



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA - PPQB

ÂNGELLA EDUARDA DA SILVA SOUSA

**POTENCIAL SIMBIÓTICO DE *Stylosanthes guianensis* INOCULADA COM
Bradyrhizobium japonicum E IDENTIFICAÇÃO DE ESTIRPES NATIVAS ISOLADAS
A PARTIR DA PROSPECÇÃO MICROBIANA NA CHAPADA DO ARARIPE**

Crato

2026



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA - PPQB

ÂNGELLA EDUARDA DA SILVA SOUSA

**POTENCIAL SIMBIÓTICO DE *Stylosanthes guianensis* INOCULADA COM
Bradyrhizobium japonicum E IDENTIFICAÇÃO DE ESTIRPES NATIVAS ISOLADAS
A PARTIR DA PROSPECÇÃO MICROBIANA NA CHAPADA DO ARARIPE**

Relatório de dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, da Universidade Regional do Cariri, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Química Biológica.

Orientador: Francisco Assis Bezerra da Cunha

Coorientador: Janerson José Coelho

Crato

2026

ÂNGELLA EDUARDA DA SILVA SOUSA

**POTENCIAL SIMBIÓTICO DE *Stylosanthes guianensis* INOCULADA COM
Bradyrhizobium japonicum E IDENTIFICAÇÃO DE ESTIRPES NATIVAS ISOLADAS
A PARTIR DA PROSPECÇÃO MICROBIANA NA CHAPADA DO ARARIPE**

Relatório de dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, da Universidade Regional do Cariri, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Química Biológica.

Relatório de dissertação defendida e aprovada em: 06, 02 de 2026.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco Assis Bezerra da Cunha

Orientador – (URCA)

Prof. Dr. Janerson José Coelho

Coorientador – (URCA)

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho

Membro Titular Interno – (URCA)

Prof. Dr. Valker Araújo Feitosa
Membro Titular Externo - (USP)

Prof. Dr. Saulo Relison Tintitno
Membro Suplente Interno – (URCA)

Prof. Dr. Witalo da Silva Sales
Membro Suplente Externo – (URCA)

Dedico este trabalho aos meus pais e avós, cuja
raízes silenciosas sustentam tudo o que sou.

Agradeço a Universidade Regional do Cariri – URCA, a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP BPI BP5-0197 00174.01.00/22 Edital/Chamada: Bolsa de Produtividade em Pesquisa, Estímulo à Interiorização e Inovação Tecnológica – BPI 04/2022, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

Faço agradecimentos ao Programa de Pós-graduação em Química Biológica – PPQB, Departamento de Química Biológica - DQB. Ao Laboratório de Bioprospecção do Semiárido e Métodos Alternativos – LABSEMA, coordenado pelo meu orientador Prof. Dr. Francisco Assis Bezerra da Cunha e ao meu coorientador Prof. Dr. Janerson José Coelho. Agradeço ao Dr. Marcelo Ayres Carvalho, pesquisador sênior da Embrapa Cerrados pelas colaborações e envio das sementes de *Stylosanthes guianenses*, a Innova Agrotecnologia pelo fornecimento dos inoculantes. Agradeço as colaborações do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular – LMBM, coordenado pelo Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho, ao Laboratório de Engenharia Ambiental e Sanitária – LEAS, coordenado pela Prof. Dra. Yannice Tatiane da Costa Santos.

Agradeço as colaborações dos professores Prof. Dr. Valker Araújo Feitosa, Dr. Thiago Leite de Alencar, Dr. Witalo da Silva Sales, Dr. José Vinícius Leite Lima, Prof. Dr. Saulo Relisson Tintitno, Profa. Dra. Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa. Agradeço ainda ao meu grupo de pesquisa do LABSEMA aos nomes de Nair Macêdo, Zildene Silveira, Débora Meneses, Henrique Bezerra, Suieny Rodrigues, Ana Luiza, André Nilton, e ao subgrupo de pesquisa em bioinsumos aos nomes de Jéssica Freire, Simone Galdino e Marcos Alves. Agradeço especialmente a Larisse Bernadino e Débora Muniz por toda a amizade e colaboração durante essa trajetória.

