo e espécies representativas do gênero <i>Bradyrhizobium</i> e <i>Microvirga</i> . ....	53
Figura 9 - Comparação entre as raízes coletadas dos experimentos de screening dos rizóbios e de coinoculação com actinobactérias. ....	56
Figura 10 - Comparação entre as raízes coletadas dos experimentos de screening dos rizóbios e de coinoculação com <i>Bacillus</i> spp.....	58
Figura 11 - Ensaios realizados para fixação de nitrogênio de vida livre em quatros meios livres de N. ....	59
Figura 12 - Experimento para produção do ácido indolacético (AIA) com adição do reagente de Salkowski. ....	61
Figura 13 - Ensaios realizados para solubilização e mineralização de fósforo em meio de cultura ágar PVK. ....	62
Figura 14 - Índices de solubilização e mineralização obtidos das estirpes. ....	62

Figura 15 - Reação do reagente colorimétrico de ácido ascórbico com o fosfato solúvel produzido pelas estirpes bacterianas em meio de cultura caldo PVK suplementado com fosfato de cálcio.....	63
Figura 16 - Reação do reagente colorimétrico de ácido ascórbico com o fosfato solúvel produzido pelas estirpes bacterianas em meio de cultura caldo PVK suplementado com lecitina de soja.....	63
Figura 17 - Resultados obtidos dos testes qualitativos para produção de biossurfactantes.....	64
Figura 18 - Resultados obtidos para o teste de emulsificação.....	65
Figura 19 - Índices de emulsificação e estabilidade da coluna de emulsão obtidos das estirpes.....	66

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição do meio de cultura YMA.....	33
Tabela 2 – Preparo da solução de Azul de Bromotimol a 0,5% p/v.....	34
Tabela 3 – Composição do meio de cultura CDA acrescido de nistatina.....	34
Tabela 4 – Composição do meio de cultura KADO.....	35
Tabela 5 - Adubação dos tratamentos relativos ao primeiro experimento. ....	35
Tabela 6 - Teores de micronutrientes, fósforo, matéria orgânica e pH em amostras de solo coletadas do CNPAT em Pacajus, Ceará e na UFC em Fortaleza, Ceará. ....	36
Tabela 7 - Atributos químicos do solo referentes à acidez, bases trocáveis e capacidade de troca catiônica (CTC) nas amostras de solo do CNPAT e da UFC. ....	36
Tabela 8 - Adubação dos tratamentos relativos ao segundo experimento.....	37
Tabela 9 - Adubação dos tratamentos relativos aos experimentos de coinoculação. ....	39
Tabela 10 - Composição do meio de cultura LGI semissólido.....	41
Tabela 11 - Composição do meio de cultura JMV semissólido. ....	42
Tabela 12 - Composição do meio de cultura JNFb semissólido.....	42
Tabela 13 - Composição do meio de cultura NFB semissólido. ....	43
Tabela 14 – Composição do meio de cultura DYGS. ....	43
Tabela 15 – Preparo do reagente de Salkowski. ....	44
Tabela 16 – Composição do meio de cultura PVK com fonte de fósforo inorgânico e orgânico. ....	44
Tabela 17 - Soluções para o preparo do reagente colorimétrico do ácido ascórbico. ....	45
Tabela 18 – Composição do caldo nutriente. ....	47
Tabela 19 - Composição do meio de cultura King B diluído. ....	48
Tabela 20 - Preparo das soluções para formação do corante cromoazurol S (CAS).....	48

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Importância do feijão-caupi .....</b>	<b>17</b>
<b>2.2 Fixação Biológica de Nitrogênio em feijão-caupi.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2.1 Fixadores de nitrogênio de forma simbiótica em feijão-caupi .....</b>	<b>20</b>
<b>2.3 Bactérias promotoras de crescimento vegetal (BCPV) .....</b>	<b>22</b>
<b>2.3.1 Actinobactérias .....</b>	<b>25</b>
<b>2.3.2 Bactérias do gênero <i>Bacillus</i>.....</b>	<b>26</b>
<b>2.4 Inoculação e coinoculação em feijão-caupi .....</b>	<b>28</b>
<b>3. HIPÓTESES.....</b>	<b>31</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>32</b>
<b>4.1 Objetivo Geral .....</b>	<b>32</b>
<b>4.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>32</b>
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
<b>5.1 Procedência dos isolados .....</b>	<b>33</b>
<b>5.2 Ativação das estirpes .....</b>	<b>33</b>
<b>5.3 Screening dos rizóbios em casa de vegetação quanto a eficiência simbiótica.....</b>	<b>35</b>
<b>5.4 Caracterização molecular dos rizóbios selecionados.....</b>	<b>38</b>
<b>5.5 Experimentos de coinoculação em feijão-caupi.....</b>	<b>39</b>
<b>5.5.1 Rizóbio e actinobactérias.....</b>	<b>39</b>
<b>5.5.2 Rizóbio e bactérias do gênero <i>Bacillus</i>. ....</b>	<b>40</b>
<b>5.6 Caracterização das propriedades de promoção de crescimento vegetal <i>in vitro</i> para uso em bioinsumos .....</b>	<b>41</b>
<b>5.6.1 Capacidade de fixação de nitrogênio em meio semissólido livre de nitrogênio.....</b>	<b>41</b>
<b>5.6.2 Produção de ácido indolacético (AIA).....</b>	<b>43</b>
<b>5.6.3 Competência para solubilização e mineralização de fosfato .....</b>	<b>44</b>
<b>5.6.4 Produção de biossurfactantes .....</b>	<b>46</b>
<b>5.6.5 Avaliação da síntese de sideróforos .....</b>	<b>47</b>
<b>5.7 Análise estatística.....</b>	<b>48</b>
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>49</b>
<b>6.1 Seleção das estirpes de rizóbio com alto desempenho simbiótico em feijão-caupi .....</b>	<b>49</b>
<b>6.2 Identificação molecular das estirpes de rizóbio .....</b>	<b>53</b>
<b>6.3 Ensaios de coinoculação entre o rizóbio selecionado e actinobactérias e <i>Bacillus</i> spp. ....</b>	<b>54</b>

<b>6.4 Caracterização dos mecanismos de ação para promoção de crescimento <i>in vitro</i> das estirpes .....</b>	<b>58</b>
<b>7. DISCUSSÃO .....</b>	<b>67</b>
<b>8. CONCLUSÃO.....</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>76</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Em 2024 a população mundial atingiu 8 bilhões de pessoas, com previsão de aumento populacional para 10 bilhões até o ano de 2080. Estima-se que o Brasil atinja seu pico populacional em 2040 com 220 milhões de pessoas e sofra uma redução populacional em 26% até 2100 (*UNITED NATIONS DEPARTMENT OF ECONOMIC AND SOCIAL AFFAIRS, 2024*). O aumento da população requer uma demanda maior na oferta de recursos alimentícios, contudo, atualmente 733 milhões e 2,33 bilhões de pessoas sofrem com a fome e subnutrição no mundo, respectivamente (OPAS, 2024). Conflitos armados, desigualdade socioeconômica e mudanças climáticas contribuem para o incremento da dificuldade de produção de alimentos e do acesso a dietas saudáveis. Para uma oferta e distribuição de alimentos neste contexto de incremento populacional e dificuldades de acesso pelas populações de menor poder aquisitivo é essencial associar estratégias econômicas à disponibilização de alimentos para evitar o agravamento da insegurança alimentar e da má nutrição (FAO *et al.*, 2024). Segundo o Guia alimentar para a população brasileira, o arroz e o feijão representam 25% da alimentação dos brasileiros. O feijão apresenta elevado poder de saciedade e é apontado como um alimento importante como fonte de proteína, fibras, vitaminas do complexo B, ferro, zinco e cálcio (BRASIL, 2014).

Segundo o IBGE (2024) a safra de grãos de 2025 está prevista para atingir 322,6 milhões de toneladas, representando um aumento significativo de 10,2% em relação ao ano anterior. De acordo com o terceiro prognóstico do Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA) divulgado pelo IBGE, a produção de feijão total em 2025 está estimada em 3,5 milhões de toneladas, representando um aumento de 12% em relação à safra de 2024. A estimativa total para a produção de feijão-caupi em 2025, considerando as três safras, é de 677 mil toneladas, sendo 20% da produção total de feijão no Brasil, com 68% da produção localizada nos estados nordestinos. O Ceará é o segundo maior produtor de feijão-caupi do Nordeste, após a Bahia, com estimativa de 113.000 toneladas em 2025, contudo, apresenta baixa produtividade em comparação a outros estados do Nordeste (CONAB, 2024). A baixa pluviosidade e a irregularidade das chuvas intensificam processos de erosão e salinização afetando a produtividade das culturas. As condições edáficas encontradas nos solos do Ceará podem se tornar fatores limitantes para o desenvolvimento das lavouras. Por conta disso, é necessário a escolha de cultivos adaptados às condições climáticas locais, como o feijão-caupi, em conjunto

com tecnologias que possam minimizar as intempéries presentes nos solos cearenses, como o manejo adequado dos nutrientes essenciais para as plantas, bem como o nitrogênio.

O nitrogênio (N) é um elemento químico essencial para as plantas, responsável pela formação dos ácidos nucleicos, aminoácidos, clorofila e proteínas, sendo exigido em grandes quantidades para o crescimento e desenvolvimento da planta (TRIPATHI; PANDEY; SHARMA, 2022). Os fertilizantes nitrogenados se tornaram os insumos químicos mais importantes na produção agrícola devido à relação com os parâmetros de produtividade e rendimento das plantas. O mercado global foi estimado em aproximadamente US\$ 165,78 bilhões em 2024, sendo a ureia o fertilizante nitrogenado mais utilizado (MORDOR INTELLIGENCE, 2024). O Brasil é o quarto maior consumidor de fertilizantes do mundo e a produção nacional atende menos de 20% da demanda, é importado anualmente 8,77 milhões de toneladas de fertilizantes nitrogenados, principalmente da Rússia, China e Argélia (BRASIL, 2020).

Uma alternativa para reduzir a dependência de fertilizantes de nitrogênio sintético e os efeitos negativos associados ao seu uso, como alteração na comunidade microbiana (ZHANG *et al.*, 2022) e aumento nos fluxos de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) para atmosfera (KUDEYAROV, 2020) é a utilização do segundo processo biológico mais importante do planeta, a fixação biológica de nitrogênio (FBN). A FBN é um processo natural desempenhado por bactérias responsáveis pela conversão do nitrogênio atmosférico em amônia, uma forma assimilável pelas plantas, e pode ocorrer de forma simbiótica, associativa ou de vida livre (SOUWARE *et al.*, 2020). A relação mais estudada é entre rizóbios e leguminosas, processo simbótico, no qual as bactérias disponibilizam o nitrogênio diretamente para as plantas nos nódulos e as plantas fornecem em troca energia para as bactérias (POOLE; RAMACHANDRAN; TERPOLILLI, 2018).

A diversidade de rizóbios nativos desempenha um papel fundamental como fonte de recursos genéticos para a seleção de isolados adaptados a diferentes condições ambientais (MEDEIROS *et al.*, 2009). Esses microrganismos podem apresentar resistência às temperaturas elevadas, secas extremas e solos com deficiência de nutrientes, sendo uma ferramenta importante para bioprospecção e formulação de inoculantes para potenciais aplicações em sistemas agrícolas (SANTOS *et al.*, 2008). O Brasil segue como líder global na utilização e produção de bioinsumos, como inoculantes, biofertilizantes e produtos biológicos para controle de pragas, seguindo um crescimento anual de 30% e mercado em 5 bilhões de reais (CROPLIFE BRASIL, 2024). Os avanços nessa área, não apenas melhoraram as práticas agrícolas, mas apresentam um gigantesco potencial para se tornarem produtos comercialmente viáveis que

podem beneficiar pequenos agricultores e de regiões em desenvolvimento (DA SILVA MEDINA; ROTONDO; RODRÍGUEZ, 2024). A produção de inoculantes à base de rizóbios contribui para a adoção de práticas agrícolas sustentáveis, ao minimizar a poluição causada pelo excesso de nitrogênio no solo, além de promover o crescimento e o desenvolvimento mais eficiente das plantas (WEI *et al.*, 2025).

Em adição, a formação de consórcios bacterianos com bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) tem se consolidado como uma estratégia promissora para potencializar os efeitos benéficos sobre o desenvolvimento vegetal, superando, em muitos casos, os resultados obtidos com a inoculação individual, como o uso de rizóbio e bactérias solubilizadoras de fósforo que promovem o aumento no número de nódulos, biomassa e produtividade, resultando em aumentos de 9-10% no crescimento das raízes e da parte aérea (KORIR; MUNGAI; WASIKE, 2024). Apesar dos avanços na utilização de microrganismos promotores de crescimento vegetal, ainda são escassos os estudos voltados especificamente à inoculação e à formulação de consórcios bacterianos para cultura do feijão-caupi. Essa lacuna é relevante considerando a importância agronômica e socioeconômica dessa leguminosa no Nordeste brasileiro, onde o uso de bioinsumo adaptados pode representar uma alternativa viável para aumento da produtividade com menor impacto ambiental.

Diante do exposto, este estudo tem por objetivo selecionar estirpes de rizóbios com elevada eficiência simbiótica para a cultura do feijão-caupi, bem como estabelecer um consórcio bacteriano com actinobactérias e bactérias do gênero *Bacillus* para potencializar os benefícios agronômicos da planta. Os resultados obtidos neste estudo estão associados aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) das Nações Unidas (2016), em relação ao segundo objetivo, intitulado “Fome Zero e Agricultura Sustentável”, que estabelece o compromisso de promover, até 2030, sistemas sustentáveis de produção de alimentos e estimular o uso de práticas agrícolas mais resilientes, ampliando a produtividade e melhorando a qualidade do solo, contribuindo para a segurança alimentar e a sustentabilidade ambiental.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Importância do feijão-caupi

A família Leguminosae apresenta 765 gêneros e 19.500 espécies, considerada a terceira maior família das angiospermas, sendo superada pela Asteraceae e Orchidaceae (ZHAO *et al.*, 2021). É uma família monofilética com espécies muito diversificadas e adaptadas a quase todos os ecossistemas terrestres com forma de vida como árvores, arbustos, trepadeira e erva. Anteriormente, a família Leguminosae era classificada em três subfamílias: Caesalpinoideae, Mimosoideae e Papilioideae. O *The Legume Phylogeny Working Group* (LPWG) realizou uma nova classificação das subfamílias em Detarioideae, Cercidoideae, Duperquetoideae, Dialioideae, Caesalpinoideae e Papilioideae (AZANI *et al.*, 2017). A maior subfamília é a Papilioideae, composta por 503 gêneros e 14.000 espécies, considerada cosmopolita. O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L., Walp.)) pertence à subfamília Papilioideae e é uma espécie valorizada por sua resistência a condições adversas, ciclo curto, baixa exigência hídrica e capacidade para se desenvolver em solos de baixa fertilidade, característica associada aos solos áridos e semiáridos.

As leguminosas ocupam uma posição de destaque na economia agrícola global, sendo a segunda família de plantas mais importante, atrás apenas das gramíneas (Poaceae). Possuem grande importância com mercado das ervilhas, grão-de-bico, lentilhas, soja e feijão. Entre 2015 e 2024, o comércio global de leguminosas registrou um aumento de 29%, com previsão para alcançar 21 bilhões de quilogramas, o que equivale a 20% da produção mundial (IBRAFE, 2024). O Brasil é o segundo maior produtor de feijões no mundo, depois da Índia (FAO, 2024). Segundo estimativas da Embrapa Arroz e Feijão (2023), os feijões mais consumidos no Brasil são o feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) e o feijão-caupi, com consumo de 80 e 20%, respectivamente.

O feijão-caupi é conhecido como feijão-de-corda, feijão-fradinho e feijão-miúdo, apresenta grande importância nutricional e econômica, especialmente em regiões da África, Ásia e Américas. É uma leguminosa originária da África que foi introduzida no Brasil pelos colonizadores portugueses no século XVI. Desde então, tornou-se uma cultura importante em várias regiões do país, especialmente no Nordeste, devido à sua resistência à seca e a capacidade de adaptação a solos de baixa fertilidade (CRUZ *et al.*, 2020; RODRIGUES MAIA, 2023). Está presente em diversos pratos, como no preparo do acarajé, baião de dois e feijão tropeiro. Nutricionalmente, o feijão-caupi é uma excelente fonte de proteína, com teor entre 23% a 25%,

carboidratos, vitaminas e minerais, além de ser rico em fibras dietéticas, baixo teor de gordura e possuir propriedades antioxidantes. Essas características tornam-no fundamental para a segurança alimentar e a economia agrícola por ser uma fonte acessível de nutrientes em áreas em desenvolvimentos, especialmente entre produtores de base familiar das regiões semiáridas (ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2002; AFFRIFAH; PHILLIPS; SAALIA, 2022).

As regiões áridas ou semiáridas são classificadas de acordo com a precipitação média anual, sendo essas com valores entre 300 e 1000 mm, caracterizando baixa disponibilidade de água e altos valores de irradiação solar. Conforme o INSA (2024), o Semiárido Brasileiro ocupa 12% do território nacional, apresenta característica climática com precipitação pluviométrica média anual inferior a 800 mm e risco de seca maior que 60%. O semiárido nordestino brasileiro apresenta uma área de 982.563 km<sup>2</sup> que abrange um total de 1171 municípios, entre os estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe, englobando um total aproximado de 89.5% de toda a região (IBGE, 2021). Essas regiões apresentam uma elevada produção agrícola especialmente das culturas do milho, feijão e mandioca. Estes cultivos proporcionam uma renda anual de 1 bilhão, 900 milhões e 800 milhões de reais, respectivamente (INSA, 2024).

O cultivo do feijão-caupi se concentra nas regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste, contudo, a grande maioria dos seus consumidores se concentram na região Nordeste. Algumas variedades são recomendadas para a região Nordeste como a BRS Guariba, BRS Novaera, BRS Pujante e BRS Tumucumaque (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Sousa *et al.* (2019) identificaram genótipos de feijão-caupi com maior produtividade, boa adaptabilidade e estabilidade, um dos genótipos selecionados foi a BRS Tumucumaque, que apresentou alta produtividade de grãos imaturos, adaptabilidade e estabilidade genotípica, sendo adequado para cultivo no Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte. O Nordeste brasileiro apresentou uma área de plantio de 1.055,6 mil ha<sup>-1</sup>, com produção de 407 mil toneladas e uma produtividade média de feijão-caupi em torno de 385 quilos ha<sup>-1</sup> segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (2024), sendo a contribuição da região em relação à área colhida total, produção total e produtividade, 84%, 68% e 14%, respectivamente. Segundo a Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico o Monitor de Secas registrou uma expansão da seca moderada (S1) nas regiões central e oeste do Ceará, devido à deterioração dos indicadores de seca, aumentando a porcentagem do estado afetada para 95,6% em novembro (ANA, 2024). A baixa produtividade pode ser associada a diversos fatores bióticos e abióticos, como manejo da fertilidade do solo, tecnificação, além da formação da simbiose funcional com as bactérias fixadoras de nitrogênio (BRITO; MURAOKA; SILVA, 2011).

## 2.2 Fixação Biológica de Nitrogênio em feijão-caupi

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um dos processos biológicos mais importantes e promove a redução do N<sub>2</sub> em formas assimiláveis para a planta. Na associação entre rizóbio e leguminosas a conversão do N<sub>2</sub> ocorre em estruturas formadas pelas plantas nas raízes, chamadas de nódulos (CARDOSO; ANDREOTE, 2016). Estima-se que a simbiose mutualista entre os rizóbios e membros da família Leguminosae surgiu há 60 milhões de anos. A simbiose está presente nas subfamílias Papilionoideae e Caesalpinoideae. A baixa resolução da árvore filogenética da família impede a definição precisa da origem da simbiose dentro da família, sendo apontado até sete possíveis origens de nodulação nas leguminosas (DOYLE, 2011). Essa associação fornece nitrogênio (N), que é um elemento limitante ao desenvolvimento das plantas, sendo classificado, dentro dos critérios de essencialidade, como macronutriente primário.

Os solos da zona tropical apresentam baixas concentrações de N, sendo necessário o suprimento deste elemento para que sejam alcançadas altas produtividades agrícolas. O feijão-caupi apresenta a capacidade de se associar e fixar altas quantidades de N com diversas bactérias fixadoras de nitrogênio presentes nos solos, sendo importante para pequenos produtores que normalmente não utilizam inoculantes ou fertilizantes nitrogenados para produção (SENA *et al.*, 2020). Por serem consideradas plantas promíscuas, realizam simbiose com várias espécies de rizóbios que podem ser muito ou pouco eficientes na FBN, devido a isso, a seleção de bactérias diazotróficas eficientes e adaptadas para composição de inoculantes se torna necessário para agricultura no Brasil (MARINHO *et al.*, 2017).

Segundo a Instrução Normativa SDA/MAPA 13/2011, quatro estirpes são autorizadas e recomendadas pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) para produção de inoculantes no Brasil, a UFLA 3-84 (= SEMIA 6461), a BR 3267 (= SEMIA 6462), a INPA 3-11B (= SEMIA 6463) e a BR 3262 (= SEMIA 6464), todas pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*. A UFLA 3-84 e INPA 03-11-B foram recomendadas pela Universidade Federal de Lavras (UFLA) e as estirpes BR 3267 e BR 3262 foram recomendadas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) (BRASIL, 2011). A eficiência das estirpes varia conforme o sistema produtivo e região de cultivo (MARTINS *et al.*, 2003; MARINHO *et al.*, 2014), além de depender da interação entre genótipo e estirpe (MELLO; ZILLI, 2009).

Oliveira *et al.* (2023) analisaram o desempenho agronômico de cultivares de feijão-caupi inoculadas com rizóbios recomendados em Mossoró (RN) e observaram que a cultivar BRS Tumucumaque demonstrou maior potencial produtivo e as estirpes de *Bradyrhizobium* BR

3262 e BR 3267 proporcionaram rendimentos semelhantes ao controle com aplicação de fertilizante nitrogenado. Outros estudos observaram que a cultivar BRS Tumucumaque apresenta alta eficiência simbiótica quando inoculada com *Bradyrhizobium japonicum*, aumentando a produtividade dos grãos em comparação com outras cultivares e ao controle sem inoculação (DE SOUSA *et al.*, 2018). A estirpe BR 3267 foi isolada de solo do semiárido, na região de Petrolina, PE, e apresentou significativa capacidade de promoção de produtividade do feijão-caupi. Em condições experimentais, a inoculação com essa estirpe proporcionou produtividade de 700 kg ha<sup>-1</sup>, desempenho semelhante ao obtido com a adubação nitrogenada mineral, demonstrando seu potencial no semiárido nordestino. Além disso, em experimentos em condição de campo, proporcionou incremento produtivo de até 52% em comparação com o controle não inoculado (RUMJANEK *et al.*, 2006). Logo, vale ressaltar a importância de utilizar estirpes nativas para melhor desempenho das culturas, além de explorar ecossistemas brasileiros para prospecção de novos isolados, devido a sua alta diversidade de estirpes do gênero *Bradyrhizobium* com resistência a condições estressantes (GUIMARÃES *et al.*, 2015).

### **2.2.1 Fixadores de nitrogênio de forma simbiótica em feijão-caupi**

O microbioma do solo é definido como o conjunto de microrganismos presentes no solo, sendo influenciado pela sazonalidade natural e pelas práticas de uso que alteram a composição e as funcionalidades desses microrganismos (LACERDA-JÚNIOR *et al.*, 2019). Em uma grama de solo pode-se encontrar bactérias, arqueias, protistas e fungos e suas atividades metabólicas influenciam a biogeoquímica do solo, a atmosfera e as plantas (PHILIPPOT *et al.*, 2024). Entretanto, as plantas também são responsáveis por modificar a abundância e a riqueza dos microrganismos, dependendo da espécie de plantas, do genótipo, da idade e do estágio de desenvolvimento, essas vão atuar selecionando a microbiota do solo e todas as partes colonizadas das plantas acima do solo (COMPANT *et al.*, 2025).

Em 1881, foi evidenciado que existia uma maior exigência por nitrogênio do que os outros nutrientes do solo e que as leguminosas eram capazes de acumular níveis elevados de nitrogênio. Posteriormente, em 1888, notou-se que os nódulos presos nas raízes dessas plantas eram responsáveis pela conversão do nitrogênio atmosférico em compostos nitrogenados solúveis (HANSEN *et al.*, 2017). A partir disso, foi possível determinar os responsáveis pela indução da formação desses nódulos, com a primeira espécie de rizóbio sendo identificada por Frank (1889), o *Rhizobium leguminosarum*, obtido de leguminosas agrícolas, relatada como fixadora de nitrogênio. Os rizóbios são bactérias gram-negativas, parafiléticas. Pertencentes ao

filo Pseudomonadota, classes Alphaproteobacteria e Betaproteobacteria e ordens Hyphomicrobiales e Burkholderiales, respectivamente. A primeira ordem apresenta sete famílias, entre elas, a Nitrobacteraceae com o gênero *Bradyrhizobium*, atualmente com 73 espécies e a família Rhizobiaceae com gênero *Rhizobium* que apresenta 95 espécies, segundo o *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* (LPNS) (PARTE *et al.*, 2020). A ordem Burkholderiales apresenta apenas uma família com fixadores de nitrogênio, a Burkholderiaceae, com os gêneros *Cupriavidus* e *Paraburkholderia*.

A formação dos nódulos em leguminosas pelos rizóbios é estimulada pelos fatores de nodulação, com os genes *nod*, *nol* e *noe* codificando as proteínas que atuam na quimiotaxia com as plantas. A invasão das raízes pelos rizóbios é feita pelo cordão de infecção e posteriormente à formação do nódulo as bactérias se diferenciam em bacteroides, formando o simbiosoma. Com a formação do simbiosoma há a expressão da nitrogenase que realiza o processo de redução do N<sub>2</sub> e disponibiliza o nitrogênio para planta (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Sabe-se que o processo de fixação pode ser catalisado por três tipos de nitrogenase geneticamente distintas, a molibdênio-ferro (MoFe nitrogenase) codificada pelos genes *nifHDK*, sendo esta a enzima mais frequentemente encontrada, principalmente nos rizóbios simbióticos, além disso, existem outras duas formas alternativas, a vanádio-ferro (VFe nitrogenase) (*vnfHDK*) e a ferro-ferro (FeFe nitrogenase) (*anfHDK*). A regulação das formas de nitrogenase está intimamente ligada à disponibilidade de Mo e V, e a história evolutiva indica que as formas alternativas são derivadas da MoFe-nitrogenase, que tinha a capacidade de se ligar a vários aglomerados metálicos, permitindo adaptabilidade nas primeiras formas de vida. O complexo MoFe nitrogenase é formado por duas proteínas: a nitrogenase redutase (Fe-proteína) e a dinitrogenase (MoFe-proteína) que atuam na redução de N<sub>2</sub> a 2NH<sub>3</sub>. A enzima nitrogenase é sensível ao oxigênio, tornando os nódulos um ambiente favorável para atividade, entretanto, os bacteroides necessitam do O<sub>2</sub>. Esta demanda é fornecida pela leghemoglobina, uma proteína que se liga ao O<sub>2</sub> e fornece um ambiente microaerofílico para a atividade da nitrogenase dentro dos nódulos. Posteriormente, o nitrogênio fixado é incorporado ao metabolismo das leguminosas (BOYD; HAMILTON; PETERS, 2011; BOYD E PETERS, 2013; VAN STAPPEN *et al.*, 2020).

Os rizóbios apresentam uma vasta diversidade genética devido ao seu estilo de vida, como saprófitos ou simbiontes. Os genes para simbiose podem ser encontrados nos cromossomos ou plasmídeos, como os genes *nod*, responsáveis pela sinalização para formação de nódulos, *nif*, atuando diretamente na formação do complexo enzimático nitrogenase, enzima que realiza a fixação biológica de N<sub>2</sub> e o gene *fix*, específico para os simbóticos, contribuindo

para manutenção da atividade da nitrogenase nos nódulos (PROVOROV; ANDRONOV; ONISHCHUK, 2017; POOLE; RAMACHANDRAN; TERPOLILLI, 2018).

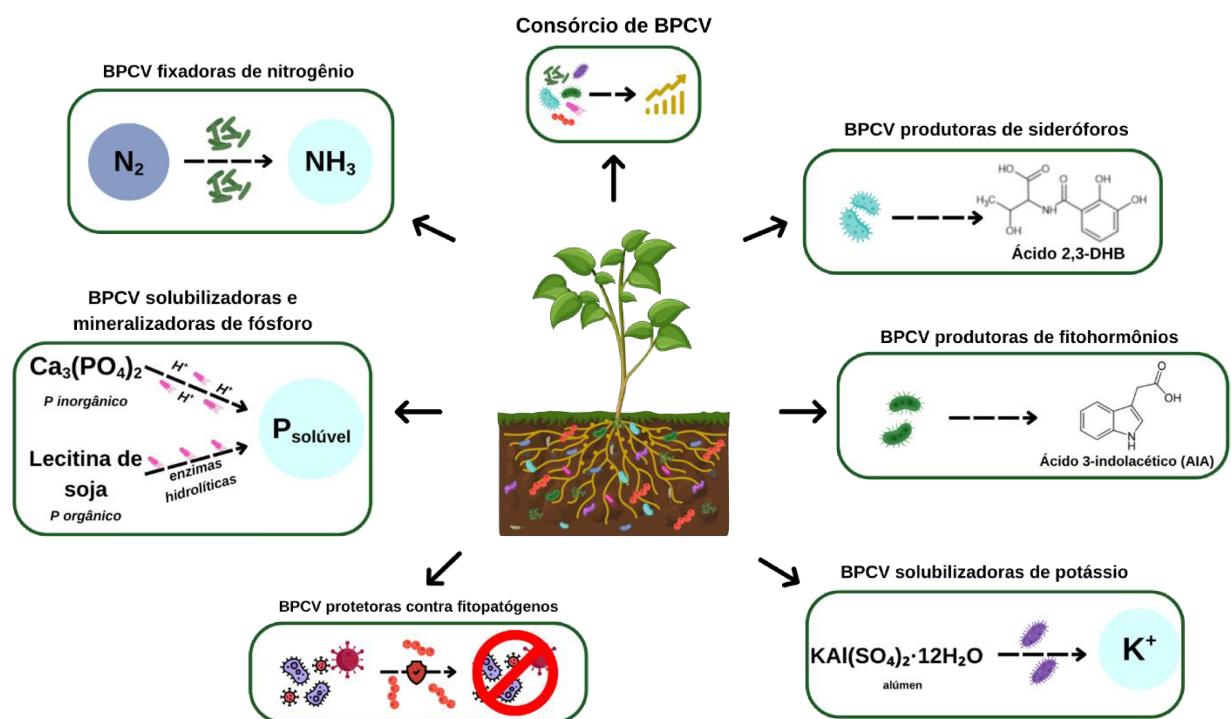
Zilli *et al.* (2004) avaliaram a diversidade de rizóbios associados ao feijão-caupi em áreas do Cerrado nordestino. Observou-se que a introdução do feijão-caupi e outras leguminosas influenciou o microbioma do solo. Especificamente, o cultivo prolongado do feijão-caupi levou a uma mudança notável na dinâmica da população de rizóbios, com maior prevalência da espécie de *Bradyrhizobium elkanii*. Essas espécies também demonstraram maior resistência a antibióticos, sugerindo que o cultivo de feijão-caupi pode ter selecionado grupos específicos de rizóbios com características competitivas. O gênero *Bradyrhizobium*, quando associado com feijão-caupi, confere o aporte de N necessário para o desenvolvimento e crescimento da planta (RUMJANEK *et al.*, 2006; ZILLI; XAVIER; RUMJANEK, 2008) além de favorecer a fertilidade do solo (BRAGA, 2020) e de atuar como agente de biocontrole promovendo a produção de metabólitos secundários com ação contra fitopatógenos (KANNAN *et al.*, 2019). Marinho *et al.* (2014, 2017) identificaram duas estirpes pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* e uma pertencente à espécie *Microvirga vignae* a partir de amostras de solo da região semiárida nordestina que apresentaram rendimentos semelhantes as estirpes recomendadas. Estes estudos evidenciam a importância de explorar a diversidade genética de rizóbios em regiões semiáridas. Outra opção para incrementar o rendimento do feijão-caupi é a adoção da coinoculação com outras bactérias promotoras de crescimento vegetal com efeito benéfico na fixação biológica de nitrogênio. Isolados dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Burkholderia* e *Arthrobacter* são amplamente estudados por seus benefícios como promotores de crescimento e no biocontrole de diversas doenças em plantas (LAU *et al.*, 2020), sendo potenciais candidatos para a formulação de inoculantes mistos.

### **2.3 Bactérias promotoras de crescimento vegetal (BCPV)**

Bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) são microrganismos benéficos que podem atuar na facilitação de nutrientes essenciais, elevar a resiliência da planta em ambientes com estresse abióticos e bióticos, além de incrementar o crescimento e o desenvolvimento da planta (REED; GLICK, 2023). Os mecanismos de ação realizados por essas bactérias para promoção de crescimento podem ser divididos em diretos ou indiretos. A facilitação da aquisição de nutrientes minerais essenciais como fósforo, nitrogênio, potássio e ferro para absorção pela planta e a produção de fitohormônios que promovem o aumento de

biomassa da parte aérea e das raízes são interações diretas entre as bactérias e as plantas. Hashem, Tabassum e Abd\_Allah (2019) relataram alguns mecanismos realizados por essas bactérias como solubilização de fosfatos, produção de sideróforos e fitohormônios como ácido indolacético (AIA) que promovem resistência das plantas a estresses bióticos. Já os mecanismos indiretos envolvem produção de metabólitos secundários que auxiliam tolerar condições adversas de seca, salinidade e contaminação, bem como, na inibição de patógenos e indução de resistência sistêmica adquirida nas plantas (RADHAKRISHNAN; HASHEM; ABD\_ALLAH, 2017; OLANREWAJU; GLICK; BABALOLA, 2017). Alguns mecanismos estão exemplificados na Figura 1.

Figura 1 - Mecanismos de ação promovidos por bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) que influenciam as plantas.



Fonte: Elaborado pela autora.

As BPCV podem secretar pequenas moléculas que são quelantes de ferro e servem como transportadores de ferro, essas bactérias produtoras de sideróforos podem impedir o desenvolvimento de fitopatógenos, diminuindo a biodisponibilidade de ferro no ambiente absorvendo ou fornecendo para planta. Essa molécula pode ser classificada de acordo com a sua natureza química como: Catecolados, hidroxamatos e mistos. O sideróforo produzido na Figura 1 é do tipo catecolado, no qual o íon  $Fe^{3+}$  se liga a um grupo hidroxila de anéis

aromáticos. Todos os sideróforos dessa classe são derivados do ácido salicílico ou ácido 2,3-di-hidroxibenzóico, compostos orgânicos encontrados em plantas. (TIMOFEEVA; GALYAMOVA; SEDYKH, 2022).

A produção de fitohormônios, como ácido indol-3-acético, por essas bactérias no solo aumenta as concentrações de auxina na planta, incrementando o comprimento e a área de superfície da raiz e a liberação de exsudatos pelas plantas. Grande parte das BCPV apresentam uma ou mais vias funcionais de biossíntese de AIA que utilizam o aminoácido triptofano presente nos exsudatos das raízes das plantas como precursor, demonstrando a importância desse fitohormônio para o funcionamento da bactéria e a sua disponibilização para planta (OLANREWAJU; GLICK; BABALOLA, 2017). A solubilização de potássio (K) é um dos mecanismos diretos exercidos por essas bactérias, atuam secretando ácidos que reduzem o pH local e protonam minerais, dissolvendo-os e liberando K, como demonstrado na Figura 1, a liberação do íon potássio do alúmen. Esse processo facilita o acesso das plantas ao nutriente e promove diversos benefícios, incluindo melhor atividade enzimática e resistência ao estresse hídrico (FANAI *et al.*, 2024).

Essas BPCV podem atuar liberando outros nutrientes como fósforo, por meio da solubilização e/ou mineralização de fosfatos. O mecanismo de solubilização ocorre com a acidólise, semelhante a liberação do K, com a utilização de ácidos orgânicos e inorgânicos que atuam reduzindo o pH do solo e quelando íons metálicos ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) e disponibilizando formas solúveis ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  ou  $\text{HPO}_4^{2-}$ ) para as plantas. A mineralização é realizada por meio de enzimas que degradam compostos orgânicos que apresentam fósforo, como a fitase que mineraliza o fitato que posteriormente libera grupos fosfatados, assimiláveis pelas plantas (PAN; CAI, 2023).

O processo de conversão do  $\text{N}_2$  em formas assimiláveis pela planta, como  $\text{NH}_3$ , também é realizado por BPCV como descrito nos tópicos anteriores pelos rizóbios. Além disso, essas bactérias podem ser produtoras de biosurfactantes, compostos que fornecem uma alternativa sustentável ao uso de surfactantes sintéticos por serem biodegradáveis, menos tóxicos e estabilizarem de forma mais precisa os contaminantes em determinados ambientes, adicionalmente, atuando na melhoria da nodulação entre rizóbios e leguminosas. Podem ser classificados como lipopeptídeos e lipoproteínas, glicolipídios, fosfolipídios, ácidos graxos, complexos de polissacarídeo-lipídios e surfactantes poliméricos e atuam, além da biorremediação de contaminantes, na proteção das plantas contra fitopatógenos e na absorção de nutrientes, além de melhorar a estrutura do solo e a disponibilidade de compostos essenciais para as plantas (MARCHUT-MIKOŁAJCZYK *et al.*, 2021).

O isolamento e identificação dessas BCPV vêm se tornando foco da promoção de uma agricultura sustentável com elevada produtividade agrícola. Adicionalmente, o processo de formulação de consórcios bacterianos com essas bactérias é uma opção para ampliação na ação como promotoras de crescimento vegetal, combinando diversos mecanismos de ação para o desenvolvimento e o crescimento das plantas. Além disso, diversos gêneros bacterianos são estudados como promotores de crescimento vegetal como *Bacillus* spp. e *Streptomyces* spp., gênero pertencente as actinobactérias (RUIU, 2020).

### 2.3.1 *Actinobactérias*

Os solos do semiárido nordestino apresentam microbiomas diversificados, composto por representantes de actinobactérias, fungos, bactérias e algas com potencial para diversas aplicações como as práticas de restauração ambiental (ARAÚJO *et al.*, 2025). Vásquez-Dean *et al.* (2020) realizaram um levantamento relativo à abundância microbiana em ambientes áridos e observaram que o filo dominante é a *Actinobacteria* e os de menores abundâncias são as *Proteobacteria*, *Cyanobacteria* e *Planctomycetes*. Nesse estudo os autores observaram que a precipitação e temperatura anual influenciaram significativamente na estrutura das comunidades microbianas nesses solos, em contraste, o pH não apresentou um efeito perceptível.

As actinobactérias são gram-positivas e pertencentes ao filo *Actinobacteria*. Este filo é dividido nas classes Acidimicrobiia, Actinomycetes, Coriobacteriia, Nitriliruptoria, Rubrobacteria e Thermoleophilia, 29 ordens, 67 famílias, 391 gêneros e mais de 3900 espécies. O gênero de maior abundância nos solos é o *Streptomyces*, com cerca de 1275 espécies (YADAV *et al.*, 2019; LPSN, 2024). Essas bactérias apresentam um alto conteúdo de guanina e citosina (G+C) em seu DNA o que contribui para sua resistência a condições ambientais extremas, como altas temperaturas e baixa umidade. Além disso, são conhecidas por sua rica diferenciação morfológica, que inclui a formação de filamentos semelhantes às hifas fúngicas e a produção de esporos que fazem parte do seu ciclo de vida.

Essas características, semelhantes às dos fungos filamentosos, favorecem a multiplicação e a adaptação das actinobactérias a diversos ambientes. As actinobactérias produzem metabolitos secundários diversos que são usados clinicamente como compostos anticancerígenos, anti-helmínticos e antifúngicos (LI *et al.*, 2016; KOTHE 2018; FEENEY *et al.*, 2022). São encontradas em diversos ecossistemas, tanto aquáticos quanto terrestres, e

desempenham papéis importantes em comunidades microbianas associadas a plantas (BARKA *et al.*, 2016).

As actinobactérias são grandes produtoras de enzimas extracelulares capazes de degradar compostos complexos como lignoceluloses das plantas e quitina presente no exoesqueleto de insetos atuando na ciclagem de matéria orgânica e contribuindo para a saúde do solo. Isolados do gênero *Frankia* podem atuar na melhoria do solo fixando nitrogênio (JAVED *et al.*, 2021). Xie e Pathom-aree (2021) analisaram a diversidade de actinobactérias em ambientes desérticos e observaram seu alto potencial biotecnológico para agricultura por meio de mecanismos de ação como bactéria promotora de crescimento (produção de sideróforos, de auxina, atividade da ACC deaminase e solubilização de fosfato), como biocontrole (enzimas e antibiótico) e o potencial de mitigar estresses abiótico em plantas. Essas características possibilitam o uso dessas bactérias como BPCV em formulação de inoculantes ou em consórcios bacterianos.

A aplicação de actinobactérias em feijão-caupi ainda é pouco explorada. Mukhtar *et al.* (2020) identificaram diversos filos bacterianos em associação com os nódulos de feijão-caupi como Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria. Neste estudo os gêneros de Actinobacteria, *Streptomyces* e *Frankia*, foram os mais representativos no microbioma do nódulo de feijão-caupi. Análises metagenômicas demonstram a predominância do filo Actinobacteria na comunidade microbiana associada a rizosfera do feijão-caupi na África do Sul (JAISWAL; MAREDI; DAKORA, 2021). De Sousa *et al.* (2023) realizaram bioprospecção de estirpes de actinobactéria e de rizóbio de feijão-caupi em amostra de solo oriundas do semiárido nordestino. Estes autores realizaram testes de facilitação *in vitro* entre as estirpes e observaram pares de estirpes de elevada sinergia *in vitro*, indicando esses isolados como promissores para cocultivo e coinoculação. Esses trabalhos demonstram o potencial biotecnológico dessas bactérias como bioinoculante para promoção do crescimento de plantas e a importância de avançar em pesquisas relacionadas a coinoculação com rizóbios, devido a interação já existente no microbioma em associação com feijão-caupi.

### **2.3.2 Bactérias do gênero *Bacillus***

O gênero *Bacillus* é encontrado em uma variedade de ambientes e é amplamente estudado devido à presença de estirpes com características multifuncionais. Nos solos desempenham papéis cruciais na promoção de crescimento das plantas e no controle biológico (VASQUES; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2024). Além disso, podem atuar na biorremediação de

metais pesados, como demonstrado por Ramírez *et al.* (2019) que utilizaram *Bacillus* sp. MH778713 em associação com árvores de mesquite (*Prosopis laevigata*) para fitorremediação de solos áridos e semiáridos contaminados com metais pesados. Essas bactérias apresentam resistência a altas temperaturas e baixa precipitação, o que torna candidatos ideias para melhorias na fertilidade do solo e promoção de uma agricultura sustentável em regiões semiáridas (DIAZ-GARZA *et al.*, 2020).

O gênero *Bacillus* pertence ao filo Firmicutes, classe *Bacilli*, ordem *Bacillales*, família *Bacillaceae* com mais de 110 espécies relatadas (LPSN, 2024). As espécies mais encontradas nos solos são *B. subtilis* e *B. cereus* (OREM *et al.*, 2019). São bactérias gram-positivas com baixo teor de G+C, predominantemente aeróbicas, mas havendo também isolados anaeróbicos. Algumas espécies apresentam formação de endósporos aeróbicos que possibilita resistência à radiação, luz UV, calor e produtos químicos, permitindo sua sobrevivência em condições adversas por longos períodos (LIU *et al.*, 2019). Além disso, secretam diversas enzimas extracelulares como amilases, celulases, quitinases e lipases utilizadas nas indústrias alimentícia, têxtil, de rações e de detergentes e também podem exercer promoção de crescimento em plantas (SANSINENEA, 2019).

Devido a esse alto potencial biotecnológico para aplicação na agricultura, as bactérias do gênero *Bacillus* têm sido estudadas sendo utilizadas em diversas culturas. Almeida *et al.* (2021) analisaram a colonização endofítica do milho por *B. thuringiensis* RZ2MS9 e identificaram a promoção do crescimento e alterações na emissão de compostos orgânicos voláteis da planta. Ademais, a coinoculação com *Azospirillum brasiliense* Ab-V5 promoveu aumento de 50% e 80% do peso seco das raízes e da parte aérea. Para cultura da soja, a coinoculação de estirpe de *Bradyrhizobium* com *B. amyloliquefaciens* e *Trichoderma asperellum* aumentou a produtividade em torno de 7% a 13% em comparação com a inoculação feita apenas com rizóbio (LEITE *et al.*, 2023).

Em feijão-caupi, algumas estirpes foram testadas, principalmente da espécie *B. subtilis* que apresenta características de solubilizar fosfatos, produzir AIA, sideróforos, amônia e enzimas hidrolíticas (MINAXI. *et al.*, 2012). Costa *et al.* (2016) identificaram isolados do gênero *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Enterobacter* e *Pseudomonas* do nódulo de feijão-caupi cultivados nas savanas brasileiras capazes de realizar a fixação de nitrogênio biológica de vida livre, solubilização de fosfatos de cálcio, alumínio e ferro e produção de AIA. Algumas estirpes podem aumentar a resistência da planta como a *B. subtilis* MF497446 que se mostrou eficaz em promover o crescimento de feijão-caupi sob condições de estresse de cádmio, aumentando a

biomassa da planta e reduzindo as concentrações desse potencial elemento tóxico (PET) nos tecidos vegetais (EL-NAHRAWY; ELHAWAT; ALSHAAL, 2019).

O uso de consórcio bacteriano para cultura do feijão-caupi fornece vantagens na melhoria do crescimento, da nodulação e da resistência a estresses ambientais. A coinoculação de *Bradyrhizobium* sp. e *B. subtilis* gerou um aumento no crescimento, na nodulação e no rendimento em feijão-caupi, além de reduzir a concentração metais pesados na parte aérea da planta e nos grãos que são encontrados em solos poluídos com água de mina, sendo possível verificar a habilidade dessas bactérias em processos de biorremediação (NEVHULAUDZI; KANU; NTUSHELO, 2020). Andrade Santos *et al.* (2018) demonstraram que a coinoculação entre bactérias fixadores de nitrogênio e promotoras de crescimento de plantas podem promover alterações no metabolismo e auxiliar o feijão-caupi na tolerância ao estresse salino, por meio do uso de estirpes de *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp., *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. e *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. que apresentaram maior eficiência na fixação biológica de nitrogênio, mesmo em condições de 50 mmol L<sup>-1</sup> cloreto de sódio (NaCl), ativando vias metabólicas (GS/GOGAT) para incorporação do amônio e beneficiaram o metabolismo do carbono nas plantas.

Esses estudos evidenciaram o potencial biotecnológico das bactérias do gênero *Bacillus* como uma alternativa sustentável aos fertilizantes e pesticidas químicos. Adicionalmente, a formação de consórcios entre bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) permite a integração de diferentes mecanismos de ação, essa interação ocorre naturalmente no microbioma do solo, melhorando a adsorção de nutrientes e reduzindo a necessidade de insumos químicos (RÍOS-RUIZ *et al.*, 2020), além de moldar a estrutura da comunidade bacteriana dos solos, enriquecendo grupos funcionais ligados à FBN, solubilização de fósforo e outros benefícios (WANG *et al.*, 2018). Dessa forma, torna-se fundamental o aprofundamento no estudo e na avaliação dessas interações no solo, visando a coinoculação na formulação de inoculantes com microrganismos benéficos para diversas culturas, especificamente o feijão-caupi.

## **2.4 Inoculação e coinoculação em feijão-caupi**

Trabalhos voltados para produção de inoculantes e a formulação de consórcios bacterianos voltados para o feijão-caupi são escassos, apesar dos avanços, a literatura destaca essa baixa no desenvolvimento de estudos voltados para inoculação em feijão-caupi. Com objetivo de entender o panorama atual da pesquisa sobre esse tema, foi realizada uma busca

bibliográfica na base de dados *Web of Science* (<https://www.webofscience.com>) em 17 de julho de 2025 utilizando a *string* de busca: ("cowpea" OR "vigna unguiculata") AND (inoculan\* OR bioinoculan\*) AND (rhizo\* OR brady\*) que permitiu a procura de trabalhos voltados para inoculação em feijão-caupi com rizóbios, incluindo todas as variações da palavra com uso de asterisco. Posteriormente, foi analisado os trabalhos relativos a coinoculação em feijão-caupi com a *string* de busca: ("cowpea" OR "vigna unguiculata") AND (inoculan\* OR bioinoculan\*) AND (rhizo\* OR bradyrhizobium) AND (coinoculat\* OR "co inoculat\*" OR "co-inoculat\*" OR "consort\*") para uma busca na base de dados relativas ao uso de consórcios bacterianos na cultura do feijão-caupi.

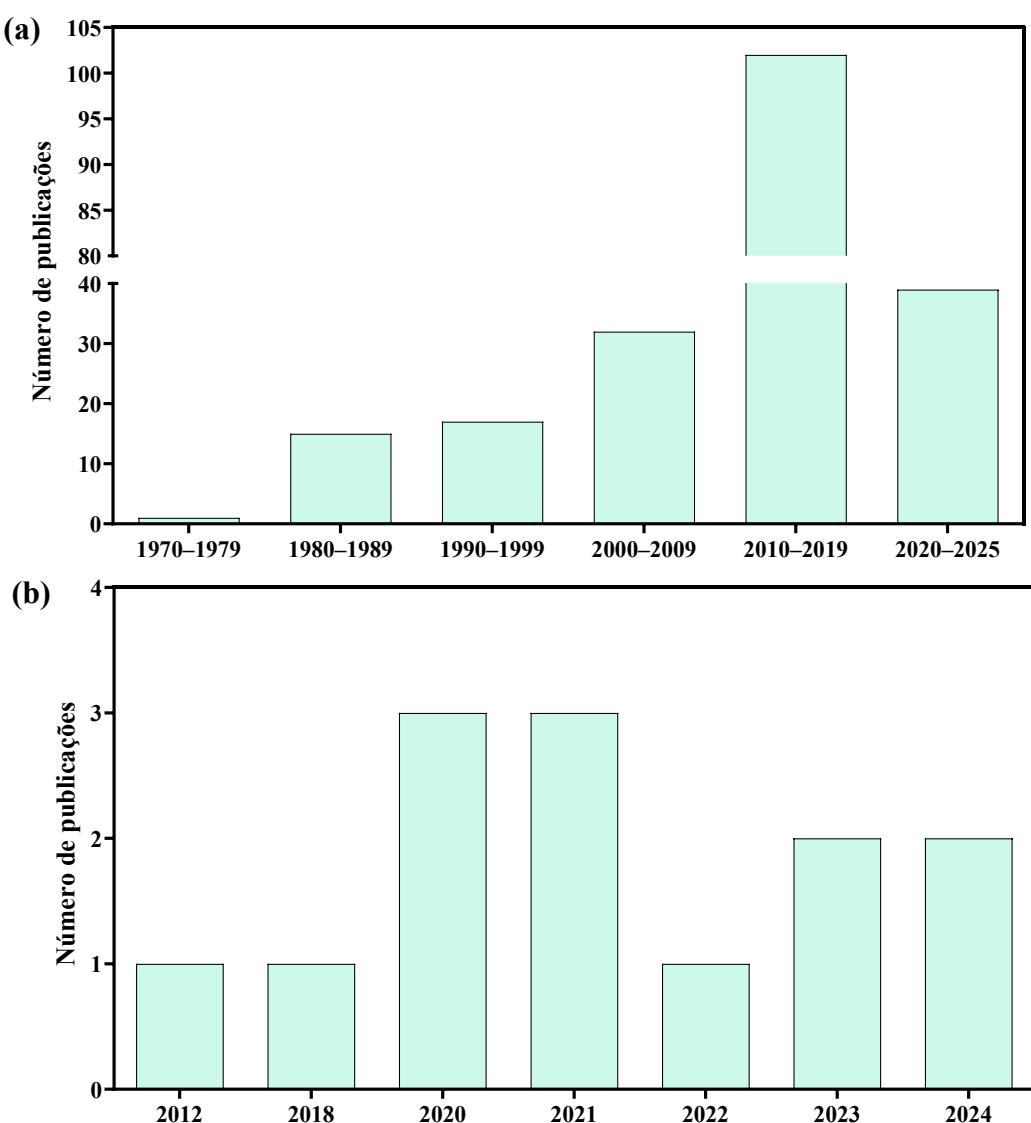
As informações obtidas foram reunidas na Figura 2, a busca identificou 206 publicações relacionadas ao tema de inoculação em feijão-caupi (Figura 2 – a). Observa-se que entre 1970 e 2009 houve apenas 50 publicações em quatro décadas. No entanto, a partir de 2010, observa-se um crescimento acentuado, com destaque para o período de 2010 a 2019, que concentrou cerca de 49,5% das publicações (102 estudos), seguido por 2020 a 2025, com 39 publicações (18,9%), com destaque para os anos de 2020 (21 publicações), 2022 (19 publicações) e 2021 (18 publicações), evidenciando o crescente interesse na avaliação e na formulação de inoculantes para a cultura do feijão-caupi. Antes de 2010, o número de publicações era significativamente menor, indicando que se trata de uma linha de pesquisa relativamente recente e em expansão. Além disso, o Brasil foi um dos países pioneiros no estudo da inoculação em feijão-caupi, atualmente, 68 trabalhos (33%) pertencem a pesquisa brasileira que é referência na produção e no estudo desses bioinssumos.

A análise temporal das publicações obtidas na base de dados Web of Science demonstra uma tendência de crescimento no número de estudos relacionados à coinoculação em feijão-caupi, especialmente quando associado ao uso de rizóbios com microrganismos promotores de crescimento vegetal. Entre os anos de 2020 e 2021, observa-se o pico de publicações, com três registros por anos, enquanto os anos de 2023 e 2024 apresentaram uma redução moderada, com duas publicações cada. Esses dados refletem um aumento progressivo no interesse científico pelo tema, principalmente em contextos edafoclimáticos adversos.

A maior concentração de publicações na última década está alinhada com o avanço das pesquisas voltadas à sustentabilidade agrícola, à redução do uso de fertilizantes nitrogenados e à valorização de recursos microbiológicos nativos. Além disso, esse crescimento está fortemente associado à busca por alternativas que melhorem a eficiência biológica da fixação de nitrogênio e promovam maior resiliência das culturas frente aos estresses climáticos. O Brasil se encontra em primeiro lugar na produção desses estudos com o desenvolvimento de

54% dos trabalhos sobre uso de consórcios microbianos em feijão-caupi. A partir disso, é possível verificar a importância da cultura do feijão-caupi no Brasil e a busca por alternativas sustentáveis por meio do uso de bioinsumo, apesar das poucas publicações, têm-se um interesse nacional pelo assunto.