Agradeço a minha mãe Maria José e meu pai Francisco José, a minha irmã Thainá Emmanuely, aos meus avós Terezinha Ferreira e Geraldo Agnelo, a minha prima Rita de Cárcia, aos meus tios Edevaldo Agnelo, Edson Agnelo, Renato Agnelo, a Dona Maria (*in memoriam*) e Renney Agnelo (*in memoriam*). Agradeço ainda aos amigos que me acompanharam aos nomes de Alane Gonçalves, João Eudes, Bruno Lira, Junio Dias, Larissa da Silva, Lucas Yuri, Guilherme

Fernandes, Renan Gonçalves, Naiza Saraiva, Diana Ruth. Obrigado pelas parcerias, aconselhamentos e acima de tudo pelo apoio na pesquisa e na vida.

“O conhecimento é finito, o desconhecido, infinito; intelectualmente estamos numa ilha no meio de um oceano ilimitado de inexplicabilidade. Nossa função em cada geração é reivindicar um pouco mais de terra firme”.

- T.H. Huxley, 1887, apud Carl Sagan, *Cosmos*, 1980.

Figura 1: Fluxograma da estrutura da dissertação	21
Figura 2: Processo de infecção das raízes de leguminosas.....	28
Figura 3: Estabelecimento da cultivar	29
Figura 4: Representação cartográfica da localização geográfica do município de Crato -CE .	91
Figura 5: Precipitação pluviométrica, temperaturas máximas e mínimas do ar obtidas durante o experimento	92
Figura 6: Triângulo textural do solo	96
Figura 7: Delineamento dos blocos casualizados	99
Figura 8: Avaliação do crescimento da cultivar	102
Figura 9: Estágios iniciais de desenvolvimento de plântulas <i>Stylosanthes guianensis</i> em condições de campo.....	104
Figura 10: Avaliação estatística do índice de cobertura verde do dossel vegetal (CI)	106
Figura 11: Avaliação estatística do índice de cobertura verde do dossel vegetal (SI)	108
Figura 12: Estimativa de cobertura do dossel vegetal (%)	111
Figura 13: Teor relativo de Chl a e Chl	112
Figura 14: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação	133
Tabela 1: Diversidade de cepas de <i>Bradyrhizobium</i> isoladas em associação com leguminosas para fixação biológica de nitrogênio	43
Tabela 2 Inoculação de estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> em associação com leguminosas para a fixação biológica de nitrogênio	64
Tabela 3: Co inoculação de <i>Bradyrhizobium</i> e outros microrganismos promotores do crescimento vegetal em espécies de leguminosas	73
Tabela 4: Caracterização química do solo	94
Tabela 5: Caracterização química do adubo orgânico	95
Tabela 6: Estimativa das frações texturais do solo por método de sedimentação em jarra.....	97
Tabela 7: Confirmação de possíveis diazotróficas	139

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
Cm	Centímetro
mm	Milímetro
mg/dm ³	Miligrama por decímetro cúbico
g	Gramma
Kg	Quilograma
mL	Mililitro
L	Litro
cmol _k /dm ³	Centimol de carga por decímetro cúbico
pH	Potencial hidrogeniônico
>	Menor que
<	Maior que
Chl a	Clorofila A
Chl b	Clorofila B
MO	Matéria Orgânica
SB	Soma de Bases
CTC	Capacidade de trocas catiônicas
V	Saturação por bases
C	Carbono orgânico