Figura 2 - Distribuição temporal das publicações sobre o uso de inoculante simples e consórcios microbianos em feijão-caupi obtidos no site *Web of Science*.



Fonte: Dados da pesquisa. Análise de trabalhos publicados associados a inoculação e coinoculação em feijão-caupi usando a base de dados *Web of Science*. As barras verticais indicam a quantidade de estudos encontrados na pesquisa no ano em questão. **(a)** Total de 206 trabalhos encontrados com inoculação de rizóbios; **(b)** Total de 13 estudos encontrados com coinoculação em feijão-caupi.

### 3. HIPÓTESES

1. É possível selecionar estirpes de rizóbio com alto desempenho simbiótico com feijão-caupi, capazes de promover maior acúmulo de biomassa e nitrogênio da parte aérea em comparação com plantas não inoculadas;
2. Consórcios bacterianos formados por rizóbio e actinobactérias e rizóbio e *Bacillus* spp. são eficazes em promover o crescimento e desenvolvimento do feijão-caupi, em relação às estirpes aplicadas isoladamente;
3. As estirpes selecionadas de rizóbios, actinobactérias e bactérias do gênero *Bacillus* expressam características funcionais associadas à promoção do crescimento vegetal, como a produção de sideróforos, biossurfactantes, solubilização e mineralização de fósforo e síntese de fitohormônios.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

Selecionar estirpes de rizóbios, actinobactérias e bactérias do gênero *Bacillus* com potencial para a formulação de um consórcio bacteriano com características promotoras de crescimento vegetal, incluindo fixação biológica de nitrogênio, produção de fitohormônios, solubilização e mineralização de fósforo, além da síntese de biossurfactantes e sideróforos, visando o desenvolvimento de um bioinsumo para a cultura do feijão-caupi.

### 4.2 Objetivos Específicos

1. Selecionar estirpes de rizório com alto desempenho simbiótico com feijão-caupi;
2. Caracterizar por meio do sequenciamento do genoma as estirpes de rizório selecionadas;
3. Selecionar consórcios bacterianos (rizório e actinobactérias) para inoculação no feijão-caupi;
4. Selecionar consórcios bacterianos (rizório e *Bacillus* spp.) para inoculação no feijão-caupi;
5. Caracterizar *in vitro* as estirpes selecionadas de rizório, actinobactéria e *Bacillus* spp. quanto às propriedades relacionadas à promoção do crescimento de plantas.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Procedência dos isolados

Os 58 isolados de rizóbios e os 21 de actinobactérias foram obtidos a partir de amostras de solo coletadas em diferentes unidades de agricultura familiar, conservação, preservação e secundárias no estado do Ceará pelo projeto de pesquisa do CNPq da Chamada CNPq/ICMBio/FAPs nº18/2017. Foram isolados e caracterizados em trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Microbiologia Ambiental da Universidade Federal do Ceará (UFC) e atualmente compõem a coleção de trabalho do Laboratório de Solos (Microbiologia do Solo), do Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Tropical (CNPAT).

As estirpes pertencentes ao gênero *Bacillus* que foram utilizadas estão depositadas em coleções de microrganismos promotores de crescimento e agentes de controle biológico da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). Foram utilizados seis isolados do gênero *Bacillus*, originalmente obtidas em trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Patologia Pós-Colheita (LPPC) e que atualmente compõem a coleção de trabalho do Laboratório de Solos (Microbiologia do Solo) e um isolado que está depositado no Centro de Recursos Biológicos - Johanna Döbereiner (CRB-JD) do Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (CNPAB). Os isolados de *Bacillus* spp. foram selecionados em experimentos prévios, conduzidos entre os anos de 2022 e 2024 no CNPAT, no âmbito do desenvolvimento do projeto *Microrganismos multifuncionais: Uma alternativa biológica para a produção sustentável de bananeiras*, financiado pela Embrapa (SEG: 20.20.03.041.00.00).

### 5.2 Ativação das estirpes

Os rizóbios foram ativados em placas de Petri com meio de cultura *Yeast Manitol Agar* (YMA) preparado de acordo com a Tabela 1. Para uso de um indicador de reação de pH, foi feito uma solução de azul de bromotímol (Tabela 2), sendo adicionado 5 mL da solução por litro do meio de cultura.

Tabela 1 – Composição do meio de cultura YMA.

Componente	Quantidade
Manitol	10 g
Extrato de levedura	0,4 g
Solução de Fosfato de potássio dibásico ( $K_2HPO_4$ ) a 10% p/v	1 mL

Solução de Fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) a 10% p/v	4 mL
Solução de Sulfato de magnésio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) a 10% p/v	2 mL
Solução de Cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ) a 10% p/v	1 mL
Ágar	15 g
Água deionizada	1000 mL
pH 6,8-7,0	

Fonte: Vincent (1970).

Tabela 2 – Preparo da solução de Azul de Bromotimol a 0,5% p/v.

Componente	Quantidade
Solução de Hidróxido de potássio ( $\text{KOH}$ ) a 0,2 N	900 mL
Azul de bromotimol	5,0 g
Água deionizada	Completar até 1000mL

Fonte: Baldani *et al.* (1999).

As actinobactérias foram ativadas em placas de Petri com meio de cultura *Casein Dextrose Agar* (CDA) (Tabela 3) e para as bactérias do gênero *Bacillus* foi utilizado o meio de cultura KADO (Tabela 4).

Tabela 3 – Composição do meio de cultura CDA acrescido de nistatina.

Componente	Quantidade
Solução de $\text{K}_2\text{HPO}_4$ a 10% p/v	5 mL
Solução de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 10% p/v	2 mL
Glicose	2,0 g
Sulfato Ferroso Heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0,01 g
Caseína (Dissolvida previamente em 10 ml de $\text{NaOH}$ 0,1 M)	0,2 g
Ágar	15 g
Água deionizada	1000 mL
Nistatina (Adicionada após autoclavagem)	2,5 mL
pH 6,6	

Fonte: Adaptado de Kuster; Williams (1964).

Tabela 4 – Composição do meio de cultura KADO.

Componente	Quantidade
Sacarose	10 g
Extrato de levedura	4,0 g
Caseína hidrolisada	8,0 g
Solução de MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O a 10% p/v	3 mL
Solução de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> a 10% p/v	20 mL
Ágar	18 g
Água deionizada	1000 mL

Fonte: Kado; Heskett (1970).

### 5.3 Screening dos rizóbios em casa de vegetação quanto a eficiência simbiótica

Incialmente foi realizado um *screening* com as 58 estirpes de rizóbios em condições não estéreis em casa de vegetação no CNPAT (Figura 3 – b) para avaliar o desempenho simbiótico com feijão-caupi. Foram realizados dois *screening*, sendo o primeiro com dois cultivos sucessivos e o segundo utilizando as dez estirpes selecionadas, a partir dos resultados obtidos no primeiro ensaio, em dois solos distintos. Os experimentos foram conduzidos em vasos com volume de 1 dm<sup>3</sup> sendo adicionado 1,5 kg de solo por vaso. O solo foi analisado quimicamente conforme o Manual de Métodos de Análise de Solos da Embrapa (TEIXEIRA *et al.* 2017) e foi descrito quanto aos teores de nutrientes e atributos químicos (pH: 5,8, M.O.: 3,0 g kg<sup>-1</sup>; K<sup>+</sup>: 0,4; Ca<sup>2+</sup>: 11; Mg<sup>2+</sup>: 6; Na<sup>+</sup>: 1; Al<sup>3+</sup>: 0; H<sup>+</sup>+Al<sup>3+</sup>: 11; SB: 19; CTC: 29 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; V: 64%; m: 0%, Zn: 0,3; Cu: 0,3; Fe: 2,4 e Mn: 5,8 mg dm<sup>-3</sup>). O primeiro experimento foi conduzido com 60 tratamentos: 58 tratamentos relativos à aplicação de cada estirpe como inóculo, um tratamento controle (Control), sem adição de fertilizante nitrogenado ou inóculo e um tratamento nitrogenado (N-mineral), com adição de fertilizante com nitrogênio mineral, a ureia. Todos os tratamentos foram adubados com fertilizante fosfatado, potássio e micronutrientes, de acordo com a Tabela 5.

Tabela 5 - Adubação dos tratamentos relativos ao primeiro experimento.

Fertilizante	Dose (kg ha <sup>-1</sup> )	Forma de Aplicação
Superfosfato Simples	60 (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	Aplicação total no plantio
Cloreto de Potássio	30 (K <sub>2</sub> O)	Aplicação parcelada: 50% no plantio e 50% aos 10 dias após a semeadura (10 DAS)
FTE BR12	25	Aplicação total no plantio
Ureia (Tratamento nitrogenado)	50 (N)	Aplicação parcelada: 50% no plantio e 50% aos 10 DAS

Fonte: Dados da pesquisa.

O segundo *screening* foi realizado utilizando os dez rizóbios que promoveram incremento de massa seca de parte aérea, considerando os dois cultivos (Figura 3 – a). Nesse experimento foi utilizado dois solos, um oriundo do campo experimental do CNPAT em Pacajus, Ceará, e o segundo coletado no campo experimental da UFC em Fortaleza, Ceará, para avaliação quanto a adaptabilidade, a competitividade e a eficiência simbiótica em feijão-caupi. Os dois solos foram submetidos à análise química de acordo com o Manual de Métodos de Análise de Solos da Embrapa (TEIXEIRA *et al.* 2017). Os teores de micronutrientes, fósforo, matéria orgânica, pH, acidez, bases trocáveis e CTC estão descritos nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6 - Teores de micronutrientes, fósforo, matéria orgânica e pH em amostras de solo coletadas do CNPAT em Pacajus, Ceará e na UFC em Fortaleza, Ceará.

Identificação	Zn	Cu	Fe (mg/dm <sup>3</sup> )	Mn	P	MO (g/kg)	pH H <sub>2</sub> O
<hr/>							
Solo - CNPAT	3,0	0,5	0,9	10,2	12	6	5,7
Solo - UFC	13,7	1,5	26,1	16	52,3	8,2	6,9

Fonte: Dados da pesquisa. Zn: zinco; Cu: cobre; Fe: ferro; Mn: manganês; P: fósforo; MO: matéria orgânica.

Tabela 7 - Atributos químicos do solo referentes à acidez, bases trocáveis e capacidade de troca catiônica (CTC) nas amostras de solo do CNPAT e da UFC.

Identificação	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Na <sup>+</sup>	H+Al	Al <sup>3+</sup>	SB	CTC	V	m
	<hr/> mmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> <hr/>						<hr/> --%--		<hr/> --%--	
Solo - CNPAT	0,8	16	8	0	8	0	25	33	75	0
Solo - UFC	0,9	27	9	0,4	8	0	37	45	82	0

Fonte: Dados da pesquisa. K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>: cátions trocáveis; H+Al e Al<sup>3+</sup>: acidez potencial e alumínio trocável; SB: soma de bases; CTC: capacidade de troca catiônica; V: saturação por bases; m: saturação por alumínio.

O experimento foi conduzido com 12 tratamentos: dez referentes as estirpes selecionadas, dois tratamentos controle, o absoluto sem aplicação de nitrogênio mineral ou inoculação (Control) e o fertilizado com nitrogênio mineral (N-mineral). A adubação dos vasos foi aplicada de acordo com a Tabela 8.

Tabela 8 - Adubação dos tratamentos relativos ao segundo experimento.

Fertilizante	Dose (kg ha <sup>-1</sup> )	Forma de Aplicação
Superfosfato simples	80 (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	Aplicação total no plantio
Cloreto de potássio	50 (K <sub>2</sub> O)	Aplicação parcelada: 50% no plantio e 50% aos 10 DAS
FTE BR12	35	Aplicação total no plantio
Ureia (Tratamento nitrogenado)	60 (N)	Aplicação parcelada: 50% na semeadura e 50% aos 10 DAS

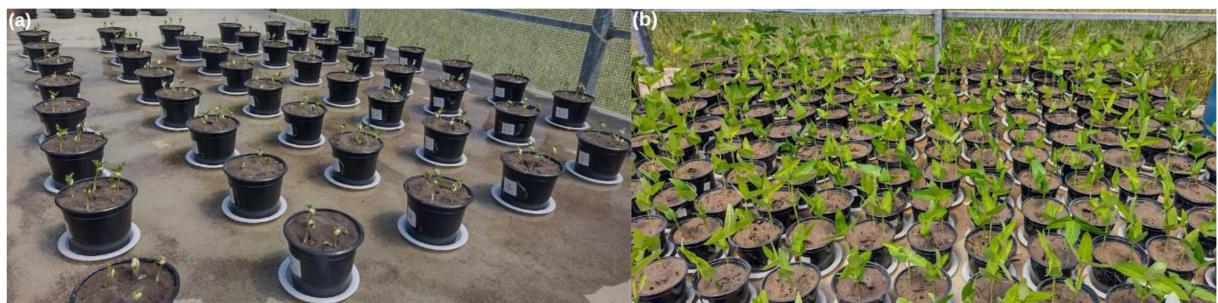
Fonte: Dados da pesquisa.

O cultivar utilizado nos experimentos foi a BRS Tumucumaque, sendo realizado o plantio de três sementes por vaso no primeiro experimento e cinco sementes por vaso no segundo experimento. O desbaste das plantas foi realizado em ambos experimentos, com sete DAS, permanecendo apenas duas plantas por vaso. Para o preparo do inóculo do primeiro ensaio, os rizóbios ativados em placas de Petri foram cultivados em tubos de ensaio contendo 5 mL do meio YM sob agitação orbital a 150 rpm, a 25°C por sete dias. Após o cultivo, os rizóbios foram inoculados nos vasos utilizando 1 mL de inóculo, por semente no momento do plantio.

No segundo ensaio, foi realizado um pré-inóculo com cultivo das estirpes selecionadas em tubos de ensaio com 5 mL do meio YM, sob agitação orbital a 150 rpm por sete dias em 25°C. Posteriormente, 1 mL do pré-inóculo foi adicionado ao inóculo, composto por 40 mL de meio YM em erlenmeyers, o qual foi submetido as mesmas condições de crescimento descrita anteriormente. Após o cultivo, os inóculos foram centrifugados a 6.000 rpm por 5 min, foi feito o descarte do sobrenadante e realizado a suspensão bacteriana com a adição de 20 mL de água deionizada. A partir disso, foi adicionado 1 mL da suspensão bacteriana por semente no momento do plantio.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso, com quatro repetições. As coletas foram realizadas aos 40 DAS, antes do início do florescimento. No primeiro experimento, avaliou-se a massa seca da parte aérea (g por vaso), enquanto no segundo experimento, além da massa seca da parte aérea, foram analisados a massa seca de nódulos (g por planta) e o acúmulo de nitrogênio na parte aérea (mg por planta), após a secagem em estufa de circulação forçada de ar à 65 °C. O teor de nitrogênio foi determinado pelo método Kjeldhal, após moagem em moinho tipo willey.

Figura 3 - Visão geral dos experimentos realizados em casa de vegetação do CNPAT para seleção dos rizóbios em feijão-caupi.



Fonte: Dados da pesquisa. (a) Disposição dos 48 vasos utilizados para cultivo em diferentes solos dos 10 rizóbios selecionados em feijão-caupi. (b) Disposição dos 180 vasos utilizados para cultivo sucessivo com inoculação dos 58 rizóbios em feijão-caupi.

#### 5.4 Caracterização molecular dos rizóbios selecionados

O DNA total das estirpes de rizóbios selecionadas foi extraído com o kit Wizard® Genomic DNA (Promega, Madison, WI, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. A concentração e a qualidade do DNA obtido foram analisadas por espectrofotômetro (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). O sequenciamento completo do genoma foi realizado por meio da contratação de prestação de serviços de terceiros, empresa Novogene (Novogene Corporation Inc., Sacramento, CA, EUA). O procedimento realizado foi iniciado com a preparação da amostra e a construção da biblioteca de DNA, cuja qualidade e rendimento foram verificados. O DNA genômico foi fragmentado, os fragmentos selecionados passaram por polimento nas extremidades (adição da cauda A e ligação a adaptadores de comprimento total), posteriormente foi feito o sequenciamento utilizando a plataforma de sequenciamento de última geração (NGS), Novaseq X Plus PE 150 (*Illumina*). Foram montados com o programa *Newbler* (v3.0.0) e os resultados avaliados com o programa *Busco* (v. 6, tab Y). As montagens draft dos genomas foram anotados funcionalmente com o pipeline PGAP (*Prokaryotic Genome Annotation Pipeline*, v2025-05-06.build7983, tab Z). O ANI (Average Nucleotide Identity) foi calculado em relação a seis *Bradyrhizobium* spp. e uma *Microvirga vignae* com o programa *ANIClustermap* (v1.3.0, tab W).

## 5.5 Experimentos de coinoculação em feijão-caupi

### 5.5.1 Rizóbio e actinobactérias

Para avaliação do efeito da coinoculação entre rizóbio e actinobactéria em feijão-caupi, uma estirpe de rizóbio foi selecionada com base nos ensaios descritos anteriormente, para coinoculação com as 21 estirpes de actinobactérias. O experimento foi realizado em casa de vegetação no CNPAT (Figura 4) em vasos com capacidade de 2 dm<sup>3</sup> de solo. O experimento foi conduzido com 21 tratamentos com coinoculação, um tratamento com inoculação apenas com rizóbio selecionado e dois tratamentos controle: sem inoculação ou adubação nitrogenada (Control) e com adubação nitrogenada (N-mineral). Foi utilizado o cultivar BRS Tumucumaque e as sementes foram desinfestadas superficialmente com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (10%, 3V) por 3 min, cinco sementes foram semeadas por vaso. Quatro dias após o plantio foi realizado o desbaste, mantendo duas plantas por vaso. A adubação dos vasos e a aplicação do nitrogênio mineral no tratamento controle nitrogenado está descrito na Tabela 9.

Tabela 9 - Adubação dos tratamentos relativos aos experimentos de coinoculação.

Fertilizante	Dose (kg ha <sup>-1</sup> )	Forma de Aplicação
Superfosfato simples	80 (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	Aplicação total no plantio.
Cloreto de potássio	50 (K <sub>2</sub> O)	Aplicação parcelada: 50% no plantio e 50% aos 7 DAS.
FTE BR12	35	Aplicação total no plantio.
Ureia (Tratamento nitrogenado)	80 (N)	Aplicação parcelada: 50% na semeadura e 50% aos 10 DAS.

Fonte: Dados da pesquisa.

Para preparo do inóculo, as bactérias foram ativadas em placas de Petri com os meios YMA e CDA, incubadas a 28 °C em BOD por sete dias, posteriormente, foram cultivadas em tubos com 5 mL de meio de cultura líquido (pré-inóculo), a 28 °C sob agitação orbital a 150 rpm e depois em frascos contendo 40 mL dos meios de cultura líquidos (inóculo). Após o crescimento, o inóculo foi centrifugado a 6.000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi descartado e feito a suspensão das células bacterianas com 20 mL de água deionizada estéril, posteriormente, foi feito agitação em vórtice a 3.000 rpm por 30 s para aplicação nos vasos. As bactérias foram inoculadas nas sementes utilizando 1 mL do inóculo por semente. A coleta foi realizada aos 40 DAS e foram avaliados a massa seca da parte aérea, de raízes e de nódulos (g por planta).

### 5.5.2 Rizóbio e bactérias do gênero *Bacillus*.

A coinoculação entre rizóbio e *Bacillus* spp. foi realizada com uma estirpe de rizóbio, selecionada nos experimentos anteriores, e sete estirpes de bactérias do gênero *Bacillus*. O experimento foi conduzido em casa de vegetação no CNPAT (Figura 4) em vasos com capacidade de 2 dm<sup>-3</sup> de solo. O cultivar utilizado foi a BRS Tumucumaque, sendo desinfestado superficialmente com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 10%, 3V por 3 min, posteriormente, foi semeado cinco sementes nos vasos. Após quatro DAS, foi realizado o desbaste das plantas para continuidade do experimento apenas com duas plantas por vaso. A adubação foi conduzida de acordo com a Tabela 9. Foram realizados sete tratamentos com coinoculação, um tratamento com inoculação apenas do rizóbio selecionado e dois tratamentos controle sem inoculação ou adubação nitrogenada (Control) e com adubação nitrogenada (N-mineral). As bactérias foram cultivadas como descrito no item 5.5.1, porém, para o cultivo dos *Bacillus* spp. foi utilizado o meio de cultura KADO com tempo de crescimento de 1 dia. Para o preparo do pré-inóculo e inóculo, foram utilizados os mesmos volumes, sendo preparado meio de cultura KADO líquido. As bactérias foram inoculadas nas sementes utilizando 1 mL do inóculo por semente. A coleta foi realizada aos 40 DAS e foi avaliado os parâmetros de massa seca da parte aérea, de raízes e de nódulos (g por planta).

Figura 4 - Disposição geral dos vasos para experimentos de coinoculação de rizóbio com actinobactérias e com *Bacillus* spp. em feijão-caupi na casa de vegetação do CNPAT.



Fonte: Dados da pesquisa.

## 5.6 Caracterização das propriedades de promoção de crescimento vegetal *in vitro* para uso em bioinsumos

Foram selecionadas três estirpes de rizóbios, quatro estirpes de actinobactéria e quatro estirpes de *Bacillus* spp a partir dos experimentos realizados em casa de vegetação. Os isolados foram ativados em placas de Petri com meio YMA, CDA e KADO para rizóbios, actinobactérias e *Bacillus* spp., respectivamente. Foram cultivadas por 1 dia para bactérias do gênero *Bacillus* e sete dias para as demais estirpes, a 28 °C com agitação orbital de 150 rpm, posteriormente, foram centrifugadas a 6.000 rpm por 10 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células bacterianas foram suspensas de forma semelhante à inoculação em casa de vegetação, com intuito de avaliar o desempenho como promotoras de crescimento vegetal. Todos os testes foram realizados com três triplicatas.

### 5.6.1 Capacidade de fixação de nitrogênio em meio semissólido livre de nitrogênio

Para verificar a capacidade de fixação de nitrogênio, as estirpes foram inoculadas com 100 µL de suspensão bacteriana em frascos contendo 6 mL dos meios semissólidos livres de N: LGI (Tabela 10), JMV (Tabela 11), JNFb (Tabela 12) e NFb (Tabela 13). Após a inoculação, as estirpes foram incubadas a 28 °C por cinco dias e diariamente foram avaliadas para verificar a formação de uma película aerotáxica esbranquiçada, típica dos fixadores de nitrogênio de vida livre.

Tabela 10 - Composição do meio de cultura LGI semissólido.

Componente	Quantidade
Sacarose	5,0 g
Solução de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> a 10% p/v	2 mL
Solução de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> a 10% p/v	6 mL
Solução de MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O a 10% p/v	2 mL
Solução de Cloreto de Cálcio Dihidratado (CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O) a 10% p/v	2 mL
Solução de Molibdato de Sódio Dihidratado (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O) a 0,1% p/v	2 mL
Solução de Sulfato de Manganês Monohidratado (MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O) a 0,01% p/v	1 mL
Solução de FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O (Cloreto férreo hexahidratado) a 1% p/v	1 mL
Solução de Azul de Bromotimol a 0,5% p/v	5 mL
Solução de Vitamina para Meio de Cultura <sup>1</sup>	1 mL
Nitrato de Potássio (KNO <sub>3</sub> )	1,0 g
Ágar	1,8 g
Água deionizada	1000 mL

---

pH 6,0 – 6,2

Fonte: Döbereiner; Andrade; Baldani (1999). <sup>1</sup>Preparo da Solução de Vitamina para Meio de Cultura (500 ml): biotina (100 mg) e piridoxol-HCl (200 mg).

Tabela 11 - Composição do meio de cultura JMV semissólido.

Componente	Quantidade
Manitol	5,0 g
Solução de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> a 10% p/v	6 mL
Solução de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> a 10% p/v	18 mL
Solução de MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O a 10% p/v	2 mL
Solução de NaCl a 10% p/v	1 mL
Solução de CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O a 10% p/v	2 mL
Solução de Azul de Bromotimol a 0,5% p/v	5 mL
Solução de Micronutrientes para Meio de Cultura <sup>1</sup>	2 mL
Solução de Ferro-EDTA (C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> NaFeO <sub>8</sub> )	4 mL
Solução de Vitamina para Meio de Cultura	1 mL
Ágar	2,1 g
Água deionizada	1000 mL

pH 4,2 – 4,5

Fonte: Döbereiner; Andrade; Baldani (1999). <sup>1</sup>Preparo da Solução de Micronutrientes para Meio de Cultura: CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (0,04 g), ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (1,2 g), H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (1,4 g), Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (1,0 g) e MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (1,175 g).

Tabela 12 - Composição do meio de cultura JNFB semissólido.

Componente	Quantidade
Ácido málico	5,0 g
Solução de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> a 10% p/v	6 mL
Solução de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> a 10% p/v	18 mL
Solução de MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O a 10% p/v	2 mL
Solução de NaCl a 10% p/v	1 mL
Solução de CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O a 10% p/v	2 mL
Solução de Azul de Bromotimol a 0,5% p/v	2 mL
Solução de Micronutrientes para Meio de Cultura	2 mL
Solução de Ferro-EDTA	4 mL
Solução de Vitamina para Meio de Cultura	1 mL
Hidróxido de Potássio (KOH)	4,5 g
Ágar	1,9 g
Água deionizada	1000 mL

pH 5,8

Fonte: Baldani *et al.* (2000).

Tabela 13 - Composição do meio de cultura NFB semissólido.

Componente	Quantidade
Ácido málico	5,0 g
Solução de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> a 10% p/v	5 mL
Solução de MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O a 10% p/v	2 mL
Solução de NaCl a 10% p/v	1 mL
Solução de CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O a 10% p/v	2 mL
Solução de Azul de Bromotimol a 0,5% p/v	2 mL
Solução de Micronutrientes para Meio de Cultura	2 mL
Solução de Ferro-EDTA	4 mL
Solução de Vitamina para Meio de Cultura	1 mL
Hidróxido de Potássio (KOH)	4,5 g
Ágar	1,8 g
Água deionizada	1000 mL
pH 6,5	

Fonte: Döbereiner; Andrade; Baldani (1999).

### 5.6.2 Produção de ácido indolacético (AIA)

A avaliação realizada para avaliar a produção de auxinas foi conduzida baseada nos trabalhos de Prado *et al.* (2019) e Galdiano Júnior *et al.* (2011), com adaptações. Foi feito a adição de 500 µL da suspensão bacteriana em 5 mL no meio caldo DYGS (Tabela 14) acrescido de 100 µM L-triptofano e incubadas a 30 °C por 1 e 7 dias em agitação orbital de 150 rpm, posteriormente, foram centrifugadas a 6.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi misturado com o reagente de Salkowski (Tabela 15) na proporção de 1:2 (LEBRAZI *et al.*, 2020) para os rizóbios e na proporção de 3:1 para as bactérias do gênero *Bacillus* e actinobactérias, o reagente foi preparado no dia e protegido da luz, após a mistura, os tubos foram incubados no escuro por 20 min, depois foi realizado a medição da absorbância da solução por meio de um espectrofotômetro KASVI a 535 nm. A quantificação da produção de AIA foi calculada a partir da curva padrão construída utilizando soluções de AIA com concentrações variando entre 0 e 100 µg ml<sup>-1</sup>. R<sup>2</sup>: 0,99447 e R<sup>2</sup>: 0,99013.