Ca^{2+}	Cálcio
Mg^{2+}	Magnésio
K^+	Potássio
Na^+	Sódio
Al^{3+}	Alumínio
$\text{H}^+ + \text{Al}^{3+}$	Acidez potencial
P_2O_5	Pentóxido de fósforo
K_2O	Óxido de potássio
CGA	Conteúdo gravimétrico de Água
P	Fosfato
N_2	Nitrogênio molecular
NH_3	Amônia
NH_4	Amônio
NO_3^-	Nitrato
$\text{CaH}_4(\text{PO}_4)_2$	Superfosfato simples
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
UFC	Unidades formadoras de colônia
FBN	Fixação Biológica de Nitrogênio
IPCE	Instituto de Pesquisa e Estratégia Econômica do Ceará
FUNCEME	Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
ANOVA	Análise de variância
FGCC	<i>Fractional Green Canopy Cover</i>
PGPR	<i>Plant Growth-Promoting Rhizobacteria</i>
PGPB	<i>Plant Growth-Promoting Bacteria</i>
SYMRK	<i>Symbiosis Receptor-like Kinase</i>
RNS	<i>Root Nodule Symbiosis</i>
NRE	Receptores de Nodulação
NFR1 / NFR5	<i>Nod Factor Receptor 1 e 5</i>
NFB	<i>Nitrogen Free Bromothymol blue medium</i>
LGI	<i>Lacto-Gluconate Infusion medium</i>
nodABC	Genes responsáveis pela síntese dos fatores Nod
nifH	Gene que codifica a dinitrogenase redutase
ACC	1-aminociclopropano-1-carboxilato
IAA	Ácido Indol-3-Acético
GA	Ácido Giberélico
ABA	Ácido Abscísico
LCO	<i>Lipo-chitooligosaccharides</i>
GBIF	<i>Global Biodiversity Information Facility</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

1 INTRODUÇÃO GERAL	18
1.1 Estratégias de Pesquisa	18
1.2 Estrutura da Dissertação	20
2 OBJETIVOS	22
2.1. Objetivo Geral.....	22
2.2. Objetivos Específicos.....	22
2.3 Objetivos e Questionamentos	22
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	24
3.1 Simbiose Leguminosa- <i>Bradyrhizobium</i>	24
3.2 Aspectos gerais dos rizóbios e diversidade do gênero <i>Bradyrhizobium</i>	25
3.3 <i>Stylosanthes guianensis</i>	28
4 PRODUÇÃO CIENTÍFICA: CAPÍTULO II	29
Introdução	30
Materiais e Métodos	32
Resultados e discussões	33
<i>Conclusão</i>	77
<i>Perspectivas Futuras</i>	78
<i>Referências</i>	80
5 PRODUÇÃO CIENTÍFICA: CAPÍTULO III	88
Introdução	89
Metodologia.....	90
Resultados e discussões	101
Conclusão	115
Referências	115
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS: CAPÍTULO IV	121
Aspectos Gerais da Produção Científica	121
<i>Conclusões Gerais</i>	122
<i>Perspectivas De Investigações Futuras</i>	122
7 REFERÊNCIAS	123
8 ANEXOS E APÊNDICES	129
ANEXO 1:	129
Resultados preliminares:	135

<i>Estimativa das Unidades Formadoras de Colônia - UFC g⁻¹</i>	135
<i>Isolados NFB e LGI</i>	138
Conclusão preliminar:	142
ANEXO 2:	143
SISBIO	143
ANEXO 3: Semeio de Placas	145
ANEXO 4: Triagem do material biológico	149
ANEXO 5: Confirmação em Meio NFB e LGI para possíveis diazotróficas	150

POTENCIAL SIMBIÓTICO DE *Stylosanthes guianensis* INOCULADA COM *Bradyrhizobium japonicum* E IDENTIFICAÇÃO DE ESTIRPES NATIVAS ISOLADAS A PARTIR DA PROSPECÇÃO MICROBIANA NA CHAPADA DO ARARIPE