Tabela 14 – Composição do meio de cultura DYGS.

Componente	Quantidade
Glicose	2,0 g
Ácido málico	2,0 g
Peptona bacteriológica	1,5 g
Extrato de levedura	2,0 g
Solução de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> a 10% p/v	5 mL
Solução de MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O a 10% p/v	5 mL

Ácido glutâmico	1,5 g
Ágar	15 g
Água deionizada	1000 mL
pH 6,8	

Fonte: Rodrigues Neto *et al.* (1986).

Tabela 15 – Preparo do reagente de Salkowski.

Componente	Quantidade
Solução de Cloreto Férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) 0,5 M	1 mL
Solução de Ácido Perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) a 35%	50 mL

Fonte: Sarwar e Kremer (1995).

### 5.6.3 Competência para solubilização e mineralização de fosfato

A capacidade de solubilizar e mineralizar fósforo (P) foi avaliada de forma qualitativa, com uso do meio de cultura ágar PVK (Tabela 16). Para análise foram utilizados uma fonte de fósforo inorgânica: fosfato de cálcio e uma fonte de fósforo orgânica: lecitina de soja. As estirpes foram inoculadas em placas de Petri, com 20  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana, incubadas por 15 dias a 28°C e foi avaliado a formação de um halo diariamente, referente as zonas de solubilização e mineralização, e os diâmetros das colônias bacterianas e dos halos formados foram calculados utilizando um paquímetro analógico universal (Série 530, modelo 200 mm/8", Mitutoyo). A partir disso, foi feito o cálculo com a razão entre o diâmetro da zona de solubilização/mineralização e o diâmetro da colônia, fornecendo o índice de solubilização (IS) e o índice de mineralização (IM), sendo possível avaliar a eficiência de cada estirpe como baixa (IS, IM < 2,0), média ( $2,0 \leq IS, IM < 3,0$ ) e alta ( $IS, IM \geq 3,0$ ), conforme Matos *et al.* (2017).

Tabela 16 – Composição do meio de cultura PVK com fonte de fósforo inorgânico e orgânico.

Componente	Quantidade
Glicose	10 g
Extrato de levedura	0,5 g
Fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) / Lecitina de soja	5 g / 15 g
Sulfato de amônio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )	0,5 g
Cloreto de potássio (KCl)	0,2 g
Solução de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 10% p/v	1 mL
Solução de NaCl a 10% p/v	2 mL
Solução de Sulfato de Manganês Monohidratado ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) a 0,01% p/v	1 mL
Solução de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 0,01% p/v	1 mL
Ágar	15 g
Água deionizada	1000 mL

Fonte: Adaptado de Pikovaskya (1948).

Adicionalmente, as estirpes que foram positivas para os testes de solubilização e mineralização de P em placa de Petri com meio de cultura ágar PVK suplementado com fosfato de cálcio e lecitina de soja foram analisadas quanto a liberação de P solúvel em meio caldo PVK por meio da reação com reagente colorimétrico, adaptado de Oliveira *et al.* (2009). Os isolados foram cultivados em meio caldo PVK para visualização da reação colorimétrica do reagente e o fósforo solúvel. As estirpes foram incubadas a 28 °C sob agitação constante a 200 rpm por 1 e 7 dias, posteriormente, centrifugadas a 6.000 rpm por 15 min e o sobrenadante passou por filtração com papel de filtro quantitativo azul (Ref. 42, retenção nominal de 2 µm, Ø 125 mm; Química Moderna, Brasil) para remoção dos exsudados mais complexos de polissacarídeos. O método colorimétrico utilizado foi do ácido ascórbico de Murphy e Riley (1962), o reagente de coloração foi preparado no dia da análise com as soluções presentes na Tabela 17 nos volumes de 125 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5N) com 37,5 mL de molibdato de amônio (4% p/v), depois foi adicionado 75 mL de ácido ascórbico (0,1 M) e 12,5 mL de tartarato de antimônio e potássio. O sobrenadante filtrado e o reagente colorimétrico foram homogeneizados na proporção de 4:1 e depois incubados no escuro por 30 minutos. Ao final, foi possível visualizar a reação colorimétrica das estirpes com reagente resultando em um azul escuro e comparar com tubo de ensaio com reagente colorimétrico controle para classificação positiva ou negativa para liberação do P solúvel.

Tabela 17 - Soluções para o preparo do reagente colorimétrico do ácido ascórbico.

Solução	Reagente	Volume final
Ácido sulfúrico (5 N)	70 mL de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentrado	500 mL com água deionizada
Molibdato de amônio (4% p/v)	20 g de (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	500 mL de água deionizada
Ácido ascórbico (0,1 M)	1,32 g de ácido ascórbico	75 mL de água deionizada.
Tartarato de antimônio e potássio (1 mg Sb/mL)	0,2743 g de tartarato antimônio e potássio	Obs.: Adicionar 25 mg de EDTA e 0,5 ml de ácido fórmico para estabilizar. Com volume final em 100 ml de água deionizada.

Fonte: Murphy; Riley (1962)

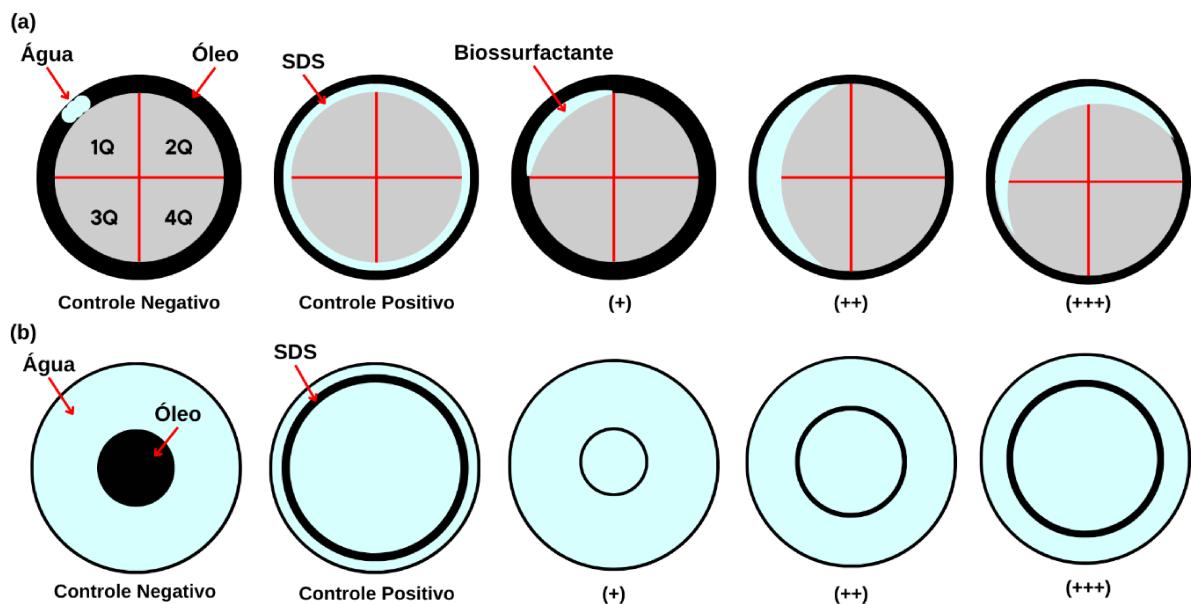
#### **5.6.4 Produção de biossurfactantes**

Para avaliar a produção de biossurfactantes, foram conduzidos dois testes qualitativos e um quantitativo de acordo com Oliveira *et al.* (2021). Os isolados foram cultivados em meio caldo nutritivo (Tabela 18) com 1% (v/v) de azeite de oliva comercial a 30 °C por 1 e 7 dias, posteriormente, foram avaliados por três testes: Teste de colapso de gotas, dispersão de óleo e emulsificação para identificar os isolados capazes de realizar essa produção de biossurfactantes. O primeiro teste foi realizado em placas de 96 poços com a adição de 10 µL de óleo lubrificante queimado em cada poço, após essa etapa, foram incubados por 24 h a 25°C, em seguida, 10 µL da cultura bacteriana foram adicionadas à superfície do óleo.

Para o teste de dispersão em óleo, foi utilizado placas de Petri com 35 ml de água deionizada estéril e 100 µL de óleo lubrificante queimado, o qual foi adicionado à superfície da água, logo em seguida, foi realizado a inoculação de 10 µL da cultura bacteriana ao centro da placa. Os dois testes apresentam dois controles, o controle positivo com uma solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 1% e o negativo com água deionizada. Os resultados foram avaliados como positivo quando ocorreu o espalhamento total ou parcial da gota e classificado de acordo com a atividade do biossurfactante em fraco, moderado e forte, e os resultados foram considerados negativos para gotas que não sofreram nenhuma alteração, como demonstrado na Figura 5.

O teste de emulsificação foi avaliado com a adição de 2 ml de querosene comercial em um tubo de ensaio contendo 2 mL de cultura bacteriana, seguido de agitação em vortex a 3.000 rpm por 2 min. Posteriormente, os tubos foram incubados e realizado medições com 24, 48 e 72 h a 25°C. O índice de emulsificação foi calculado pela razão entre a altura da coluna de emulsão (ACE) após o primeiro tempo, 24h, e a altura total da coluna (ATC). A estabilidade foi determinada seguindo o mesmo cálculo, considerando a ACE após 48h e 72h, verificando a durabilidade da coluna de emulsão. Todos os testes foram conduzidos em triplicatas para cada estirpe.

Figura 5 - Representação esquemática dos testes qualitativos utilizados para avaliar a capacidade de produção de biossurfactantes pelas estirpes selecionadas.



Fonte: Adaptado de Oliveira *et al.* (2021). (a) Teste do colapso da gota, em que 1Q, 2Q, 3Q e 4Q correspondem aos primeiro, segundo, terceiro e quarto quadrantes da placa; (b) Teste de dispersão em óleo.

Tabela 18 – Composição do caldo nutriente.

Componente	Quantidade
Extrato de carne	1,0 g
Extrato de levedura	2,0 g
Peptona bacteriológica	5,0 g
NaCl	5,0 g
Água deionizada	1000 mL
pH 6,8 ± 0,2	

Fonte: Oliveira *et al.* (2021).

### 5.6.5 Avaliação da síntese de sideróforos

A produção de sideróforos pelas estirpes foi avaliada conforme metodologia descrita por Vasques *et al.* (2024). As bactérias foram cultivas em placas de Petri contendo meio de cultura ágar King B diluído (Tabela 19), suplementado com corante cromoazurol S (CAS). O corante foi previamente esterilizado por filtração utilizando uma membrana com poros de 0,2 µm e adicionado ao meio após autoclavagem e resfriamento até aproximadamente 50°C. O corante CAS foi preparado com a adição do seguinte volume das soluções: 30 mL da solução 3; 7,5 mL da solução 1; 37,5 mL da solução 2 e 25 mL da solução 4 (Tabela 20). Após a inoculação de 10 µL da suspensão bacteriana das estirpes, as placas foram incubadas por 5 dias

no escuro para bactérias de crescimento rápido e 15 dias para bactérias de crescimento lento a 28 °C. O resultado positivo foi confirmado com a formação de um halo laranja ou rosa e calculado o Índice de Produção de Sideróforos (IPS) (TIMOFEEVA; GALYAMOVA; SEDYKH, 2022) com a razão entre o diâmetro da zona de produção de sideróforo e o diâmetro da colônia obtidos por meio de um paquímetro (Série 530, modelo 200 mm/8", Mitutoyo).

Tabela 19 - Composição do meio de cultura King B diluído.

Componente	Quantidade
Glicose	3,0 g
Peptona bacteriológica	4,0 g
Solução de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> a 10% p/v	2,3 mL
Solução de MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O a 10% p/v	3 mL
Ágar	15 g
Água deionizada	1000 mL
pH 6,8	

Fonte: Adaptado de Vasques *et al.* (2024).

Tabela 20 - Preparo das soluções para formação do corante cromoazurol S (CAS).

Solução	Componente	Quantidade	Volume Final
Solução 1	Solução de FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O a 1% p/v	1,35 mL	50 mL
	HCl (0,1 M)	4,1 mL	
	Água deionizada	—	
Solução 2	CAS (Cromoazurol S)	121 mg	100 mL
	Água deionizada	—	
Solução 3	HDTMA (Brometo de hexadeciltrimetilâmônio)	364,45 mg	50 mL
	Água deionizada	—	
Solução 4 (pH: 5,6)	Piperazina anidra	4,307 g	100 mL
	HCl (12 M)	6,25 mL	
	Água deionizada	—	

Fonte: Adaptado de Vasques *et al.* (2024).

## 5.7 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio dos softwares Sisvar (FERREIRA, 2014) e R (R CORE TEAM, 2015), versão 4.2.3. Os gráficos foram montados no GraphPad Prism versão 10.2.2 para Windows, GraphPad Software, San Diego, Califórnia EUA.

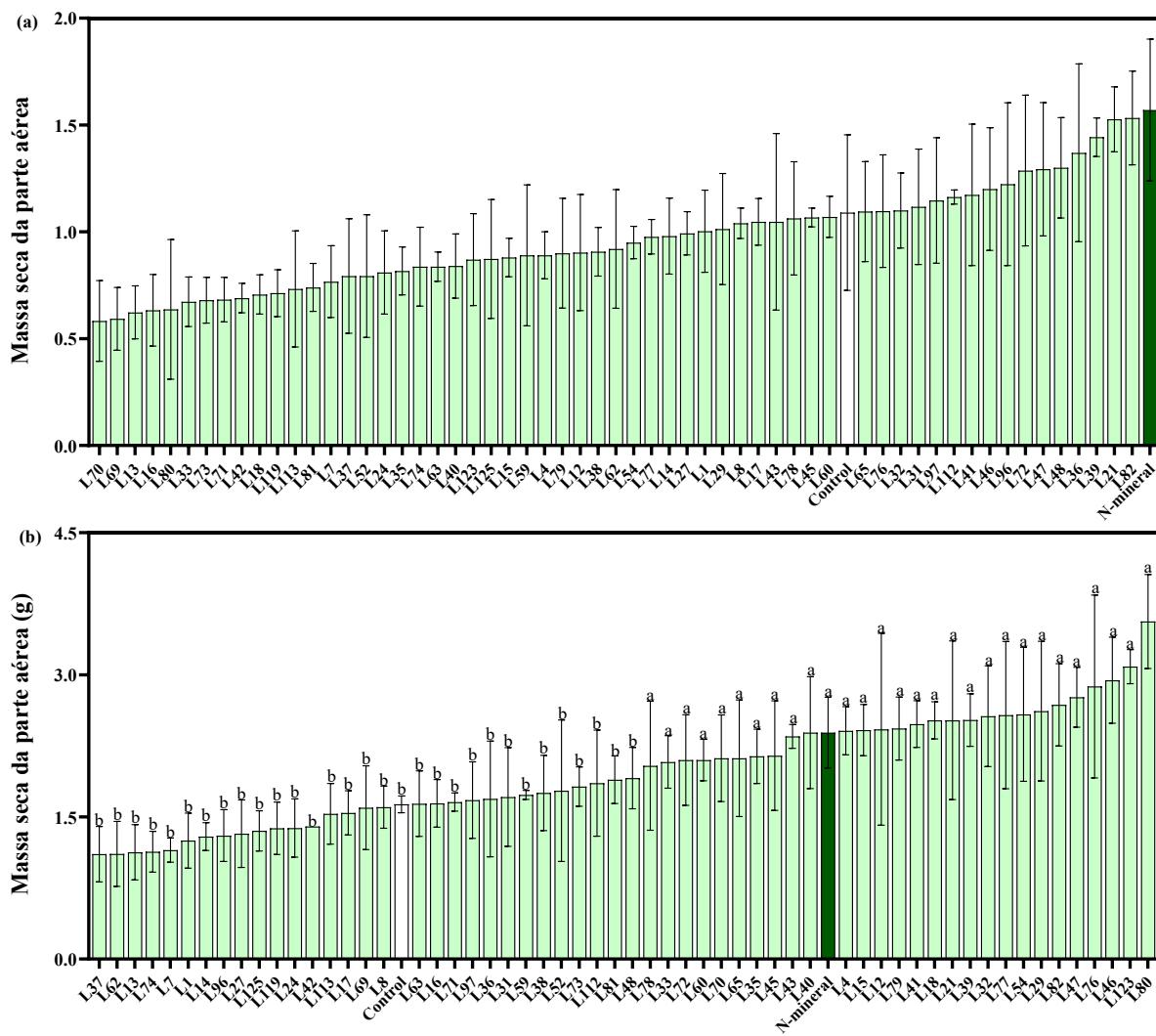
## 6. RESULTADOS

### 6.1 Seleção das estirpes de rizóbio com alto desempenho simbiótico em feijão-caupi

A seleção realizada com as estirpes de rizóbio em casa de vegetação, apesar de não apresentar diferença estatística entre os tratamentos, agrupou as estirpes em categorias de baixo, médio e alto desempenho simbiótico em feijão-caupi. No primeiro *screening* (Figura 6 – a) foi possível observar que 27,6% das estirpes incrementaram os valores de massa seca da parte aérea (MSPA) em comparação ao tratamento sem inoculação (Control) classificando essas estirpes (L65, L76, L32, L31, L97, L112, L41, L46, L96, L72, L47, L48, L36, L39, L21 e L82) com médio desempenho com valores de massa seca da parte aérea entre 1,09 e 1,53 g por vaso e o restante das estirpes com baixo desempenho com intervalos entre 0,58 e 1,07 g por vaso. A partir desses resultados, foi realizado um segundo ensaio, com o cultivo sucessivo do feijão-caupi, com intuito de avaliar a consistência da eficiência simbiótica exercido no primeiro cultivo sob as mesmas condições experimentais.

Ao repetir o cultivo, verificamos a reprodutibilidade do desempenho das estirpes quanto o acúmulo de biomassa na parte aérea da planta (Figura 6 – b). Nesse experimento, foi possível classificá-las em baixo, moderado e alto desempenho simbiótico quando comparadas aos tratamentos Control e N-mineral, sendo 29,3%, 39,7% e 31% das estirpes agrupadas em cada classificação, respectivamente. Além disso, houve diferença estatística entre os tratamentos com alto desempenho e parte das estirpes de médio desempenho em comparação aos demais, demonstrando o potencial para incremento de massa seca da parte aérea do feijão-caupi quando inoculados com os rizóbios. Com base nesses resultados, dez estirpes foram selecionadas com os parâmetros de melhor desempenho e de maior constância nos dois cultivos em comparação ao tratamento não inoculado, sendo as estirpes L46, L76, L47, L82, L29, L77, L32, L39, L21 e L41. Os valores de massa seca de parte aérea variaram entre 1,1 e 1,6 g por vaso para estirpes com baixo desempenho, 1,4 a 2,39 g por vaso para estirpes com moderado desempenho e as estirpes com alto desempenho apresentaram valores entre 2,41 e 3,56 g por vaso.

Figura 6 - Massa seca da parte aérea (MSPA, g) de feijão-caupi do primeiro screening com cultivo sucessivo realizado.



Fonte: Dados da pesquisa. Representação gráfica dos teores de massa seca da parte aérea (MSPA) (g por vaso) do (a) primeiro cultivo e (b) segundo cultivo sucessivo. As barras verticais representam a média e desvio padrão. Control = Tratamento controle absoluto (sem inoculação e sem fertilizante nitrogenado) e N-mineral = Tratamento controle nitrogenado (sem inoculação e com fertilizante com nitrogênio mineral). CV = 39,82% para MSPA no primeiro cultivo; CV = 38,48% para MSPA no segundo cultivo. Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

No segundo screening (Figura 7), as estirpes selecionadas foram analisadas em dois tipos diferentes de solo, um obtido dos campos experimentais da UFC e outro dos campos experimentais do CNPAT. O solo oriundo de Pacajus, Ceará (CNPAT) apresentou valores menores de micronutrientes como zinco, cobre, manganês e ferro, em comparação ao solo da UFC, também apresentaram reduções no teor de matéria orgânica, fósforo e pH, sendo considerado levemente ácido e o solo da UFC com pH neutro. Outros atributos relativamente

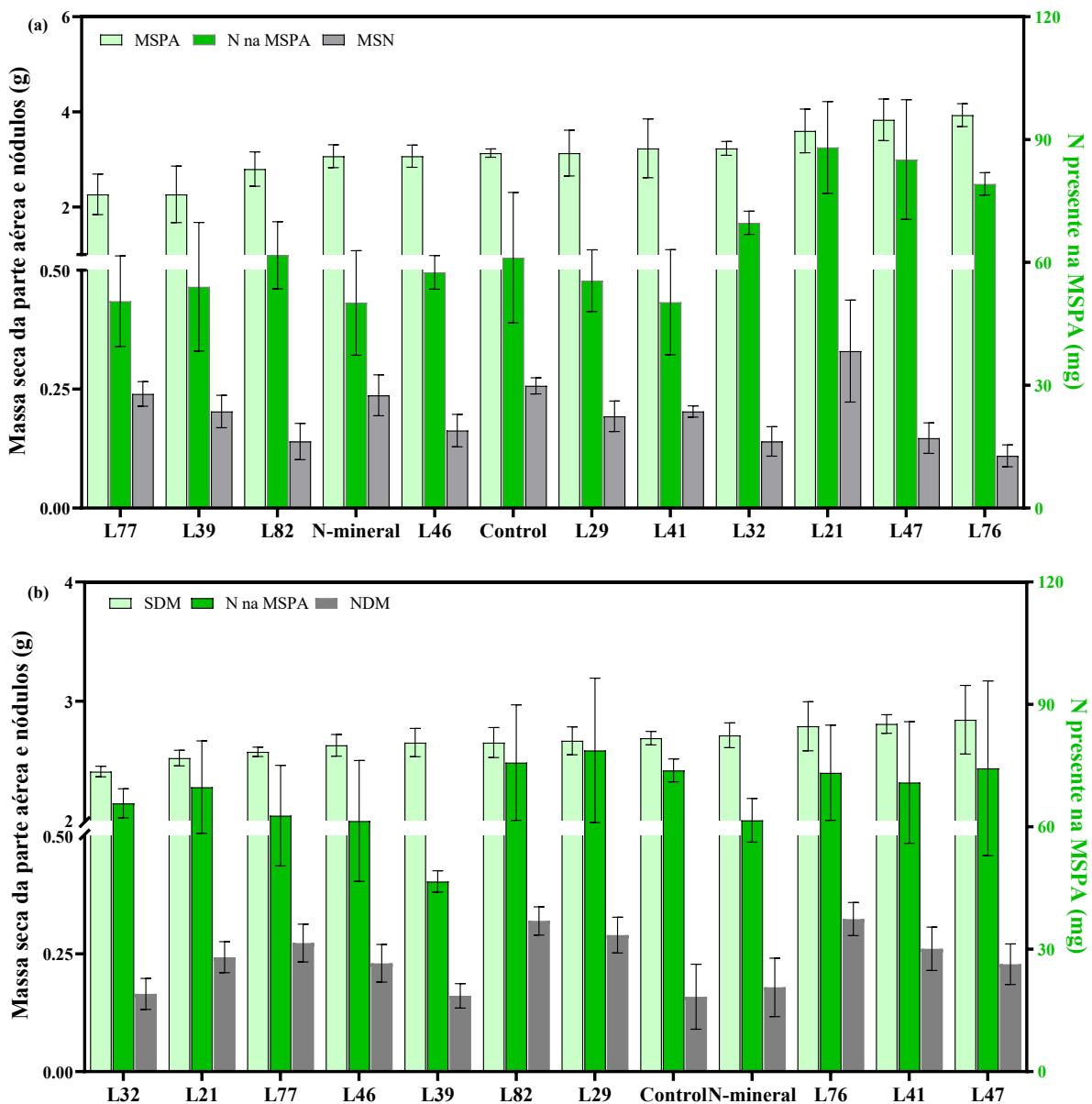
baixos foram os cátions trocáveis. A acidez potencial e o alumínio trocável foram iguais nos dois solos, diferentemente dos teores de SB, CTC e V que foram menores no solo do CNPAT. O solo da UFC, apresentou valores altos de micronutrientes, além de teores de fósforo e matéria orgânica maiores que o solo do CNPAT, além do SB e CTC e saturação por base.

Ambos os solos foram utilizados para a avaliação da eficiência simbiótica das estirpes de rizóbio na cultura do feijão-caupi, em casa de vegetação. Foram analisados a massa seca da parte aérea, de nódulos e o teor de nitrogênio na parte aérea das plantas, como demonstrado na Figura 7. Observou-se com o experimento realizado no solo do CNPAT (Figura 7 – a) obteve 60% das estirpes superiores aos tratamentos controles, metade delas apresentaram valores elevados de massa seca da parte aérea, maiores que 3 g por vaso, e da quantidade de nitrogênio presente nessa região, superior a 80 mg por planta, sendo as estirpes L21, L47 e L76. Em relação aos nódulos, a estirpe com maior teor de massa seca foi a L21, apresentando também maior quantidade de N na parte aérea.

No ensaio realizado no solo da UFC (Figura 7 – b), apenas três estirpes proporcionaram acúmulos de massa seca superiores aos tratamentos Control e N-mineral, sendo a L76, L41 e L47. Os três isolados apresentaram valores semelhantes de massa seca da parte aérea e teor de nitrogênio presente nessa biomassa, entretanto, a L76 demonstrou maior quantidade em relação aos nódulos. Todas as estirpes apresentaram alto potencial na fixação biológica de nitrogênio em feijão-caupi.

No solo da UFC, observou-se menor nodulação nos tratamentos controle em comparação ao solo do CNPAT. Os valores de massa seca da parte aérea também foram inferiores no experimento conduzido com o solo da UFC. Por outro lado, esse solo apresentou maiores valores de nitrogênio acumulado na parte aérea em comparação ao solo do CNPAT. Considerando os dois cultivos nos dois solos diferentes, foram selecionadas três estirpes com melhor desempenho simbiótico em feijão-caupi, sendo a L41, L47 e L76, as quais apresentaram eficiência quanto à adaptabilidade, à competitividade e ao estabelecimento nos solos. A L47 demonstrou maior estabilidade nos dois solos testados com menor e maior fertilidade, apresentando menor nodulação, porém com valores elevados de massa seca da parte aérea e quantidade de nitrogênio presente na parte aérea, tornando essa estirpe com melhor desempenho simbiótico dos testes realizados para seleção de rizóbio para feijão-caupi. Os dois cultivos não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos.

Figura 7 - Valores de massa seca da parte aérea (MSPA, g), de nódulos (MSN, g) e nitrogênio presente na parte aérea (N na MSPA, mg) de feijão-caupi do segundo screening com dois solos.

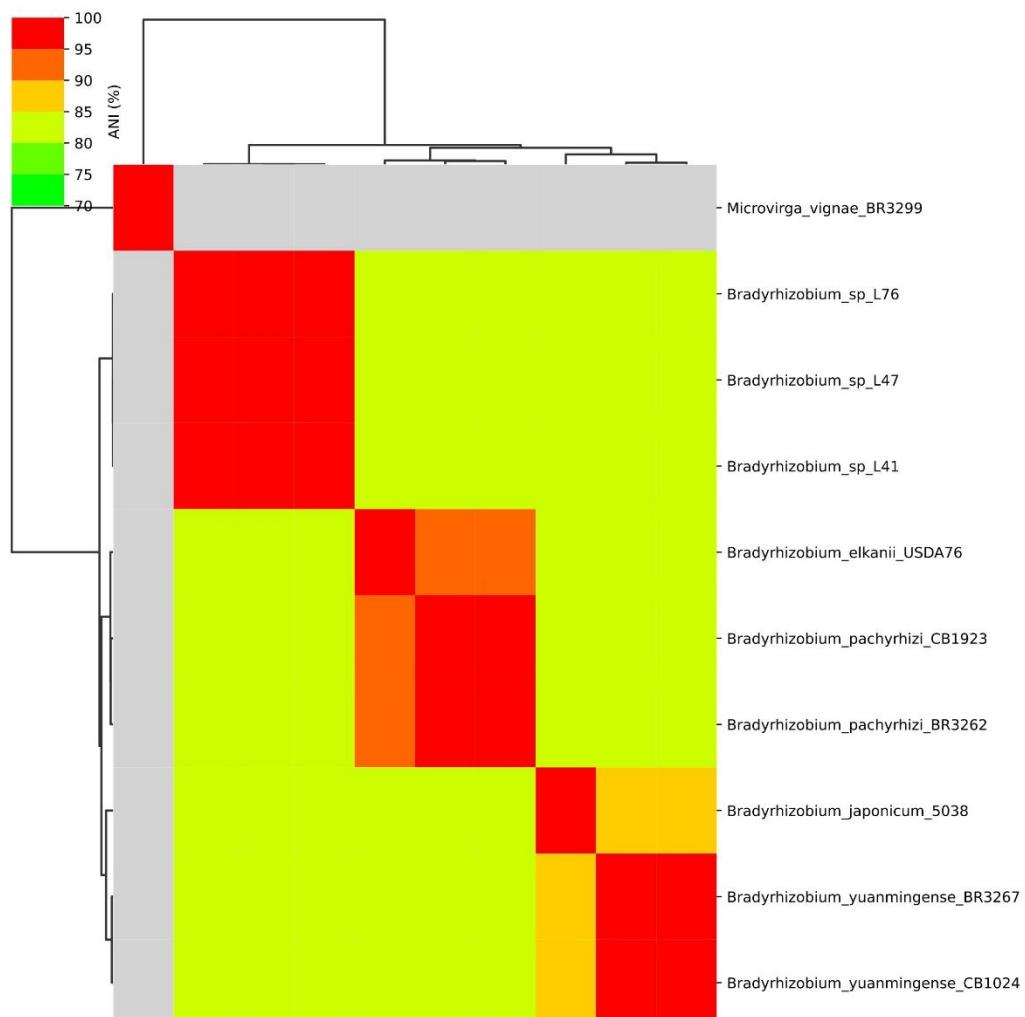


Fonte: Dados da pesquisa. Representação gráfica dos valores de massa seca da parte aérea (g por planta), de nódulos (g por planta) e o acúmulo de nitrogênio na parte aérea (mg por planta) do screening realizado com **(a)** solo do CNPAT em Pacajus, Ceará e **(b)** solo dos campos experimentais da UFC em Fortaleza, Ceará. As barras verticais representam a média e desvio padrão. Control = Tratamento controle absoluto (sem inoculação e sem fertilizante nitrogenado) e N-mineral = Tratamento controle nitrogenado (sem inoculação e com fertilizante com nitrogênio mineral). **(a)** CV = 22,80% para MSPA; CV = 30,39% para N na MSPA; CV = 37,01% para MSN. **(b)** CV = 9,39% para MSPA; CV = 33,32% para N na MSPA; CV = 36,02% para MSN.

## 6.2 Identificação molecular das estirpes de rizóbio

A análise dos resultados referente ao ANI das três estirpes selecionadas (L41, L47 e L76) (Figura 8) permitiu identificar as três bactérias pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*, devido ao grau de similaridade acima de 80% com espécies do gênero. Além disso, foi analisado o grau de similaridade entre as estirpes selecionadas com a estirpe *Microvirga vignae* BR3299<sup>T</sup>, uma estirpe-tipo com genoma de referência para espécie e o resultado obtido foi abaixo de 70%

Figura 8 - Heatmap de identidade genômica média (ANI) entre as estirpes de rizóbio selecionadas (L41, L47 e L76) neste estudo e espécies representativas do gênero *Bradyrhizobium* e *Microvirga*.



Fonte: Dados da pesquisa. A escala de cores indica o grau de similaridade, abaixo de 70% (cinza) a 100% (vermelho). Valores de ANI iguais ou superiores a 80% indicam estirpes pertencentes ao mesmo gênero. Valores de ANI iguais ou superiores a 96% indicam proximidade genômica compatível com pertencimento à mesma espécie.

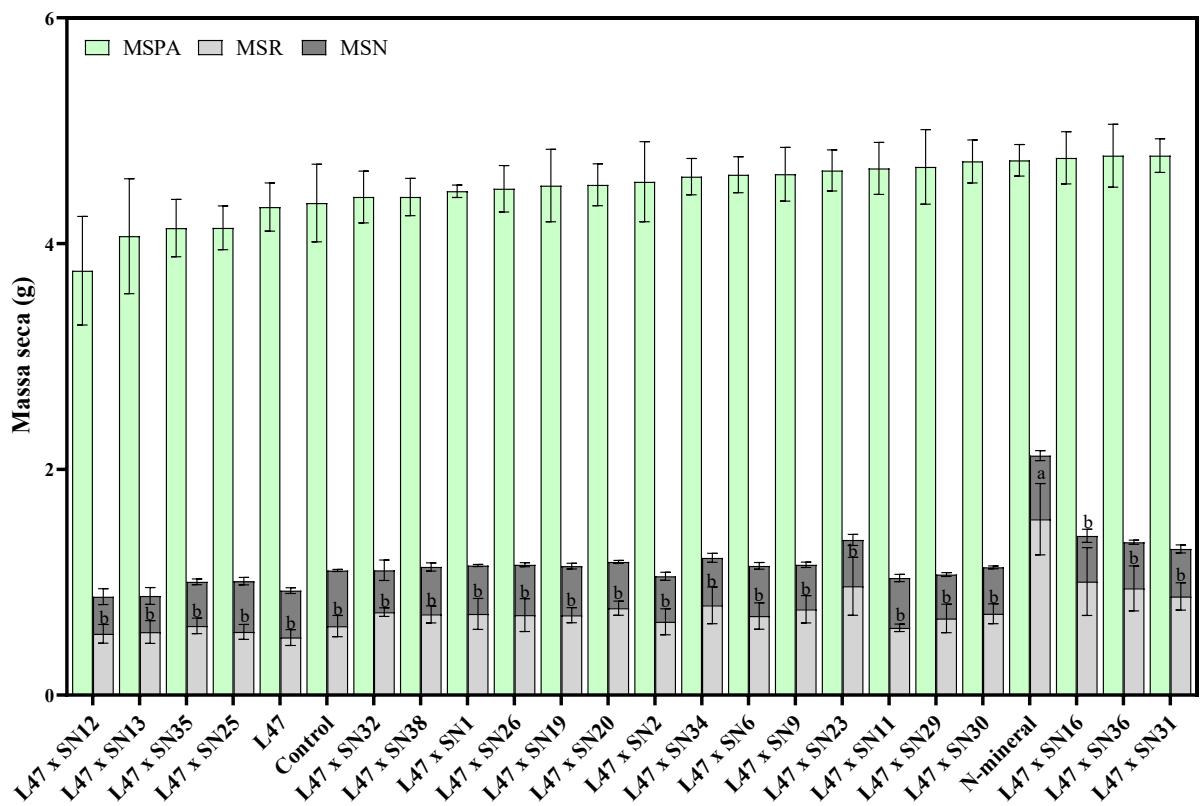
de identidade ANI entre as estirpes. Além disso, a análise com estirpes *B. elkanii* USDA76<sup>T</sup> apresentou 83,40%, 83,42% e 83,24% de identidade ANI com as estirpes L41, L47 e L76, respectivamente. O grau de similaridade com as estirpes recomendadas pela EMBRAPA para o feijão-caupi, *B. pachyrhizi* BR3262 e *B. yuanmingense* BR3267 ficou no intervalo de 82% e 83% e a comparação com as estirpes-tipo dessas espécies (*B. pachyrhizi* CB1923<sup>T</sup> e *B. yuanmingense* CB1024<sup>T</sup>) apresentou intervalos entre 82% a 83,45%. Por fim, a análise do ANI com a estirpe-tipo da espécie *B. japonicum* 5038<sup>T</sup> apresentou 82,23%, 82,28% e 82,10% de identidade ANI com as estirpes selecionadas.

### **6.3 Ensaio de coinoculação entre o rizóbio selecionado e actinobactérias e *Bacillus* spp.**

A estirpe L47 foi selecionada para os experimentos de coinoculação com actinobactérias e as bactérias do gênero *Bacillus* em feijão-caupi. Os resultados referentes a coinoculação entre rizóbio e actinobactérias estão presentes no Gráfico 1, apesar de não apresentarem diferença estatística entre os tratamentos, podemos observar que três estirpes quando coinoculadas em feijão-caupi promoveram aumento de massa seca da parte aérea, das raízes e dos nódulos, sendo o primeiro parâmetro superior ao tratamento nitrogenado e todos maiores que os tratamentos Control e L47. Além disso, 90,5% das estirpes de actinobactérias promoveram aumento de MSR e todas incrementaram a MSN em comparação com a inoculação única do rizóbio, sendo os quatro melhores consórcio bacterianos a L47xSN31, L47xSN36, L47xSN16 e L47xSN23.

A coinoculação do rizóbio e a estirpe SN16 aumentou tanto a massa seca dos nódulos quanto das raízes, representando a melhor coinoculação do rizóbio com actinobactérias no experimento. Podemos verificar esse aumento na Figura 9, sendo possível observar uma maior quantidade de nódulos formados e um volume maior de raízes nos experimentos que foram coinoculados (Figura 9 – b). As actinobactérias apresentaram intervalos de MSPA em 3,75 a 4,8 g por planta, de MSR entre 0,5 e 1,55 g por planta, apresentando diferença estatística entre o tratamento N-mineral com os demais, e MSN com valores a partir de 0,315 até 0,56 g por planta.

Gráfico 1 - Resultados da massa seca da parte aérea (MSPA, g), de raízes (MSR, g) e de nódulos (MSN, g) do experimento de coinoculação do rizóbio selecionado (L47) e actinobactérias (SN).



Fonte: Dados da pesquisa. Representação gráfica dos resultados da massa seca da parte aérea (g por planta), de raízes (g por planta) e de nódulos (g por planta) do experimento realizado com a estirpe de rizóbio selecionada e as actinobactérias. As barras verticais representam a média e desvio padrão. L47= Tratamento controle apenas com a inoculação do rizóbio selecionado, Control= Tratamento controle absoluto (sem inoculação e sem fertilizante nitrogenado), N-mineral= Tratamento controle nitrogenado (sem inoculação e com fertilizante com nitrogênio mineral). CV = 10,09% para MSPA; CV = 36,90% para MSR; CV = 17,25% para MSN. Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

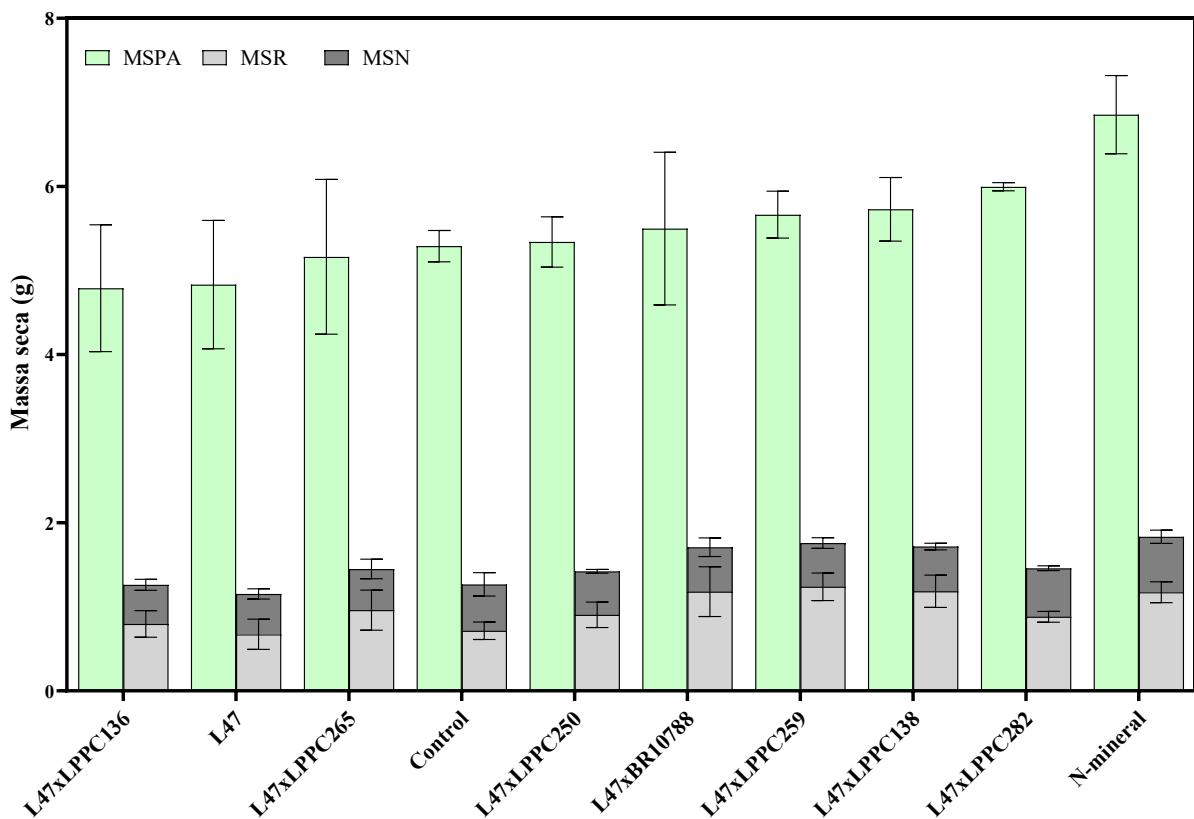
Figura 9 - Comparação entre as raízes coletadas dos experimentos de screening dos rizóbios e de coinoculação com actinobactérias.



Fonte: Dados da pesquisa. Imagens das raízes coletadas em dois experimentos diferentes após lavagem e antes da coleta dos nódulos. **(a)** Experimento de seleção dos dez rizóbios selecionados; **(b)** Experimento de coinoculação entre rizóbios e actinobactérias.

O experimento realizado com a coinoculação da estirpe de *Bradyrhizobium* sp. (L47) e estirpes de *Bacillus* spp. não apresentaram diferenças estatística nos parâmetros utilizados entre os tratamentos, contudo, foi possível verificar o incremento de MSPA de cinco estirpes coinoculadas, L47xLPPC282, L47xLPPC138, L47xLPPC259, L47xBR10788 e L47xLPPC250 (Gráfico 2) em comparação ao tratamento não inoculado. Além disso, o consórcio bacteriano da estirpe L47 com a LPPC138, LPPC259 e BR10788 apresentou massa seca das raízes superior aos tratamentos controle. A coinoculação com a estirpe LPPC282 foi a combinação que mais promoveu aumento na massa seca de nódulos analisada.

Gráfico 2 - Valores da massa seca da parte aérea (MSPA, g), de raízes (MSR, g) e de nódulos (MSN, g) do ensaio de coinoculação do rizóbio selecionado (L47) e *Bacillus* spp. (LPPC).



Fonte: Dados da pesquisa. Representação gráfica dos resultados da massa seca da parte aérea ( $\text{g planta}^{-1}$ ), de raízes ( $\text{g planta}^{-1}$ ) e de nódulos ( $\text{g planta}^{-1}$ ) do experimento realizado com a estirpe de rizóbio selecionada e as bactérias do gênero *Bacillus*. As barras verticais representam a média e desvio padrão. L47= Tratamento controle apenas com a inoculação do rizóbio selecionado, Control= Tratamento controle absoluto (sem inoculação e sem fertilizante nitrogenado), N-mineral= Tratamento controle nitrogenado (sem inoculação e com fertilizante com nitrogênio mineral). CV = 21,24% para SDM; CV = 37,30% para RDM; CV = 27,31% para NDM.

Cerca de 85,7% das estirpes apresentaram MSPA e MSN maiores que o tratamento com inoculação única com a L47 e todas foram superiores no acúmulo de massa seca das raízes e o aumento no peso das raízes pode ser visto na Figura 10 com as imagens das raízes no experimento de coinoculação com estirpes do gênero *Bacillus* (Figura 10 – b). Visivelmente, houve aumento no número de nódulos na raiz principal e aumento das raízes laterais. Os intervalos obtidos dos consórcios bacterianos entre rizóbio e *Bacillus* spp. para MSPA foram de 4,78 a 6,85 g por planta, para MSR de 0,67 a 1,23 g por planta e MSN com 0,46 a 0,65 g por planta.

Figura 10 - Comparação entre as raízes coletadas dos experimentos de *screening* dos rizóbios e de coinoculação com *Bacillus* spp.



Fonte: Dados da pesquisa. Imagens das raízes coletadas em dois experimentos diferentes após lavagem e antes da coleta dos nódulos. **(a)** Experimento de seleção dos dez rizóbios selecionados; **(b)** Experimento de coinoculação entre rizóbios e bactérias do gênero *Bacillus*.

#### **6.4 Caracterização dos mecanismos de ação para promoção de crescimento *in vitro* das estirpes**

Além dos três rizóbios selecionados, foram escolhidas quatro estirpes de cada tipo de BPCV avaliado, sendo esses: L41, L47, L76, SN16, SN23, SN31, SN36, LPPC138, LPPC259, LPPC282 e BR10788, essas estirpes foram analisadas quanto a mecanismos de ação utilizados como bactérias promotoras de crescimento. Inicialmente, foi analisado a capacidade de fixação de nitrogênio de vida livre, as estirpes de *Bradyrhizobium* sp. e de actinobactérias não apresentaram a formação da película aerotáxica típica (Figura 11 – b) apresentada por estirpes fixadoras de N de vida livre quando inoculadas nos meios LGI, JMV, NFB e JNFb.

Entretanto, três estirpes do gênero *Bacillus* apresentaram a formação da película esbranquiçada (Figura 11 – a), sendo considerado resultado positivo nos meios de cultura semissólidos LGI e NFB, e a estirpe LPPC259 apenas no meio semissólido LGI. Na figura 12 podemos verificar exemplo de presença (Figura 11 – a) e ausência (Figura 11 – b) da película comparadas aos controles de cada meio inoculado com água deionizada esterilizada.

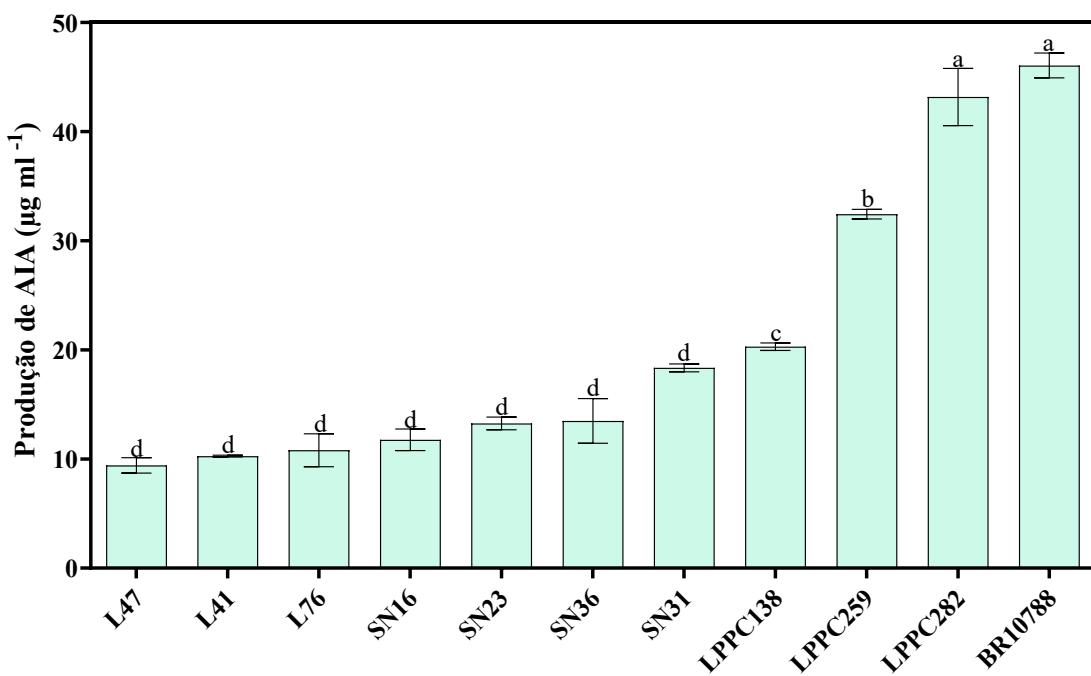
Figura 11 - Ensaios realizados para fixação de nitrogênio de vida livre em quatros meios livres de N.



Fonte: Dados da pesquisa. **(a)** Teste com formação da película aerotáxica típica para fixação de N em condições de baixo oxigênio; **(b)** Teste sem a formação da película aerotáxica.

Todas as estirpes apresentaram produção de ácido indolacético, com médias variando entre 9,41 a 46  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Gráfico 3). Os intervalos para os rizóbios foram de  $9,41 \pm 0,7 \mu\text{g mL}^{-1}$  até  $10,8 \pm 1,51 \mu\text{g mL}^{-1}$ , sendo a maior produtora a estirpe L76, em relação as actinobactérias os resultados variaram entre  $11,76 \pm 0,99 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $18,35 \pm 0,36 \mu\text{g mL}^{-1}$  com a bactéria com maior produção de AIA sendo a SN31. As bactérias do gênero *Bacillus* apresentaram os melhores valores relativos à produção desse fitohormônio, com médias entre  $20,29 \pm 0,34 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $46,06 \pm 1,14 \mu\text{g mL}^{-1}$ , com a estirpe apresentando a melhor média do experimento sendo a BR10788.

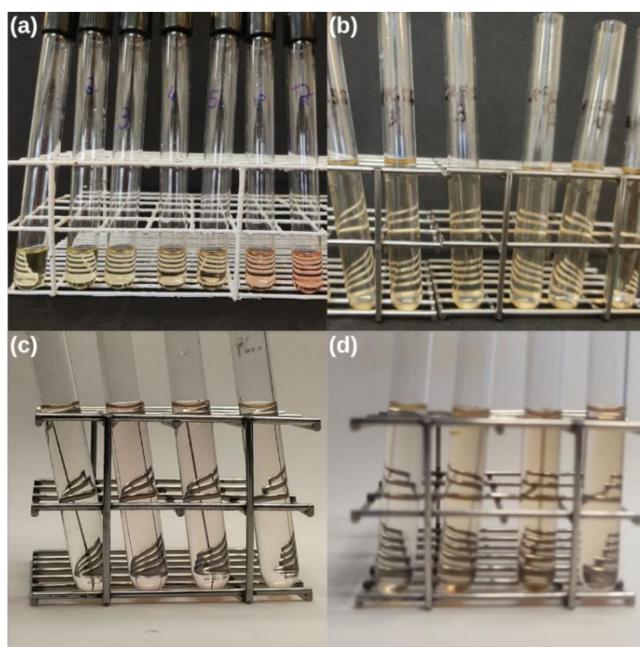
Gráfico 3 - Quantificação de AIA produzido pelas estirpes de rizóbio, actinobactérias e bactérias do gênero *Bacillus*.



Fonte: Dados da pesquisa. Representação gráfica dos resultados obtidos da quantificação de ácido indolacético ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) produzido pelas estirpes a partir da reação com reagente de Salkowski. As barras verticais representam a média e desvio padrão. CV = 10,30%. Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Podemos verificar a mudança de coloração com adição do reagente de Salkowski na Figura 12, a primeira imagem (Figura 12 – a) demonstra os tubos de ensaio utilizados para montagem da curva, da menor concentração de AIA ( $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) até a maior ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) com adição do reagente de Salkowski. Observa-se que os *Bacillus* spp. (Figura 12 – b) obtiveram coloração semelhantes a concentrações moderadas, as estirpes de *Bradyrhizobium* sp. (Figura 12 – c) com médias e as actinobactérias apresentaram colorações semelhantes a alta concentrações (Figura 12 – d).

Figura 12 - Experimento para produção do ácido indolacético (AIA) com adição do reagente de Salkowski.

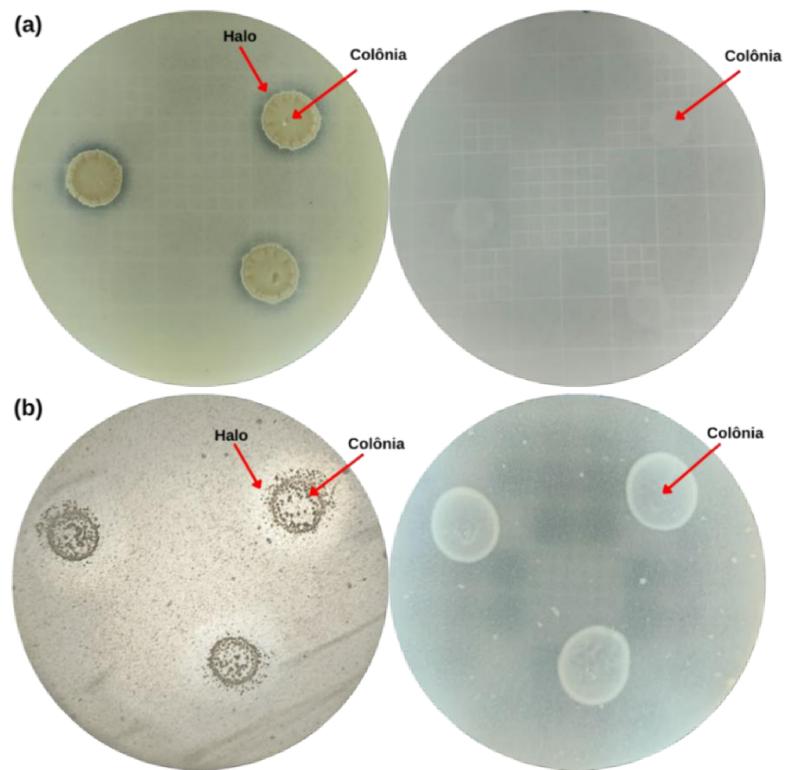


Fonte: Dados da pesquisa. **(a)** Tubos de ensaios utilizados para montagem da curva-padrão para quantificação do AIA; Resultados obtidos com as estirpes em comparação ao controle sem inóculo (primeiro tubo); **(b)** Bactérias do gênero *Bacillus*; **(c)** *Bradyrhizobium* sp.; **(d)** Actinobactérias.

Para solubilização de fósforo, 45,45% das estirpes apresentaram formação de halo em meio de cultura ágar PVK suplementadas com fosfato de cálcio (Figura 13 – a). Em relação as estirpes de *Bradyrhizobium* sp., apenas uma estirpe apresentou resultado positivo, a L41, a qual teve o índice de solubilização (IS) igual a  $1,78 \pm 0,12$ . Semelhante aos rizóbios, apenas uma estirpe de actinobactéria apresentou halo de solubilização, a SN36 com IS igual a  $1,48 \pm 0,04$ . Cerca de 75% das estirpes do gênero *Bacillus* testadas foram consideradas solubilizadoras de P, apresentando valores entre  $1,08 \pm 0,006$  e  $1,16 \pm 0,05$  (Figura 14 – a). Todas as estirpes foram consideradas com baixa solubilização (BM) devido ao IS menor que 2,0 (MATOS *et al.* 2017).