RESUMO

As interações simbióticas entre rizóbios e leguminosas são relevantes para promover a sustentabilidade agrícola em sistemas de baixa fertilidade, pois contribui diretamente para a produtividade vegetal. Nessas associações, bactérias como *Bradyrhizobium japonicum* realizam a fixação biológica de nitrogênio (FBN), reduzindo a necessidade de fertilizantes sintéticos e promovendo o crescimento vegetal por meio da produção de fitormônios e compostos bioativos. Em regiões semiáridas, *Stylosanthes guianensis* se destaca como uma leguminosa forrageira de alto valor agrônomo, adaptada a solos ácidos e de baixa fertilidade, com capacidade de estabelecer simbiose com estirpes de *Bradyrhizobium*. A prospecção de estirpes nativas adaptadas ao solo da Chapada do Araripe visa potencializar o uso de bioinoculantes regionais. Assim, esta pesquisa investiga a eficiência simbiótica entre *S. guianensis* e *B. japonicum*, aliada à caracterização de microrganismos rizosféricos endêmicos, como estratégia de inovação para o fortalecimento da agricultura no semiárido. O experimento foi conduzido em delineamento em blocos ao acaso com quatro tratamentos: controle negativo; inoculante; adubação química e orgânica; e adubação química e orgânica associada ao inoculante. Foram realizadas análises químicas do solo, medições de crescimento durante o estabelecimento da cultura e teor de clorofila. Amostras da rizosfera foram coletadas para isolamento e triagem morfológica de colônias a partir de um meio geral para crescimento (TSA) e um meio específico (*Rizobium* Medium), os nódulos de *S. guianensis* foram coletados e cultivados em meio *Rizobium* Medium, as colônias isoladas e purificadas foram submetidas a teste em meios LGI e NFB, todas as amostras apresentaram halo na superfície do meio semissólido, indicando possível potencial diazotrófico. O uso do inoculante na espécie vegetal analisada não foi eficiente nas condições edafoclimáticas do experimento, assim como a adubação orgânica e mineral. A contagem de microrganismos nas amostras com correção de solo úmido em cultivo em TSA não foi estatisticamente relevante, entretanto a amostra de solo para o cultivo em *Rizobium* Medium apresentou significância na ANOVA, as amostras de nódulos também não apresentaram. Contudo, o processo de isolamento microbiano resultou na obtenção de 48 isolados provenientes do solo cultivados em meio TSA, 54 isolados do solo em meio Rizóbio e 47 isolados oriundos de nódulos, também cultivados em meio Rizóbio. Esses microrganismos irão compor um banco de isolados, os quais serão posteriormente submetidos ao sequenciamento.

Palavras-Chave: Leguminosa forrageira. Bactérias diazotróficas. Adaptação microbiana. Tecnologia agrícola sustentável. Inoculação biológica.

Agradecimentos: CAPES, FUNCAP, CNPq, FINEP.

Symbiotic Potential of *Stylosanthes guianensis* Inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* and Identification of Native Strains Isolated from Microbial Prospecting in the Chapada do Araripe

ABSTRACT

Symbiotic interactions between rhizobia and legumes are relevant for promoting agricultural sustainability in low-fertility systems, as they directly contribute to plant productivity. In these associations, bacteria such as *Bradyrhizobium japonicum* perform biological nitrogen fixation (BNF), reducing the need for synthetic fertilizers and promoting plant growth through the production of phytohormones and bioactive compounds. In semiarid regions, *Stylosanthes guianensis* stands out as a forage legume of high agronomic value, adapted to acidic and low-fertility soils, with the ability to establish symbiosis with *Bradyrhizobium* strains. The prospecting of native strains adapted to the soils of the Chapada do Araripe aims to enhance the use of regional bioinoculants. Thus, this research investigates the symbiotic efficiency between *S. guianensis* and *B. japonicum*, combined with the characterization of endemic rhizospheric microorganisms, as an innovation strategy to strengthen agriculture in semiarid environments. The experiment was conducted in a randomized block design with four treatments: negative control; inoculant; chemical and organic fertilization; and chemical and organic fertilization associated with the inoculant. Soil chemical analyses, growth measurements during crop establishment, and chlorophyll content were performed. Rhizosphere samples were collected for isolation and morphological screening of colonies using a general growth medium (TSA) and a specific medium (Rhizobium Medium). Nodules of *S. guianensis* were collected and cultured on Rhizobium Medium, and the isolated and purified colonies were subjected to tests on LGI and NFB media. All samples showed a halo on the surface of the semisolid medium, indicating potential diazotrophic activity. The use of the inoculant in the analyzed plant species was not efficient under the edaphoclimatic conditions of the experiment, nor was organic and mineral fertilization. Microbial counts in soil samples corrected for moisture and cultivated on TSA were not statistically significant; however, soil samples grown on Rhizobium Medium showed significance in the ANOVA, while nodule samples did not. However, the microbial isolation process resulted in the recovery of 48 isolates from soil cultured in TSA medium, 54 soil isolates grown in Rhizobium medium, and 47 isolates obtained from nodules, also cultured in Rhizobium medium. These microorganisms will comprise a culture collection and will subsequently be subjected to sequencing.