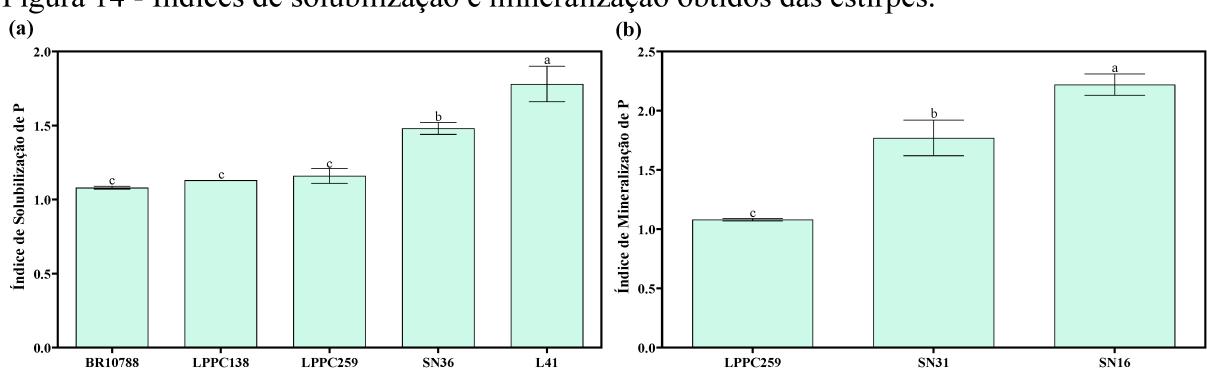
Os resultados referentes a mineralização de fósforo foram reunidos na Figura 14 – b. Apenas 27,3% das estirpes testadas apresentaram formação de halo de mineralização em meio PVK com lecitina de soja (Figura 13 – b), duas estirpes de actinobactérias e uma do gênero *Bacillus*. Dentre essas, a SN16 apresentou maior valor de índice de mineralização (IM) com média em  $2,22 \pm 0,09$ , sendo considerada com média mineralização de P. Outra estirpe de actinobactéria, SN31 apresentou média igual a  $1,77 \pm 0,15$  e a LPPC259, o único *Bacillus* spp. obteve IM em  $1,09 \pm 0,01$ , todas as duas consideradas de baixa mineralização.

Figura 13 - Ensaios realizados para solubilização e mineralização de fósforo em meio de cultura ágar PVK.



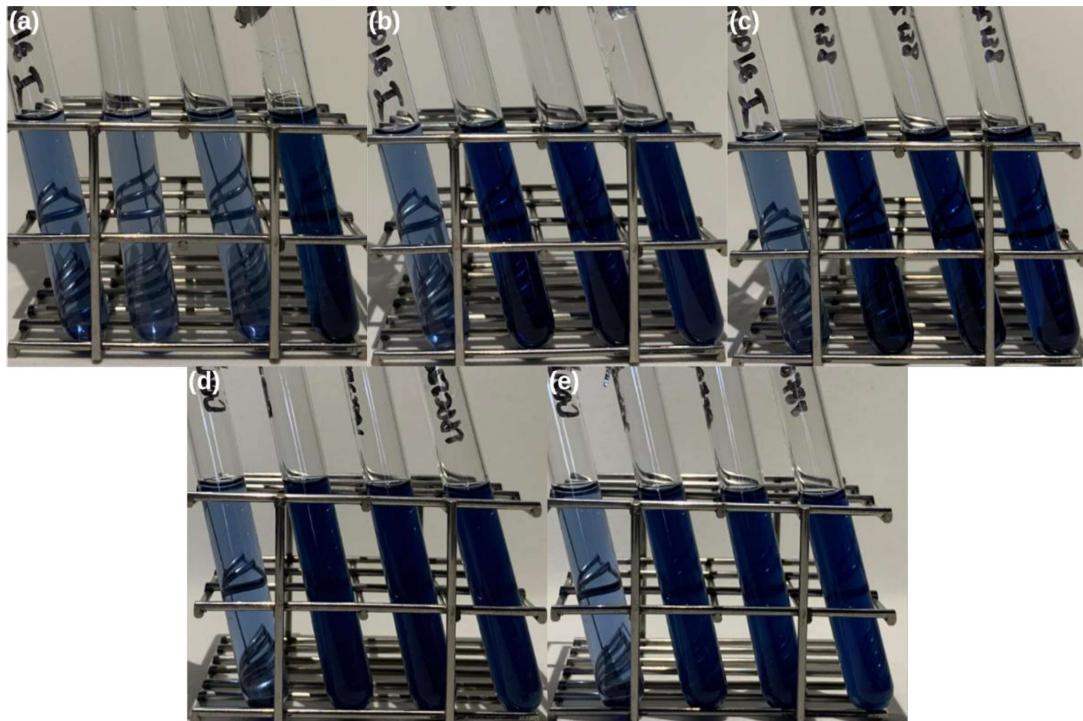
Fonte: Dados da pesquisa. (a) Placas de Petri com meio de cultura ágar PVK adicionado de fosfato de cálcio para teste de solubilização de P com resultado positivo (presença do halo de solubilização) e resultado negativo (ausência do halo) (b) Placas de Petri com meio de cultura ágar PVK suplementado com lecitina de soja para ensaio de mineralização de P com resultado positivo (presença de halo de mineralização) e resultado negativo (ausência de halo).

Figura 14 - Índices de solubilização e mineralização obtidos das estirpes.



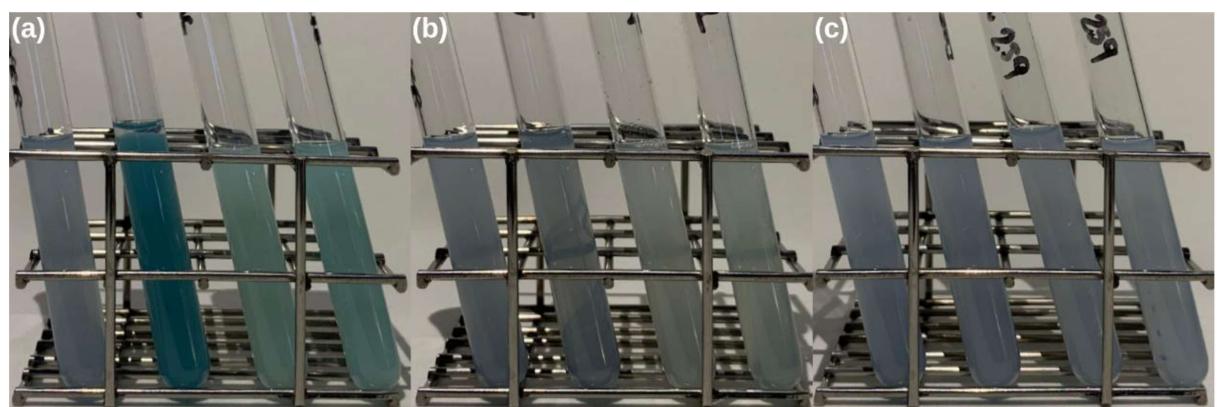
Fonte: Dados da pesquisa. Representação gráfica dos resultados obtidos dos índices de (a) solubilização e de (b) mineralização das estirpes em placas de Petri com meio de cultura ágar PVK adicionado de fosfato de cálcio e lecitina de soja. As barras verticais representam a média e desvio padrão. CV = 8,1% para solubilização, CV = 10,29% para mineralização. Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Figura 15 - Reação do reagente colorimétrico de ácido ascórbico com o fosfato solúvel produzido pelas estirpes bacterianas em meio de cultura caldo PVK suplementado com fosfato de cálcio.



Fonte: Dados da pesquisa. Tubos de ensaio com sobrenadante obtido após cultivo das estirpes solubilizadoras de P em caldo PVK. Primeiro tubo referente ao controle de cada tratamento. As estirpes positivas para solubilização foram: (a) L41; (b) SN36; (c) LPPC138; (d) LPPC259 e (e) BR10788.

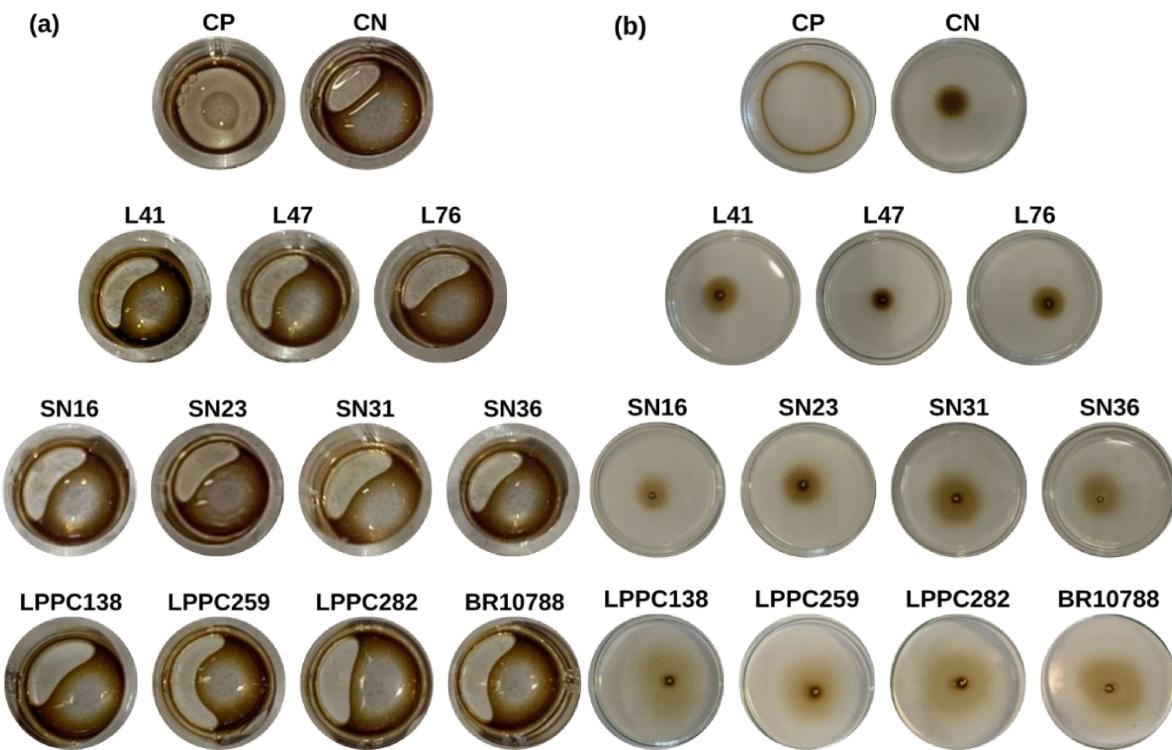
Figura 16 - Reação do reagente colorimétrico de ácido ascórbico com o fosfato solúvel produzido pelas estirpes bacterianas em meio de cultura caldo PVK suplementado com lecitina de soja.



Fonte: Dados da pesquisa. Tubos de ensaio com sobrenadante obtido após cultivo das estirpes mineralizadoras de P em caldo PVK. Primeiro tubo referente ao controle de cada tratamento. As estirpes positivas para mineralização foram: (a) SN16 (b) SN31 (c) LPPC259.

A reação colorimétrica do reagente de ácido ascórbico para as estirpes positivas para solubilização demonstrou a liberação do P solúvel quando a coloração diferiu do controle, sendo um resultado positivo para as estirpes de actinobactéria SN36 (Figura 15 – b) e de bactérias do gênero *Bacillus* LPPC138 (Figura 15 – c), LPPC259 (Figura 15 – d) e BR10788 (Figura 15 – e). As estirpes positivas para mineralização de P que obtiveram liberação do P solúvel foram as estirpes de actinobactérias SN16 (Figura 16 – a) e SN31 (Figura 16 – b). As demais estirpes não diferiram do tubo de ensaio contendo o sobrenadante sem inoculação acrescido do reagente colorimétrico.

Figura 17 - Resultados obtidos dos testes qualitativos para produção de biossurfactantes.



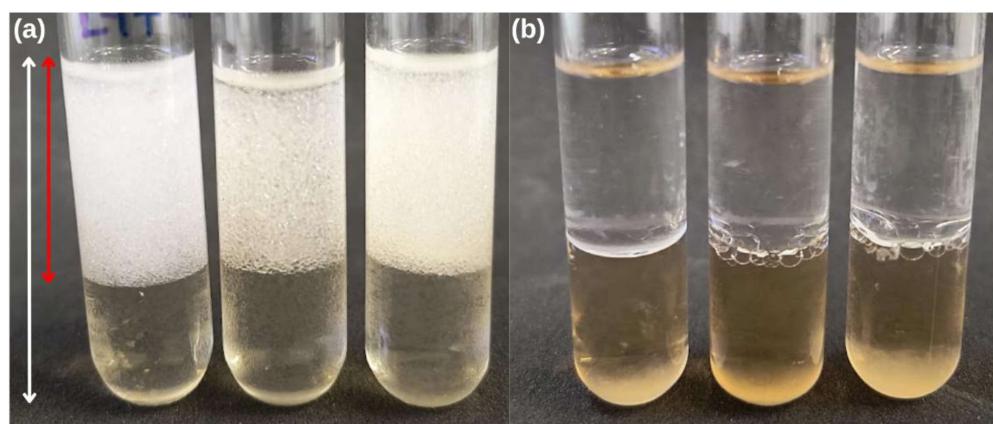
Fonte: Dados da pesquisa. **(a)** Teste do colapso da gota; **(b)** Teste de dispersão em óleo. CP = Controle positivo com SDS (1%), CN = Controle negativo com água, L = estirpes de rizóbio, SN = estirpes de actinobactérias, LPPC = estirpes de *Bacillus* spp.

Os ensaios qualitativos para produção de biossurfactantes foram analisados, a primeira análise foi o colapso de gotas, sendo duas estirpes de *Bradyrhizobium* sp. classificadas com moderada atividade de biossurfactante nesse teste, a L41 e a L47, como demonstrado nas imagens da Figura 17 – a, podemos verificar que a gota ocupou dois quadrantes, diferentemente da L76, a qual apresentou fraca atividade de biossurfactante, ocupando apenas um quadrante. As actinobactérias apresentaram duas estirpes com moderada atividade, a SN16 e a SN31,

também ocupando dois quadrantes com adição da gota em óleo, o restante das estirpes ficaram classificadas com fraca atividade de biossurfactante.

As bactérias do gênero *Bacillus* apresentaram 75% das suas estirpes com moderada atividade de biossurfactante e a estirpe LPPC259 com forte atividade como biossurfactante no teste de colapso de gotas (Figura 17 – a). Os resultados obtidos do teste de dispersão em óleo foram iguais para todas as estirpes, as 11 estirpes foram classificadas com fraca atividade de biossurfactante (Figura 17 – b). Em relação ao teste de emulsificação, foram avaliadas as estirpes que formaram a coluna de emulsão e a sua estabilidade por 48h e 72 h, como demonstrado na Figura 18, as estirpes com atividade de emulsificação (Figura 18 – a) e sem a coluna de emulsão (Figura 18 – b). Os rizóbios apresentaram os maiores índice de emulsificação, com intervalo entre  $60,67 \pm 10,84\%$  e  $74,5 \pm 0,29\%$ , e índice de estabilidade em 48 h o intervalo variou de  $57,33 \pm 9,70\%$  a  $61 \pm 1,73\%$ , e em 72 h os valores ficaram entre  $53,33 \pm 7,22\%$  e  $60,67 \pm 0,88\%$  (Figura 19).

Figura 18 - Resultados obtidos para o teste de emulsificação.

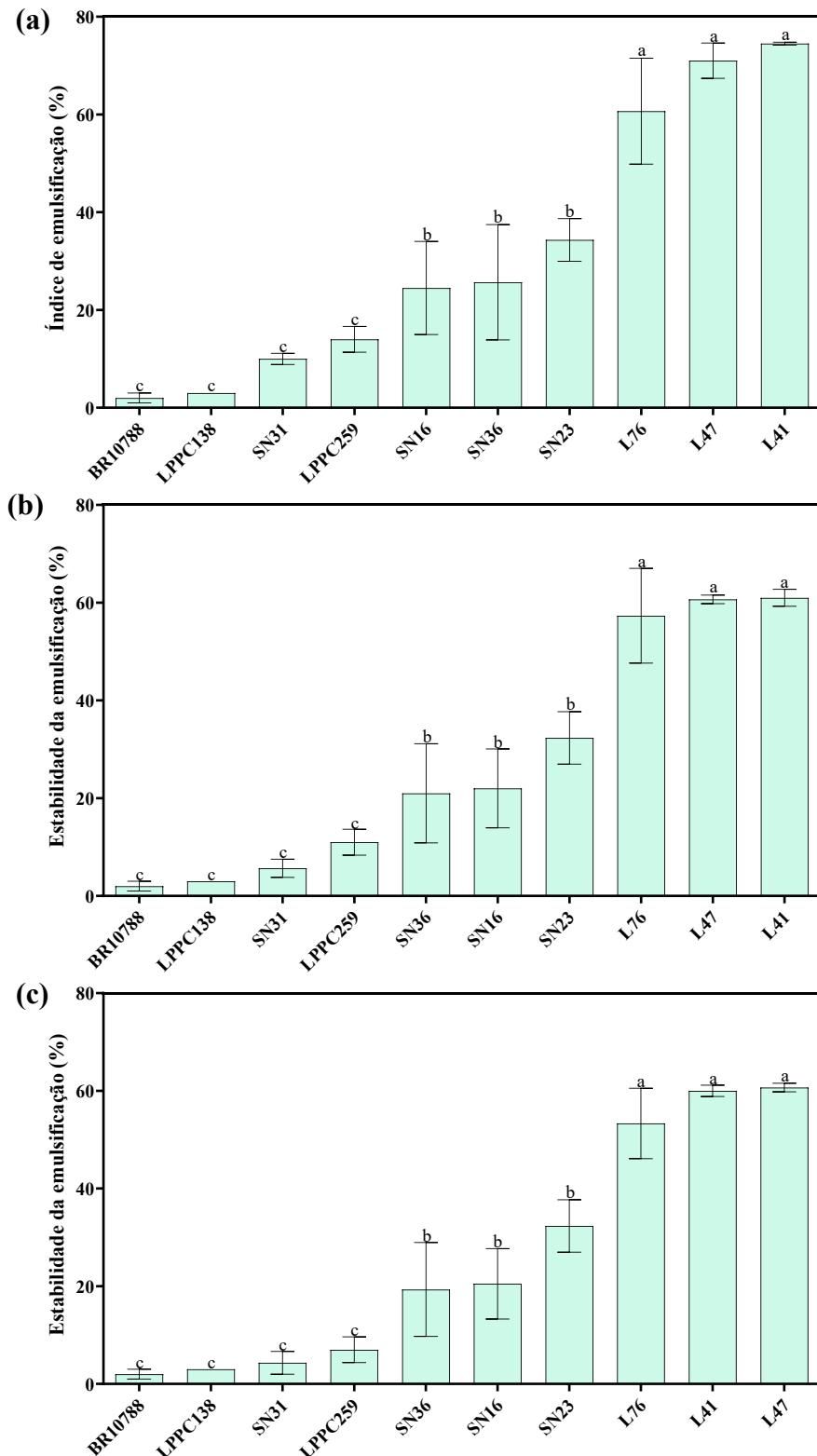


Fonte: Dados da pesquisa. (a) Formação da coluna de emulsificação. Seta branca = coluna total, seta vermelha = coluna de emulsificação; (b) Ausência da coluna de emulsificação.

As actinobactérias apresentaram três estirpes com valores acima de 20% no índice de emulsificação (Figura 18 – a) e estabilidade em 48h (Figura 19 – b) e 72h, apenas uma apresentou intervalos de  $10 \pm 1,15\%$  e  $4,33 \pm 2,33\%$  nos três índices. A estirpe de *Bacillus* spp. LPPC282 não formou coluna de emulsão, os outros três isolados avaliados formaram uma baixa coluna de emulsificação, apresentando médias no índice de emulsificação entre  $2,00 \pm 1,00\%$  e  $14,0 \pm 2,65\%$  (Figura 19 – a), para os índices de estabilidades em 48h (Figura 19 – b) foram  $2,00 \pm 1,00\%$  e  $11,0 \pm 2,65\%$  e em 72 h (Figura 19 – c) com valores a partir de  $2,00 \pm 1,00\%$  e  $7,00 \pm 2,65\%$ .

Nenhuma estirpe apresentou produção de sideróforos nos ensaios realizados.

Figura 19 - Índices de emulsificação e estabilidade da coluna de emulsão obtidos das estirpes.



Fonte: Dados da pesquisa. Representação gráfica dos resultados obtidos relativos ao índice de emulsificação e estabilidade da coluna de emulsão promovida pelas estirpes. **(a)** Índice de emulsificação em 24h; **(b)** Índice de estabilização em 48h e **(c)** em 72h. As barras verticais representam a média e desvio padrão. CV = 33,79% para 24h; CV = 34,74% para 48h; CV = 32,39% para 72h. Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. (0,05).

## 7. DISCUSSÃO

A seleção de rizóbios é fundamental para maximizar a fixação biológica de nitrogênio, produtividade e qualidade do feijão-caupi. O primeiro *screening* foi essencial para avaliar inicialmente o desempenho simbiótico das estirpes em comparação com os controles, classificando-as em baixa e moderada eficiência simbiótica. No primeiro cultivo foi possível observar que os resultados de massa seca da parte aérea não diferiram estatisticamente entre os tratamentos (Figura 6 – a) e as estirpes com atividade moderada apresentaram valores entre 1,1 e 1,53 g. Marinho *et al.* (2017) obtiveram resultados semelhantes e as estirpes nativas utilizadas apresentaram valores de massa seca da parte aérea de 3 g por planta. Jesus (2018) constatou que o uso de estirpes nativas promove incrementos nos parâmetros associados ao crescimento e a produtividade do feijão-caupi. Com isso, a adoção de estirpes competitivas, eficientes e adaptadas ao local de cultivo resulta em maior ocupação nodular, crescimento das plantas e rendimento agrícola.

O segundo cultivo consecutivo (Figura 6 – b) apresentou um incremento de 132,7% na massa seca da parte aérea em comparação ao primeiro ensaio realizado. Enquanto no primeiro cultivo os maiores valores ficaram em torno de 1,5 g, no segundo, esse valor foi alcançado inclusive por estirpes consideradas menos eficientes no ciclo anterior. Além disso, cerca de 50% das estirpes classificadas com desempenho mediano no primeiro cultivo apresentaram um alto desempenho no segundo cultivo, sugerindo os efeitos acumulativos no solo, bem como uma interação mais favorável entre os microrganismos inoculados e o ambiente rizosférico, já parcialmente condicionado pelo cultivo anterior. De acordo com Yeremko *et al.* (2025), a adubação contínua é um fator crítico que determina a eficiência da simbiose leguminosa-rizóbio. Assim, os dados obtidos no segundo cultivo foram fundamentais para relacionar o alto desempenho simbiótico de determinadas estirpes à sua capacidade de persistência e adaptação em solos submetidos ao uso contínuo de insumos químicos e cultivo de feijão-caupi.

As dez estirpes selecionadas (L46, L76, L47, L82, L29, L77, L32, L39, L21 e L41) no primeiro *screening* foram avaliadas em solos diferentes. No solo oriundo dos campos experimentais do CNPAT em Pacajus, Ceará (Figura 7 – a), as estirpes L21, L47 e L76 promoveram acúmulo de até 4 g de biomassa seca aérea e 80 mg de N por planta, superando os controles, diferentemente no solo dos campos experimentais da UFC em Fortaleza, Ceará (Figura 7 – b) que os ganhos de biomassa foram menores, contudo, as estirpes L76, L41 e L47 excederam os valores em relação ao tratamento com fertilizante nitrogenado e o tratamento sem inoculação. Esses resultados destacam a importância da interação estirpe-solo, apesar das

condições diferentes de teores e atributos químicos dos solos, as três estirpes selecionadas se mantiveram constantes na promoção de crescimento do feijão-caupi. Segundo Amorim *et al.* (2022), a comunidade bacteriana presente nos nódulos de feijão-caupi tende a permanecer constante, mesmo com variações nas propriedades dos solos, indicando que o feijão-caupi seleciona os grupos bacterianos de interesse que irão colonizar os nódulos. Além disso, Rocha *et al.* (2020) relataram que variações de pH, textura, nutrientes ou contaminações não influenciam significativamente a diversidade bacteriana presente nos nódulos, sugerindo que o feijão-caupi regula ativamente a composição da comunidade bacteriana dentro dos nódulos e realiza a proteção desses microrganismos contra os estresses. Com isso, podemos associar o desempenho contínuo dessas estirpes a persistência, adaptação, competitividade e a relação simbiótica estável e funcional com feijão-caupi.

Ademais, características como alta fertilidade e pH neutro proporcionam condições ideais para o desenvolvimento dos rizóbios, parâmetros encontrados no solo da UFC, além disso, o solo apresenta histórico de cultivo de feijão-caupi. Com isso, esse solo apresentou valores de massa seca de nódulos maiores, porém com resultados de MSPA reduzidos, esse fator pode ser associado a competitividade com a população nativa de rizóbios existentes nesses solos e a promiscuidade do feijão-caupi com os rizóbios, influenciando o processo de FBN de estirpes eficientes e reduzindo o acúmulo de nitrogênio e a biomassa da parte aérea (MBAH *et al.*, 2022).

Outro fator que pode estar associado à redução nos valores MSPA é a elevada disponibilidade de nutrientes no solo, a qual leva a planta a optar por vias metabólicas menos dispendiosas do que a FBN para obtenção de nutrientes. Em solos com presença de compostos nitrogenados residuais, a planta tende a absorver diretamente o nitrogênio disponível, visto que esse processo demanda menos energia em comparação à simbiose com rizóbios (ROMANYÀ; CASALS, 2020). Esse comportamento foi evidenciado no tratamento controle (Control), que apresentou maior MSN no solo do CNPAT (Figura 7 – a), indicando o estabelecimento da simbiose para suprimento de N. Em contrapartida, no solo da UFC (Figura 7 – b), o mesmo tratamento apresentou menor nodulação e redução na MSPA, refletindo a menor dependência da associação simbiótica com rizóbios em solo mais fértil.

Resultados semelhantes foram observados por Hinson e Adams (2020) com feijão-guar, onde, em solos de baixa fertilidade, houve maior formação de nódulos no tratamento controle absoluto, sugerindo maior demanda por FBN. Por outro lado, em solos mais férteis, a nodulação foi reduzida, possivelmente pela presença de N disponível que suprime ou inibe o processo simbiótico, impactando negativamente o crescimento da parte aérea. Assim, a baixa fertilidade

do solo do CNPAT favoreceu o estabelecimento da simbiose com estirpes eficientes, já que, em ambientes com limitação nutricional, a planta depende mais intensamente da FBN. Por sua vez, o solo da UFC, com maior fertilidade, permitiu avaliar a competitividade e persistência das estirpes selecionadas, mesmo na presença de nitrogênio residual.

A análise do sequenciamento do genoma das três estirpes selecionadas (L41, L47 e L76) permitiu identificar esses rizóbios pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* sp. a partir da análise de ANI (*Average Nucleotide Identity*), esse gênero é amplamente identificado em associação com feijão-caupi. Em nosso estudo, as três estirpes apresentaram 99,9% de identidade ANI (Figura 8) entre si, porém quando comparadas aos genomas de referência das outras sete espécies, apresentam entre 81,93% e 83,45% de identidade ANI. Cabral Michel *et al.* (2021) revelaram uma espécie nova, conhecida por *B. campsiandrae*, por meio da análise ANI e a comparação com as espécies de referência apresentaram valores menores que 90% de identidade. Klepa *et al.* (2022) relataram quatro novas espécies utilizando o ANI como uma das ferramentas de identificação taxonômica com corte em 96% de identidade, sendo essas espécies a *B. cenepequi*, *B. semiaridum*, *B. hereditatis* e *B. australafghanum*. A partir disso, a análise de ANI permite uma distinção mais precisa entre as espécies com base na similaridade genômica, evidenciando a diversidade das estirpes isoladas a partir de diferentes tipos de solo.

O experimento de coinoculação com a estirpe de *Bradyrhizobium* sp. (L47) e actinobactérias (Gráfico 1) promoveu incremento nas características analisadas do feijão-caupi, os valores de MSPA e de MSN aumentaram 143,25% e 169,7%, respectivamente, comparados aos resultados obtidos nos experimentos de screening dos rizóbios com a inoculação simples (Figura 7 – a). Os consórcios bacterianos com a estirpe de rizóbio L47 e as actinobactérias SN16, SN23, SN31 e SN36 apresentaram os maiores valores de MSR, MSPA e MSN superando o controle com fertilizante nitrogenado em relação a massa seca da parte aérea, além de apresentarem valores superiores a inoculação simples em 97,3%, 10,6% e 1,2%, respectivamente. Xu *et al.* (2022) relataram que a coinoculação de actinobactérias e rizóbios em grão-de-bico promoveram incrementos na massa seca da parte aérea de 60% a 234%, da raiz de 69% a 209% e dos nódulos de 69% a 209% em comparação com os tratamentos somente com rizóbios. Le, Ballard e Franco (2016) constataram que a coinoculação de estirpes de *Streptomyces* spp. e rizóbios em alfafa promovem aumentos na MSPA em 46% e na MSN em 75%. Com isso, podemos observar benefícios consistentes na melhoria do crescimento e nodulação das plantas quando coinoculadas com rizóbios e actinobactérias. Apesar dos poucos estudos voltados para coinoculação dessas bactérias para o feijão-caupi, essa pesquisa demonstrou os benefícios no uso dessas estirpes para promoção de crescimento vegetal.

Outra bactéria conhecida também por suas atividades como promotora de crescimento de plantas é do gênero *Bacillus*. Esse trabalho analisou os mecanismos de ação e o desempenho dessas bactérias em consórcios com a estirpe de *Bradyrhizobium* sp. (L47) para o feijão-caupi. Os valores obtidos de MSPA e MSN (Gráfico 2) aumentaram 205,4% e 248,5%, respectivamente, comparado ao experimento de seleção dos rizóbios (Figura 7 – a). Em comparação a coinoculação com as actinobactérias, as estirpes do gênero *Bacillus* promoveram incremento de 25,5%, 29,2% e 22,9% de MSPA, MSN e MSR, respectivamente. Além disso, os quatro consórcios bacterianos (L47xLPPC282, L47xLPPC138, L47xLPPC259 e L47xBR10788) apresentaram incrementos de MSPA, MSR e MSN em até 24%, 84% e 20,0%, respectivamente, em relação a inoculação simples (L47). Abdel-Fattah, El-Nahrawy e El-Mansoury (2020) encontram resultados similares, os tratamentos de coinoculação de *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. apresentaram incrementos em 27% na massa seca da parte aérea e em 28% dos nódulos em comparação com a inoculação simples do rizório em feijão-caupi. Nevhulaudzi, Kanu e Ntushelo (2020) demonstram o potencial da coinoculação de rizóbios e *B. subtilis* com aumentos nos parâmetros de biomassa seca da parte aérea em até 73,5% e das raízes em até 261% quando utilizado o consórcio bacteriano em diferentes variedades de feijão-caupi. Os resultados obtidos nesses trabalhos constatam o alto potencial de promoção de crescimento dessas bactérias e seu alto desempenho quando coinoculadas com rizório em feijão-caupi.

Em relação aos mecanismos de promoção de crescimento, as estirpes de *Bradyrhizobium* sp. apresentaram produção de ácido indolacético, solubilização de P e alta atividade biossurfactante. Nesse estudo, foi observado uma produção de 9,41 a 10,8 µg mL<sup>-1</sup> de AIA pelas estirpes de rizóbios (Gráfico 3). Dong *et al.* (2017) encontraram estirpes de *Bradyrhizobium* sp. produzindo entre 3 a 15 µg mL<sup>-1</sup> de ácido indolacético, intervalo semelhante encontrado nesse estudo. Contudo, Torres *et al.* (2021) relataram uma estirpe de *B. japonicum* (E109) que não produz AIA, mesmo com a otimização dos parâmetros de crescimento da bactéria e quantificação em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Com isso, podemos verificar a ampla variedade no desempenho das estirpes de rizóbios para produção de AIA e como podem ser influenciadas por condições de crescimento, região de origem e método utilizado para quantificação.

Ademais, outro mecanismo evidenciado no estudo foi a solubilização de fósforo insolúvel (Figura 13 – a), apenas uma estirpe de *Bradyrhizobium* sp. apresentou esse mecanismo de ação *in vitro*. O desempenho dessas bactérias permite as plantas terem acesso a fração do P inorgânico do solo e aumentam a eficiência no uso de fertilizantes, promovendo

crescimento e desenvolvimento vegetal. Boiero *et al.* (2007) avaliaram o desempenho de três estirpes de *B. japonicum* para solubilização de fósforo, nenhuma estirpe apresentou atividade. Entretanto, Kumar *et al.* (2021) encontraram índices de solubilização de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. isoladas do feijão-guandu variando entre 2,1 e 3,4. Os resultados destacam a importância dos testes bioquímicos na avaliação dos mecanismos de promoção de crescimento vegetal, considerando a ampla variação funcional observada entre as estirpes.

O teste para produção de biossurfactantes demonstrou que as estirpes de *Bradyrhizobium* sp. apresentaram os maiores desempenhos para emulsificação de óleos e no colapso da gota (Figura 16). Os rizóbios são grandes produtores de exopolissacarídeos (EPS) que apresentam um papel significativo na colonização bacteriana, na formação de nódulos e na manutenção da simbiose leguminosa-rizóbio (TEWARI; POONIYA; SHARMA, 2020). Os EPS apresentam propriedades emulsificantes e atuam como bioemulsificantes, com isso, podem ser associados ao sucesso na formação da coluna de emulsão e a sua estabilidade por 72 h. Diversos trabalhos abordam o uso de EPS na formulação de inoculantes, a utilização desses compostos aumentam a sobrevivência e a eficiência simbiótica de estirpes de rizóbios, como testado para o feijão-caupi (FARIAS *et al.*, 2022). Esses EPS produzidos por rizóbios fornecem monômeros de açúcar específicos, estabilidade térmica, viscosidade e capacidade de retenção de água que favorecem as bactérias diazotróficas, as plantas associadas e promove a saúde e melhoria do solo.

As estirpes de actinobactérias foram avaliadas quanto aos mecanismos de promoção de crescimento vegetal exercidos. Previamente, as estirpes de actinobactérias foram descritas como produtoras de enzimas hidrolíticas como amilase, celulase, lipase, pectinase, protease e xilanase e enzimas oxidorredutase como a lacase (MATOS NETO, 2022), ressaltando seu interesse na promoção de crescimento. Adicionalmente, neste trabalho foi observado que essas bactérias apresentam outros mecanismos de promoção de crescimento como produção de ácido indolacético, solubilização e mineralização de fósforo e produção de biossurfactantes. Esse é o primeiro estudo realizado, até o momento, com actinobactérias oriundas do semiárido nordestino brasileiro em ensaios bioquímicos para produção de fitohormônios, facilitação de nutrientes e produção de compostos ativos como surfactantes.

A síntese de ácido indolacético por bactérias promotoras de crescimento vegetal contribui para modificações no desenvolvimento radicular, por meio da ação sinérgica entre auxinas exógenas e endógenas. O AIA bacteriano é considerado um dos principais responsáveis pela promoção do crescimento das plantas (TIMOFEEVA; GALYAMOVA; SEDYKH, 2022), o que pode ser observado no aumento da massa seca das raízes nos experimentos de

coinoculação. Os valores obtidos das actinobactérias para produção de AIA são semelhantes aos obtidos por Giassi, Kiritani e Kupper (2016) em estudos realizados para obtenção de BPCV para produção de frutas cítricas. Esses autores obtiveram resultados de 10,59 µg mL<sup>-1</sup> a 21,07 µg mL<sup>-1</sup> de AIA produzido por actinobactérias, nesse estudo, todos os valores foram superiores a 11,76 µg mL<sup>-1</sup> de AIA. No entanto, Alimuddin *et al.* (2021) encontraram valores de 17 a 87 µg mL<sup>-1</sup> de AIA produzido por estirpes de actinobactéria quando realizado a otimização de crescimento para aumentos na produção desse fitohormônio, demonstrando o grande potencial de actinobactérias para síntese de ácido indolacético.

Além disso, os valores obtidos para solubilização de fósforo no estudo de Giassi, Kiritani e Kupper (2016) foram semelhantes aos observados para as estirpes de actinobactérias avaliadas neste trabalho, demonstrando baixa capacidade de solubilização a partir da fonte inorgânica de fósforo utilizada. Diferentemente, Boubekri *et al.* (2021) avaliaram estirpes de *Streptomyces* spp. e *Nocardiopsis* spp. oriundas de solos desérticos e obtiveram índices de solubilização entre 2,14 e 3,17, classificando as estirpes com moderada e alta atividade solubilizadora. Tais avaliações demonstram a variação nas atividades das estirpes e são fundamentais para compreender os mecanismos empregados de forma conjunta pelas bactérias na promoção de benefícios ao desenvolvimento e crescimento do feijão-caupi.

Adicionalmente, sabe-se que compostos orgânicos de fósforo, como fitato, ácidos nucleicos e fosfolipídios, constituem uma porção significativa do fósforo do solo, esse P orgânico é mineralizado por enzimas, como fosfatases e fitases que são secretadas por bactérias mineralizadoras de P (TIMOFEEVA; GALYAMOVA; SEDYKH, 2022). As actinobactérias testadas nesse trabalho apresentaram moderada e baixa mineralização utilizando como fonte de P a lecitina de soja. Oliveira *et al.* (2009) encontraram estirpes de actinobactérias com alta atividade da fosfatase ácida na mineralização de lecitina de soja e atividade das fitases na mineralização de fitato, demonstrando o grande potencial dessas bactérias na promoção de crescimento vegetal, apesar de poucos estudos voltados para análise da mineralização de P por actinobactérias.

Para produção de biossurfactantes, as actinobactérias apresentaram uma moderada atividade na produção desses metabólitos secundários com propriedades tensoativas. Essas bactérias são produtoras de uma grande variedade de biossurfactantes que podem ser do tipo de glicolipídios, lipopeptídeos e outros poliméricos, com aplicação biotecnológica promissora para biorremediação e medicina. Os principais gêneros de actinobactérias produtores são *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium* e *Brevibacterium* (KÜGLER *et al.*, 2015). O uso desses compostos na agricultura está voltado para recuperação de solos

contaminados, aumento na solubilidade de metais e micronutrientes nos solos, tornando-os mais acessíveis para as plantas e na supressão de patógenos de plantas, além disso, o desenvolvimento contínuo e a otimização de sua produção e aplicação são essenciais para sua viabilidade comercial e adoção em larga escala para promoção de agricultura mais sustentável (DATTA *et al.*, 2024).

Em relação aos métodos de promoção de crescimento vegetal promovidos por bactérias do gênero *Bacillus*, foi possível observar neste estudo que essas BPCV apresentaram elevados valores de produção de ácido indolacético, destacando-se entre os microrganismos testados como os mais eficientes na síntese desse fitohormônio. Os valores obtidos para essas estirpes foram entre 20,29 e 46,06  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , em trabalhos desenvolvidos por Costa *et al.* (2016) as estirpes de *Bacillus* spp. oriundas de Bom Jesus, Piauí para inoculação em feijão-caupi obtiveram produção de AIA entre 5,94 e 11,82  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Liu *et al.* (2023) relataram uma estirpe de *B. cereus* com produção de 39,36  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de ácido indolacético. A partir desses resultados, podemos verificar o potencial das estirpes de *Bacillus* spp. avaliadas nesse trabalho para síntese de ácido indolacético e promoção de crescimento vegetal.

Para o mecanismo de solubilização de fósforo, os índices obtidos neste estudo variaram entre 1,08 e 1,16. Costa et al. (2016) relataram valores ligeiramente superiores, entre 1,18 e 1,24, embora todas as estirpes tenham sido igualmente classificadas com baixa capacidade de solubilização de fosfato de cálcio. Por sua vez, Wagi e Ahmed (2019) observaram índices ainda mais elevados, entre 1,24 e 1,31, evidenciando o potencial de estirpes de *Bacillus* spp. na produção de ácidos orgânicos que favorecem a liberação de fósforo no meio. A mineralização de fontes orgânicas de fósforo em placa de Petri foi observada em apenas uma estirpe do gênero *Bacillus*, no entanto, essa atividade não foi detectada no teste colorimétrico com reagente de ácido ascórbico para liberação de P solúvel. Esses resultados contrastam com os de Li *et al.* (2022), que relataram estirpes de *Bacillus* spp. com capacidade de mineralizar lecitina, apresentando índices de mineralização entre 1,1 e 4,5. Esses dados ressaltam a variabilidade funcional entre as estirpes e a importância de métodos complementares para avaliação da atividade de mineralização.

Ademais, as estirpes do gênero *Bacillus* avaliadas neste estudo apresentaram atividade moderada nos testes qualitativos para produção de biossurfactantes. Embora *Bacillus* spp. sejam amplamente descritos como produtores desses compostos tensoativos, os resultados obtidos contrastam com os de Marchut-Mikołajczyk *et al.* (2021), que relataram elevada produção de biossurfactante do tipo glicolipídio pela estirpe *B. pumilus* 2A, com termoestabilidade e efeito promotor de crescimento em feijão-comum. De forma semelhante, Brinda, Ragunathan e

Johney (2024) descreveram a produção de surfactina por *B. amyloliquefaciens*, associada à promoção de crescimento em feijão-mungo. Já Moro *et al.* (2018) identificaram estirpes de *Bacillus* spp. com alta e moderada atividade nos testes de colapso da gota e dispersão em óleo, além de índices de emulsificação (E24h) entre 36,1% e 80,5%. Esses dados reforçam o interesse crescente na identificação de estirpes produtoras de biossurfactantes, dada sua aplicação potencial na promoção do crescimento vegetal.

Por fim, as funções de promoção de crescimento, controle biológico e biorremediação também são desempenhadas pela produção de sideróforos. Nenhuma bactéria nesse estudo apresentou produção de sideróforos *in vitro*, no entanto, o gênero *Streptomyces* spp. de actinobactérias são relatadas como produtoras de sideróforos do tipo catecolato e hidroxamato (INSUK *et al.*, 2021) e as bactérias do gênero *Bacillus* são amplamente estudadas devido a sua produção de bacilibactina, especialmente o gênero *B. subtilis*, um sideróforo natural com alta afinidade pelo íon ferro com grande potencial para agricultura que resultam em incrementos no crescimento das plantas (NITHYAPRIYA *et al.*, 2021). As estirpes de *Bradyrhizobium* spp. variam na produção de sideróforos, sendo o citrato o principal sideróforos produzindo e identificado desses rizóbios (GUERINOT; MEIDL; PLESSNER, 1990). Contudo, grande parte das espécies, como *B. japonicum*, utilizam sideróforos produzidos por outros microrganismos, incluindo aqueles do tipo catecolato (como enterobactina) e do tipo hidroxamato (como ferrioxamina B e ferricromo). Essa adaptação é crucial para sua sobrevivência e crescimento em vários ambientes (ONG; O'BRIAN, 2023).

## 8. CONCLUSÃO

Diante dos objetivos propostos, foram selecionadas três estirpes de *Bradyrhizobium* sp. eficientes para o feijão-caupi, com desempenho simbiótico em dois solos distintos e ação promotora de crescimento por meio da FBN, solubilização de fósforo, produção de AIA e biossurfactantes. O estudo voltado para formulação de um consórcio bacteriano para a cultura do feijão-caupi permitiu avaliar estirpes de actinobactérias e do gênero *Bacillus* isoladas de solos nordestinos. Os resultados obtidos neste trabalho permitiram selecionar oito consórcios promissores, sendo quatro com actinobactérias (L47xSN31, L47xSN36, L47xSN16 e L47xSN23) e quatro com *Bacillus* spp. (L47xLPPC282, L47xLPPC138, L47xLPPC259 e L47xBR10788), demonstrando o potencial das estirpes na promoção do crescimento vegetal em relação aos tratamentos não inoculados. Além disso, as estirpes apresentaram mecanismos de ação para solubilização e mineralização de fósforo, produção de AIA e biossurfactantes. Com isso, o estudo permitiu selecionar bactérias promotoras de crescimento vegetal para a cultura do feijão-caupi e destacar o potencial de estirpes nativas dos solos nordestinos no uso de inoculantes e na formulação de consórcios bacterianos. Por fim, a validação da eficiência das estirpes selecionados em condições esterilizadas e de campo são necessárias para estabelecimento dos inoculantes e dos consórcios bacterianos para o feijão-caupi, além de análises moleculares com estudo da proteômica e metabolômica para elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na promoção de crescimento vegetal. O desenvolvimento de formulações comerciais a partir dessas estirpes poderá contribuir significativamente para a sustentabilidade e produtividade da cultura do feijão-caupi.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-FATTAH, M.; EL-NAHRAWY, S.; EL-MANSOURY, M. Interaction effect of skipping irrigation and co-inoculation with *Bradyrhizobium* and some strains of *Bacillus* bacteria on growth dynamics of cowpea (*Vigna unguiculata* L.), its yield and water productivity. **Egyptian Journal of Soil Science**, v. 60, n. 1, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.21608/ejss.2020.24792.1344>. Acesso em: 5 jun. 2025.
- AFFRIFAH, N.; PHILLIPS, R.; SAALIA, F. Cowpeas: Nutritional profile, processing methods and products—A review. **Legume Science**, v. 4, n. 3, e131, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/leg3.131>. Acesso em: 15 jan. 2025.
- ALMEIDA, J. *et al.* *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9, a tropical plant growth-promoting rhizobacterium, colonizes maize endophytically and alters the plant's production of volatile organic compounds during co-inoculation with *Azospirillum brasiliense* Ab-V5. **Environmental Microbiology Reports**, v. 13, n. 6, p. 885-895, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1758-2229.13004>. Acesso em: 24 fev. 2025.
- ALIMUDDIN, A. *et al.* Diversity of endophytic *actinomycetes* producing indole-3-acetic acid and *in vitro* evaluation of plant growth-promoting activity on *Brassica oleracea* L. **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science**, v. 44, n. 2, p., 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.47836/pjtas.44.2.02>. Acesso em: 24 jul. 2025.
- AMORIM, M. *et al.* Cowpea nodules host a similar bacterial community regardless of soil properties. **Applied Soil Ecology**, v. 172, 104354, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104354>. Acesso em: 5 jun. 2025.
- ANA. Monitor de Secas. **Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico**, 2024. Disponível em: <https://monitordesecas.ana.gov.br/mapa?mes=12&ano=2024>. Acesso em: 14 dez. 2024.
- ANDRADE JÚNIOR, A. *et al.* Cultivo do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). **Teresina: Embrapa Meio-Norte**, 2002. 108 p. (Embrapa Meio-Norte. Sistemas de Produção, 2). Acesso em: 22 dez. 2024.
- ANDRADE SANTOS, A. *et al.* Changes induced by co-inoculation in nitrogen–carbon metabolism in cowpea under salinity stress. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 685-694, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.01.007>. Acesso em: 24 jan. 2025.
- ARAUJO, A. *et al.* Caatinga Microbiome Initiative: disentangling the soil microbiome across areas under desertification and restoration in the Brazilian drylands. **Restoration Ecology**, v. 33, e14298, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/rec.14298>. Acesso em: 20 jan. 2025.

- AZANI, N. *et al.* A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny: *The Legume Phylogeny Working Group* (LPWG). **TAXON**, v. 66, p. 44-77, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.12705/661.3>. Acesso em: 28 nov. 2024.
- BARKA, E. *et al.* Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, p. 1-43, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15>. Acesso em: 20 dez. 2024.
- BOIERO, L. *et al.* Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, p. 874–880, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0731-9>. Acesso em: 6 jun. 2025.
- BOYD, E.; HAMILTON, T.; PETERS, J. An alternative path for the evolution of biological nitrogen fixation. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 205, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00205>. Acesso em: 20 jan. 2025.
- BOYD, E.; PETERS, J. New insights into the evolutionary history of biological nitrogen fixation. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 201, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00201>. Acesso em: 20 jan. 2025.
- BRAGA, C. **Caracterização morfoagronômica, fenológica e viabilidade polínica de genótipos de feijão**. 2020. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade do Estado de Mato Grosso, Alta Floresta, 2020. Disponível em: [https://portal.unemat.br/media/files/Dissertação\\_Catiane.pdf](https://portal.unemat.br/media/files/Dissertação_Catiane.pdf). Acesso em: 20 jan. 2024.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa n.º 13, de 24 de maio de 2011**. Dispõe sobre as normas sobre especificações dos inoculantes destinados à agricultura, bem como as relações dos micro-organismos autorizados e recomendados para produção de inoculantes no Brasil. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, 25 maio 2011. Disponível em: <https://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=recuperarTextoAtoTematicaPortal&codigoTematica=1229256>. Acesso em: 24 mar. 2025.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia alimentar para a população brasileira**. Brasília: MS, 2014. Disponível em: [https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-brasil/publicacoes-para-promocao-a-saude/guia\\_alimentar\\_populacao\\_brasileira\\_2ed.pdf/view](https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-brasil/publicacoes-para-promocao-a-saude/guia_alimentar_populacao_brasileira_2ed.pdf/view). Acesso em: 26 nov. 2024.
- BRASIL. Secretaria de Assuntos Estratégicos. **Estudo estratégico: fertilizantes**. Brasília: Presidência da República, 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/planalto/pt-br/estudos-e-relatorios/estudo-strategico-fertilizantes>

- br/assuntos/assuntos-estrategicos/documentos/estudos-estrategicos/sae\_publicacao\_fertilizantes\_v10.pdf . Acesso em: 28 dez. 2024.
- BRINDA, C.; RAGUNATHAN, R.; JOHNEY, J. Biosurfactant production by *Bacillus amyloliquefaciens*, characterization and its potential applications. **Journal of Environmental Biology**, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.22438/jeb/45/3/mrn-5202>. Acesso em: 6 jun. 2025.
- BRITO, M.; MURAOKA, T.; SILVA, E. Marcha de absorção do nitrogênio do solo, do fertilizante e da fixação simbiótica em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) walp.) e feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) determinada com uso de  $^{15}\text{N}$ . **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 4, p. 895–905, jul. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-06832009000400014> . Acesso em: 22 dez. 2024.
- BOUBEKRI, K. *et al.* The screening of potassium- and phosphate-solubilizing actinobacteria and the assessment of their ability to promote wheat growth parameters. **Microorganisms**, v. 9, n. 3, p. 470, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030470>. Acesso em: 24 jul. 2025.
- CABRAL MICHEL, D. *et al.* *Bradyrhizobium campsiandrae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterial strain isolated from a native leguminous tree from the Amazon adapted to flooded conditions. **Archives of Microbiology**, v. 203, p. 233–240, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02022-7>. Acesso em: 6 jun. 2025.
- CARDOSO, E.; ANDREOTE, F. **Microbiologia do Solo**. 2. ed. Piracicaba: ESALQ/USP, 2016.
- COMPANT, S. *et al.* Harnessing the plant microbiome for sustainable crop production. **Nature Reviews Microbiology**, v. 23, p. 9–23, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41579-024-01079-1> . Acesso em: 20 nov. 2024.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Safras: Grãos**. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos> . Acesso em: 14 dez. 2024.
- COSTA, E. *et al.* Bacterial strains from floodplain soils perform different plant-growth promoting processes and enhance cowpea growth. **Scientia Agricola**, v. 73, p. 301-310, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0294> . Acesso em: 24 fev. 2025.
- CROPLIFE BRASIL. **Mercado de bioinsumos cresceu 15% na safra 2023/2024**. 2024. Disponível em: <https://croplifebrasil.org/mercado-de-bioinsumos-cresceu-15-na-safra-2023-2024/>. Acesso em: 20 jan. 2025.

- CRUZ, D. *et al.* Selection of cowpea lines for multiple traits by GYT biplot analysis. **Journal of Animal Science**, v. 8, p. 124-137, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.5296/jas.v8i2.16003>. Acesso em: 24 mar. 2025.
- DA SILVA MEDINA, G.; ROTONDO, R.; RODRÍGUEZ, G. Innovations in agricultural bio-inputs: commercial products developed in Argentina and Brazil. **Sustainability**, v. 16, n. 7, p. 2763, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/su16072763>. Acesso em: 22 fev. 2025.
- DATTA, D. *et al.* Microbial biosurfactants: Multifarious applications in sustainable agriculture. **Microbiological Research**, v. 279, p. 127551, fev. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127551>. Acesso em: 6 jun. 2025.
- DE SOUSA, J. *et al.* *In vitro* coinoculation between actinobacteria and diazotrophic nodulating bacteria from the semiarid. **Revista de Gestão Social e Ambiental**, São Paulo, v. 17, n. 9, 2023. Disponível em: <https://rgsa.openaccesspublications.org/rgsa/article/view/4177>. Acesso em: 10 mar. 2025.
- DE SOUSA, W. *et al.* Resposta do feijão-caupi à inoculação de *Bradyrhizobium japonicum*, adubação nitrogenada e nitrogênio do solo. **Revista Agroecossistemas**, v. 10, n. 2, p. 298-308, nov. 2018. ISSN 2318-0188. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.18542/ragros.v10i2.5167>. Acesso em: 21 fev. 2025.
- DELGADO-BAQUERIZO, M. Simplifying the complexity of the soil microbiome to guide the development of next-generation SynComs. **Journal of Sustainable Agriculture and Environment**, v. 1, p. 9–15, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/sae2.12012>. Acesso em: 20 jan. 2025.
- DIAZ-GARZA, A. *et al.* Temporal dynamics of rhizobacteria found in Pequin pepper, soybean, and orange trees growing in a semi-arid ecosystem. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 4, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.602283>. Acesso em: 24 fev. 2025.
- DONG, R. *et al.* High salt tolerance of a *Bradyrhizobium* strain and its promotion of the growth of *Stylosanthes guianensis*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 8, p. 1625, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms18081625>. Acesso em: 6 jun. 2025.
- DOYLE, J. Phylogenetic perspectives on the origins of nodulation. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 11, p. 1289-1295, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-11-0114>. Acesso em: 20 dez. 2024.
- EL-NAHRAWY, S.; ELHAWAT, N.; ALSHAAL, T. Biochemical traits of *Bacillus subtilis* MF497446: Its implications on the development of cowpea under cadmium stress and ensuring

- food safety. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 180, p. 384-395, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.04.088>. Acesso em: 24 fev. 2025.
- EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. Dados conjunturais da produção de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e feijão-caipi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) no Brasil (1985 a 2023): área, produção e rendimento. Santo Antônio de Goiás: **Embrapa Arroz e Feijão**, 2024. Disponível em: <http://www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/index.htm>. Acesso em: 22 fev. 2025.
- FANAI, A. *et al.* Plant growth promoting bacteria (PGPB)-induced plant adaptations to stresses: an updated review. **PeerJ**, v. 12, e17882, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.7717/peerj.17882>. Acesso em: 10 jun. 2025.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FAOSTAT: Statistical database**. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>. Acesso em: 14 dez. 2024.
- FAO. *et al.* **O Estado da Segurança Alimentar e da Nutrição no Mundo – SOFI 2024**. Organização das Nações Unidas, 24 jul. 2024. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/274884-onu-niveis-de-fome-seguem-persistentemente-altos-por-três-anos-consecutivos-enquanto-crises#:~:text=A%20falta%20de%20acesso%20econômico,uma%20dieta%20saudável%20em%202022>. Acesso em: 01 mar. 2025.
- FARIAS, T.; SOARES, B.; D'ECA, C. S. *et al.* Polymeric formulations of liquid inoculants with rhizobia exopolysaccharides increase the survival and symbiotic efficiency of elite *Bradyrhizobium* strains. **Archives of Microbiology**, v. 204, p. 177, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02779-z>. Acesso em: 6 jun. 2025.
- FEENEY, M. *et al.* ActinoBase: tools and protocols for researchers working on *Streptomyces* and other filamentous actinobacteria. **Microbial Genomics**, v. 8, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000824>. Acesso em: 20 dez. 2024.
- GALDIANO JÚNIOR, R. *et al.* Auxin-producing bacteria isolated from the roots of *Cattleya walkeriana*, an endangered Brazilian orchid, and their role in acclimatization. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, n. 3, p. 729-737, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-06832011000300008>. Acesso em: 15 dez. 2024.
- GIASSI, V.; KIRITANI, C.; KUPPER, K. Bacteria as growth-promoting agents for citrus rootstocks. **Microbiological Research**, v. 190, p. 46–54, set. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.12.006>. Acesso em: 25 jun. 2025.
- GUIMARÃES, A. *et al.* High diversity of *Bradyrhizobium* strains isolated from several legume species and land uses in Brazilian tropical ecosystems. **Systematic and Applied Microbiology**,

- v. 38, n. 6, p. 433-441, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.06.006>. Acesso em: 21 fev. 2025.
- GUERINOT, M.; MEIDL, E.; PLESSNER, O. Citrate as a siderophore in *Bradyrhizobium japonicum*. **Journal of Bacteriology**, v. 172, p. 3298–3303, 1990. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jb.172.6.3298-3303.1990>. Acesso em: 6 jun. 2025.
- HANSEN, A. *et al.* Rhizobium Biology and Biotechnology. **Cham: Springer**, 2017. v. 50. DOI: 10.1007/978-3-319-64982-5. ISBN 978-3-319-64981-8. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-64982-5>. Acesso em: 20 nov. 2024.
- HASHEM, A.; TABASSUM, B.; ABD\_ALLAH, E. *Bacillus subtilis*: a plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, p. 1291-1297, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.05.004>. Acesso em: 24 fev. 2025.
- HINSON, P.; ADAMS, C. Quantifying tradeoffs in nodulation and plant productivity with nitrogen in guar. **Industrial Crops and Products**, v. 153, p. 112617, 1 out. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112617>. Acesso em: 23 jul. 2025.
- IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Com alta de 10,2%, safra de 2025 deve chegar a 322,6 milhões de toneladas. **Agência de Notícias IBGE**, 2024. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/42440-com-alta-de-10-2-safra-de-2025-deve-chegar-a-322-6-milhoes-de-toneladas>. Acesso em: 22 dez. 2024.
- IBGE – Instituto brasileiro de geografia e estatística. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA)**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201-levantamento-sistematico-da-producao-agricola.html>. Acesso em: 22 dez. 2024.
- IBGE – Instituto brasileiro de geografia e estatística. Semiárido Brasileiro. **Estrutura territorial**, 2022. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/geociencias/organizacao-do-territorio/estrutura-territorial/15974-semiarido-brasileiro.html?=&t=o-que-e>. Acesso em: 20 dez. 2024.
- IBRAFE – Instituto Brasileiro do Feijão e Pulses. **Demand global por leguminosas cresce impulsionada por fatores econômicos e sustentáveis**. Disponível em: <https://www.ibrafe.org/noticias/demand-global-por-legum>. Acesso em: 22 jan. 2025.
- INSA – Instituto Nacional do Semiárido. **Semiárido Brasileiro**. Disponível em: <https://www.gov.br/insa/pt-br/semiarido>

- brasileiro#:~:text=O%20Semiárido%20Brasileiro%20se%20estende,semiáridos%20mais%20povoados%20do%20mundo . Acesso em: 14 dez. 2024.
- INSUK, C. *et al.* Taxonomic and metabolite diversities of moss-associated actinobacteria from Thailand. **Metabolites**, v. 12, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/metabo12010022>. Acesso em: 6 jun. 2025.
- JAISWAL, S.; MAREDI, M.; DAKORA, F. Rhizosphere P-enzyme activity, mineral nutrient concentrations, and microbial community structure are altered by intra-hole cropping of cowpea with cereals. **Frontiers in Agronomy**, v. 3, p. 666351, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fagro.2021.666351> . Acesso em: 20 fev. 2025.
- JAVED, Z. *et al.* Actinomycetes – The microbial machinery for the organic-cycling, plant growth, and sustainable soil health. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 31, 101893, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101893> . Acesso em: 20 jan. 2025.
- JESUS, Cristina Meira de. **Estirpes de rizóbio eficientes na promoção do desenvolvimento do feijão-caupi**. 2018. 143 f. Tese (Doutorado em Agronomia – Área de concentração Fitotecnia) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, 2018.
- KANNAN, K. *et al.* Control of *Fusarium* wilt disease in cowpea plant (*Vigna unguiculata* L.) using secondary metabolites produced in *Bradyrhizobium japonicum*. **Kongunadu Research Journal**, v. 6, n. 2, p. 28-36, 16 dez. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.26524/krj298> . Acesso em: 20 jan. 2025.
- KLEPA, M. *et al.* *Bradyrhizobium cenepequi* sp. nov., *Bradyrhizobium semiaridum* sp. nov., *Bradyrhizobium hereditatis* sp. nov. and *Bradyrhizobium australaficanum* sp. nov., symbionts of different leguminous plants of Western Australia and South Africa and definition of three novel symbiovars. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 72, n. 7, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005446>. Acesso em: 24 jul. 2025.
- KORIR, H.; MUNGAI, N.; WASIKE, V. Influence of native rhizobacteria co-inoculation and formulation of bacterial inoculants on the growth and yield of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Sustainable Agriculture and Environment**, 2024. <https://doi.org/10.1002/sae2.12095>. Acesso em: 14 mai. 2025.
- KOTHE, E. Special focus: Actinobacteria. **Journal of Basic Microbiology**, v. 58, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jobm.201870028> . Acesso em: 20 dez. 2024.
- KUDEYAROV, V. N. Nitrous oxide emission from fertilized soils: an analytical review. **Eurasian Soil Science**, v. 53, n. 10, p. 1396, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1134/S1064229320100105>. Acesso em: 20 nov. 2024.

- KÜGLER, J. *et al.* Surfactants tailored by the class Actinobacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00212>. Acesso em: 6 jun. 2025.
- KUMAR, S. *et al.* Evaluation of phosphate solubilizing ability of the bacterial strains isolated from root nodules of pigeon pea (*Cajanus cajan*). **Plant Archives**, v. 21, supl. 1, p. 1562–1566, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.51470/PLANTARCHIVES.2021.v21.S1.246>. Acesso em: 24 jul. 2025.
- LACERDA-JÚNIOR, G. *et al.* Land use and seasonal effects on the soil microbiome of a Brazilian dry forest. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00648>. Acesso em: 20 jan. 2025.
- LAU, E. *et al.* Plant growth-promoting bacteria as potential bio-inoculants and biocontrol agents to promote black pepper plant cultivation. **Microbiological Research**, v. 240, p. 126549, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126549>. Acesso em: 20 jan. 2025.
- LEBRAZI, S. *et al.* Screening and optimization of indole-3-acetic acid production by *Rhizobium* sp. strain using response surface methodology. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 18, p. 21, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00035-9>. Acesso em: 6 mai. 2025.
- LEITE, R. *et al.* Co-inoculation of soybean with *Bradyrhizobium* spp. and Amazonian strains of *Trichoderma asperellum* and *Bacillus amyloliquefaciens* increases the productivity and profitability of the crop. **Crop Science**, v. 63, n. 6, p. 1-15, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/csc2.21091>. Acesso em: 24 fev. 2025.
- LE, X.; BALLARD, R.; FRANCO, C. Effects of endophytic *Streptomyces* and mineral nitrogen on Lucerne (*Medicago sativa* L.) growth and its symbiosis with rhizobia. **Plant and Soil**, v. 405, p. 25–34, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2704-1>. Acesso em: 24 jul. 2025.
- LI, Q. *et al.* Morphological identification of Actinobacteria. In: DHANASEKARAN, D.; JIANG, Y. **Actinobacteria – Basics and Biotechnological Applications**. Londres: IntechOpen, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/61461>. Acesso em: 20 dez. 2024.
- LI, Y. *et al.* Diversity and phosphate solubilizing characteristics of cultivable organophosphorus-mineralizing bacteria in the sediments of Sancha Lake. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijerph19042320>. Acesso em: 24 jul. 2025.
- LIU, F. *et al.* Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on the physioecological characteristics and growth of walnut seedlings under drought stress. **Agronomy**, v. 13, n. 2, p.

- 290, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/agronomy13020290>. Acesso em: 24 jul. 2025.
- LIU, J. *et al.* The diversity and geographic distribution of cultivable *Bacillus*-like bacteria across black soils of Northeast China. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01424>. Acesso em: 24 mar. 2025.
- MARCHUT-MIKOŁAJCZYK, O. *et al.* Biosurfactant from endophytic *Bacillus pumilus* 2A: physicochemical characterization, production and optimization and potential for plant growth promotion. **Microbial Cell Factories**, v. 20, p. 40, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01533-2>. Acesso em: 10 jun. 2025.
- MARINHO, R. *et al.* Field performance of new cowpea cultivars inoculated with efficient nitrogen-fixing rhizobial strains in the Brazilian Semiarid. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, n. 5, p. 395–402, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2014000500009>. Acesso em: 20 fev. 2025.
- MARINHO, R. *et al.* Symbiotic and agronomic efficiency of new cowpea rhizobia from Brazilian Semi-Arid. **Bragantia**, v. 76, n. 2, p. 273–281, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4499.003>. Acesso em: 20 fev. 2025.
- MARTINS, L. *et al.* Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving yield in the Semi-Arid region of Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 38, n. 6, p. 333-339, 2003. DOI: 10.1007/s00374-003-0668-4. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/152219/1/Separata01302.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2025.
- MBAH, G. *et al.* Phylogenetic relationship, symbiotic effectiveness, and biochemical traits of native rhizobial symbionts of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) in South African soil. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 22, p. 2235–2254, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42729-022-00805-z>. Acesso em: 6 jun. 2025.
- MATOS, A. *et al.* Phosphate solubilization by endophytic bacteria isolated from banana trees. **Agrarian Sciences – An. Acad. Bras. Ciênc.**, v. 89, n. 4, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720160111>. Acesso em: 15 dez. 2024.
- MATOS NETO, João Moreira de. **Bioprospecção de enzimas de interesse biotecnológico a partir de actinobactérias isoladas do semiárido nordestino**. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Fortaleza, 2022.
- MEDEIROS, E. *et al.* Diversidade morfológica de rizóbios isolados de caupi cultivado em solos do Estado do Rio Grande do Norte. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 31, n. 3, p. 529-535, 23

jun. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v31i3.793>. Acesso em: 20 jan. 2024.

MELO, S.; ZILLI, J. Fixação biológica de nitrogênio em cultivares de feijão-caupi recomendadas para o Estado de Roraima. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 9, p. 1177–1183, set. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2009000900016>. Acesso em: 20 fev. 2025.

MINAXI, M. *et al.* Characterization of multifaceted *Bacillus sp.* RM-2 for its use as plant growth promoting bioinoculant for crops grown in semi-arid deserts. **Applied Soil Ecology**, v. 59, p. 124-135, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.APSoIL.2011.08.001>. Acesso em: 24 fev. 2025.

MORDOR INTELLIGENCE RESEARCH & ADVISORY. **Nitrogenous Fertilizer Market Size & Share Analysis – Growth Trends & Forecasts up to 2030**. Mordor Intelligence, jan. 2025. Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/nitrogenous-fertilizer-market>. Acesso em: 28 dez. 2024.

MOREIRA, F.; SIQUEIRA, J. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2006.

MORO, G. *et al.* Identification and ultra-high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry characterization of biosurfactants, including a new surfactin, isolated from oil-contaminated environments. **Microbial Biotechnology**, 14 maio 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13276>. Acesso em: 24 jul. 2025.

MUKHTAR, S. *et al.* Impact of soil salinity on the cowpea nodule-microbiome and the isolation of halotolerant PGPR strains to promote plant growth under salinity stress. **Phytobiomes Journal**, 31 ago. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-09-19-0057-R>. Acesso em: 20 fev. 2025.

NEVHULAUDZI, T.; KANU, S.; NTUSHELO, K. Interaction effect of *Bacillus subtilis* co-inoculation and mine water irrigation on cowpea's growth, physiology and nutritional quality. **Scientific African**, v. 9, e00541, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00541>. Acesso em: 24 jan. 2025.

NITHYAPRIYA, S. *et al.* Production, purification, and characterization of bacillibactin siderophore of *Bacillus subtilis* and its application for improvement in plant growth and oil content in sesame. **Sustainability**, v. 13, p. 5394, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/SU13105394>. Acesso em: 6 jun. 2025.

- OLANREWAJU, O.; GLICK, B.; BABALOLA, O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 197, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2364-9>. Acesso em: 24 fev. 2025.
- OLIVEIRA, C. *et al.* Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, n. 9, p. 1782-1787, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.01.012>. Acesso em: 15 dez. 2024.
- OLIVEIRA, E. *et al.* Isolation and characterization of biosurfactant-producing bacteria from Amapaense Amazon soils. **International Journal of Microbiology**, v. 2021, p. 1–11, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2021/9959550>. Acesso em: 15 dez. 2024.
- OLIVEIRA, I. *et al.* BRS Tumucumaque - cultivar de feijão-caupi com valor nutritivo para o Amazonas. Manaus: **Embrapa Amazônia Ocidental**, 2014. (Boletim técnico). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/996040/1/ComTec1062.pdf>. Acesso em: 20 dez. 2024.
- OLIVEIRA, P. *et al.* Agronomic performance of cowpea cultivars inoculated with rhizobia in the Brazilian semiarid region. **Revista Caatinga**, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1983-21252023v36n406rc>. Acesso em: 21 fev. 2025.
- ONG, A.; O'BRIAN, M. The *Bradyrhizobium japonicum* fsrB gene is essential for utilization of structurally diverse ferric siderophores to fulfill its nutritional iron requirement. **Molecular Microbiology**, v. 119, p. 340–349, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/mmi.15028>. Acesso em: 6 jun. 2025.
- OPAS. Números da fome permanecem altos por três anos consecutivos à medida que as crises globais se aprofundam, destaca relatório da ONU. **Organização Pan-Americana da Saúde**, 24 jul. 2024. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/24-7-2024-numeros-da-fome-permanecem-altos-por-tres-anos-consecutivos-medida-que-crises>. Acesso em: 22 dez. 2024.
- OREM, J. *et al.* Phylogenetic diversity of aerobic spore-forming *Bacillales* isolated from Brazilian soils. **International Microbiology**, v. 22, p. 511-520, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10123-019-00080-6>. Acesso em: 24 mar. 2025.
- PAN, L.; CAI, B. Phosphate-solubilizing bacteria: Advances in their physiology, molecular mechanisms and microbial community effects. **Microorganisms**, v. 11, n. 12, p. 2904, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11122904>. Acesso em: 10 jun. 2025.
- PARK, J. *et al.* Synergistic effect of co-inoculation with phosphate-solubilizing bacteria. **Korean Journal of Agricultural Science**, v. 43, p. 401–414, 2016. <https://doi.org/10.7744/KJOAS.20160043>. Acesso em: 10 jun. 2025.

PARTE, A. *et al.* List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, p. 5607-5612, 2020. DOI: 10.1099/ijsem.0.004332. Disponível em: <https://lpsn.dsmz.de>. Acesso em: 20 jan. 2025.

PHILIPPOT, L. *et al.* The interplay between microbial communities and soil properties. **Nature Reviews Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 226-239, abr. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00980-5>. Acesso em: 20 nov. 2024.

POOLE, P.; RAMACHANDRAN, V.; TERPOLILLI, J. Rhizobia: from saprophytes to endosymbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, p. 291–303, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.171>. Acesso em: 15 jan. 2025.

PRADO, D. *et al.* Screening of *Aspergillus*, *Bacillus* and *Trichoderma* strains and influence of substrates on auxin and phytases production through solid-state fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 19, p. 101165, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101165>. Acesso em: 14 dez. 2024.

PROVOROV, N.; ANDRONOV, E.; ONISHCHUK, O. Forms of natural selection controlling the genomic evolution in nodule bacteria. **Russian Journal of Genetics**, v. 53, p. 411–419, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1134/S1022795417040123>. Acesso em: 16 jan. 2025.

RADHAKRISHNAN, R.; HASHEM, A.; ABD\_ALLAH, E. *Bacillus*: a biological tool for crop improvement through bio-molecular changes in adverse environments. **Frontiers in Physiology**, v. 8, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00667>. Acesso em: 24 fev. 2025.

RAMÍREZ, V. *et al.* Chromium hyper-tolerant *Bacillus* sp. MH778713 assists phytoremediation of heavy metals by mesquite trees (*Prosopis laevigata*). **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01833>. Acesso em: 24 fev. 2025.

RÍOS-RUIZ, W. *et al.* Inoculation of bacterial consortium increases rice yield (*Oryza sativa* L.) reducing applications of nitrogen fertilizer in San Martin region, Peru. **Rhizosphere**, v. 14, p. 100200, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100200>. Acesso em: 15 jan. 2025.

RODRIGUES MAIA, F. Cowpea bean production – (*Vigna unguiculata* (L.) Walp): A drought-resistant plant is very common in regions of the Brazilian semi-arid. **Journal of Interdisciplinary Debates**, v. 4, n. 4, p. 242–263, 2023. DOI: 10.51249/jid.v4i04.1731. Disponível em: <https://www.periodicojs.com.br/index.php/jid/article/view/1731>. Acesso em: 24 mar. 2025.

- ROCHA, S. *et al.* Nodule microbiome from cowpea and lima bean grown in composted tannery sludge-treated soil. **Applied Soil Ecology**, v. 151, p. 103542, jul. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103542>. Acesso em: 23 jul. 2025.
- ROMANYÀ, J.; CASALS, P. Biological nitrogen fixation response to soil fertility is species-dependent in annual legumes. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 20, p. 546–556, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42729-019-00144-6>. Acesso em: 15 jun. 2025.
- RUIU, L. Plant-Growth-Promoting Bacteria (PGPB) against Insects and Other Agricultural Pests. **Agronomy**, v. 10, n. 6, p. 861, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/agronomy10060861>. Acesso em: 10 jun. 2025.
- RUMJANEK, N. *et al.* Feijão-caupi tem uma nova estirpe de rizóbio, BR3267, recomendada como inoculante. Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**, 2006. 16 p. (Embrapa Agrobiologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 15). ISSN 1676-6709. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/158968/1/FL09980.pdf>. Acesso em: 21 fev. 2025.
- SANSINENEA, E. *Bacillus* spp.: As plant growth-promoting bacteria. In: **Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms**. 2019. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-981-13-5862-3\\_11](https://doi.org/10.1007/978-981-13-5862-3_11). Acesso em: 24 fev. 2025.
- SANTOS, C. *et al.* Efetividade de rizóbios isolados de solos da região Nordeste do Brasil na fixação do N<sub>2</sub> em amendoim (*Arachis hypogaea* L.). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 27, n. 2, p. 301-307, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v27i2.1849>. Acesso em: 20 jan. 2025.
- SENA, P. *et al.* Molecular, physiological, and symbiotic characterization of cowpea rhizobia from soils under different agricultural systems in the semiarid region of Brazil. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 20, p. 1178–1192, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00203-3>. Acesso em: 20 jan. 2025.
- SOUMARE, A. *et al.* Exploiting biological nitrogen fixation: A route towards a sustainable agriculture. **Plants**, v. 9, n. 8, p. 1011, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/plants9081011>. Acesso em: 16 nov. 2024.
- SOUSA, T. *et al.* Simultaneous selection for yield, adaptability, and genotypic stability in immature cowpea using REML/BLUP. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 54, p. e01234, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1678-3921.pab2019.v54.01234>. Acesso em: 18 dez. 2024.

- TEIXEIRA, P. *et al.* Manual de métodos de análise de solo. **Brasília: Embrapa**, 2017. 517 p. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1085209/manual-de-metodos-de-analise-de-solo>. Acesso em: 20 fev. 2025.
- TEWARI, S.; POONIYA, V.; SHARMA, S. Next generation bioformulation prepared by amalgamating *Bradyrhizobium*, cell free culture supernatant, and exopolysaccharides enhances the indigenous rhizospheric rhizobial population, nodulation, and productivity of pigeon pea. **Applied Soil Ecology**, v. 147, p. 103363, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103363>. Acesso em: 6 jun. 2025.
- TIMOFEEVA, A.; GALYAMOVA, M.; SEDYKH, S. Plant growth-promoting soil bacteria: nitrogen fixation, phosphate solubilization, siderophore production, and other biological activities. **Plants**, v. 12, n. 24, p. 4074, 2023. <https://doi.org/10.3390/plants12244074>.
- TIMOFEEVA, A.; GALYAMOVA, M.; SEDYKH, S. Bacterial siderophores: classification, biosynthesis, perspectives of use in agriculture. **Plants**, v. 11, n. 22, p. 3065, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/plants11223065>. Acesso em: 10 jun. 2025.
- TRIPATHI, A.; PANDEY, M.; SHARMA, P. A review: effects of nitrogenous fertilizers on soil (pH, microbial community, greenhouse gases emission and carbon pool). **Environmental Contaminants Reviews**, v. 5, n. 2, p. 44–48, 2022. Disponível em: <http://doi.org/10.26480/ecr.02.2022.44.48>. Acesso em: 20 fev. 2025.
- TORRES, D. *et al.* Molecular and physiological analysis of indole-3-acetic acid degradation in *Bradyrhizobium japonicum* E109. **Research in Microbiology**, v. 172, 103814, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2021.103814>. Acesso em: 6 jun. 2025.
- UNITED NATIONS DEPARTMENT OF ECONOMIC AND SOCIAL AFFAIRS – UN DESA. **World Population Prospects 2024: Summary of Results (UN DESA/POP/2024/TR/NO. 9)**. 2024. Disponível em: <https://desapublications.un.org/publications/world-population-prospects-2024-summary-results>. Acesso em: 26 nov. 2024.
- VAN STAPPEN, C. *et al.* The spectroscopy of nitrogenases. **Chemical Reviews**, v. 120, n. 12, p. 5005–5081, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00650>. Acesso em: 20 jan. 2025.
- VASQUES, N. C. *et al.* Bioprospecção de microrganismos para o uso em bioinsumos: métodos para triagem inicial de bioativos visando à nutrição de plantas e à tolerância a estresses abióticos e bióticos. Londrina: **Embrapa Soja**, 2024. 38 p. (Documentos / Embrapa Soja, ISSN 2176-2937; n. 462). Disponível em:

- <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1164913/1/DOC-462.pdf>. Acesso em: 24 fev. 2025.
- VASQUES, N.; NOGUEIRA, M.; HUNGRIA, M. Increasing application of multifunctional *Bacillus* for biocontrol of pests and diseases and plant growth promotion: lessons from Brazil. **Agronomy**, v. 14, n. 8, p. 1654, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/agronomy14081654>. Acesso em 25 mar. 2025.
- VÁSQUEZ-DEAN, J. *et al.* Microbial communities from arid environments on a global scale: a systematic review. **Biological Research**, v. 53, n. 1, p. 29, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40659-020-00296-1>. Acesso em: 20 jan. 2025.
- VIDEIRA, S. *et al.* Genetic diversity and plant growth promoting traits of diazotrophic bacteria isolated from two *Pennisetum purpureum* Schum. genotypes grown in the field. **Plant and Soil**, v. 356, p. 51–66, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1082-6>. Acesso em: 15 dez. 2024.
- WAGI, S.; AHMED, A. *Bacillus* spp.: potent microfactories of bacterial IAA. **PeerJ**, v. 7, e7258, 23 jul. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.7717/peerj.7258>. Acesso em: 26 jun. 2025.
- WANG, J. *et al.* Traits-based integration of multi-species inoculants facilitates shifts of indigenous soil bacterial community. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01692>. Acesso em: 10 jun. 2025.
- WEI, W. *et al.* Long-term effects of nitrogen fertilization and *Bradyrhizobium* inoculation on diazotrophic community structure and diversity in soybean cultivation. **Applied Soil Ecology**, v. 206, p. 105806, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2024.105806>. Acesso em: 10 jan. 2025.
- XIE, F.; PATHOM-AREE, W. Actinobacteria from desert: diversity and biotechnological applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 765531, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.765531>. Acesso em: 20 fev. 2025.
- XU, T. *et al.* Revealing the underlying mechanisms mediated by endophytic actinobacteria to enhance the rhizobia - chickpea (*Cicer arietinum* L.) symbiosis. **Plant and Soil**, v. 474, p. 299–318, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11104-022-05335-2>. Acesso em: 24 jul. 2025.
- YADAV, A. *et al.* Actinobacteria from rhizosphere: molecular diversity, distributions, and potential biotechnological applications. In: DHALIWAL, Harcharan Singh et al. (ed.). **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Actinobacteria: Diversity and Biotechnological Applications**. Amsterdam: Elsevier, 2019.

cap. 2, p. 19–52. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63994-3.00002-3>. Acesso em: 22 dez. 2024.

YEREMKO, L. *et al.* Role of environmental factors in legume-rhizobium symbiosis: a review. **Biomolecules**, v. 15, n. 1, p. 118, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biom15010118>. Acesso em: 23 jul. 2025.

ZHANG, Y. *et al.* Soil acidification caused by excessive application of nitrogen fertilizer aggravates soil-borne diseases. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 340, p. 108176, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.agee.2022.108176>. Acesso em: 11 jan. 2025.

ZHAO, Y. *et al.* Nuclear phylogenomics support numerous polyploidization events and hypotheses for the evolution of rhizobial nitrogen-fixing symbiosis in Fabaceae. **Molecular Plant**, v. 14, p. 748–773, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molp.2021.02.006>. Acesso em: 11 jan. 2025.

ZILLI, J. *et al.* Assessment of cowpea rhizobium diversity in Cerrado areas of northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 281–287, out. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822004000300002>. Acesso em: 20 jan. 2025.

ZILLI, J.; XAVIER, G.; RUMJANEK, N. BR 3262: Nova estirpe de *Bradyrhizobium* para a Inoculação de feijão-caipi em Roraima. Boa Vista, **Embrapa Roraima**, 2008. 07p. (Comunicado Técnico, 10). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/695265/1/cot102008-br3262-zilli.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2025.