Keywords: Forage legume. Diazotrophic bacteria. Microbial adaptation. Sustainable agricultural technology. Biological inoculation.

Acknowledgements: CAPES, FUNCAP, CNPq, FINEP.

Como bactérias do solo podem melhorar a produtividade de plantas cultivadas no semiárido? Este estudo investiga como bactérias do solo, como o *Bradyrhizobium japonicum*, podem se associar a plantas como o *Stylosanthes guianensis* para melhorar a produtividade de forma sustentável e com baixo custo. A pesquisa é realizada na Chapada do Araripe, uma região com grande potencial agrícola, mas ainda pouco explorada em relação à diversidade de microrganismos do solo. Nesse contexto, conhecer a microbiota associada a essas plantas é essencial para entender quais bactérias estão presentes, compreender como elas auxiliam no crescimento vegetal e selecionar aquelas com maior potencial para fortalecer a produção agrícola de forma natural e sustentável.

1.1 Estratégias de Pesquisa

A definição da área experimental em uma propriedade localizada no Sítio Minguiriba (7°16'48.4"S; 39°35'16.0"W), zona rural do município do Crato – CE, foi motivada pela relevância ecológica da Chapada do Araripe e pela necessidade de ampliar o conhecimento sobre a diversidade microbiana local. Além disso, a escolha da leguminosa *Stylosanthes guianensis* se justifica por sua importância agrônômica e capacidade de se estabelecer em ambientes de baixa fertilidade, e essas características a tornam uma planta promissora para sistemas sustentáveis.

A adequação das condições edáficas foi considerada etapa crucial para garantir o desenvolvimento das culturas e a validade das comparações entre os tratamentos. Casler (2015) destaca que a correção da heterogeneidade inicial do solo é um fator determinante para a qualidade experimental. Assim, realizou-se uma análise química prévia com base nos protocolos estabelecidos pela Embrapa (Teixeira *et al.*, 2017), evidenciando a necessidade de correção da acidez e toxidez por alumínio, além da adição de nutrientes essenciais.

Nesse contexto, adotou-se a aplicação de macronutrientes primários como Nitrogênio, Fósforo e Potássio na semeadura, considerando seu papel fundamental no desenvolvimento inicial dos sistemas radiculares e na viabilidade fisiológica das culturas. A escolha pelo fornecimento desses nutrientes fundamentou-se na importância desses elementos para o estabelecimento das culturas e para a expressão de seu potencial fisiológico ao longo do ciclo vegetativo. Nitrogênio, fósforo e potássio estão diretamente envolvidos em processos bioquímicos essenciais, como fotossíntese, respiração celular, ativação enzimática e fixação biológica de nitrogênio (Souza, de *et al.*, 2025). A adição de fontes orgânicas, como esterco bovino e biofertilizantes, foi integrada à estratégia de manejo com o objetivo de melhorar a qualidade do solo, aumentar a matéria orgânica e favorecer a atividade microbiana (Freire *et al.*, 2023).

O delineamento experimental adotado em blocos ao acaso com quatro repetições foi escolhido por sua eficiência em lidar com a variabilidade espacial do campo, assegurando maior precisão estatística. Casler (2015) ressalta que o delineamento deve ser representativo da escala experimental e evitar pseudorreplicações, enquanto Alesso *et al.* (2021) destaca que o tamanho,

a forma e a disposição das parcelas influenciam diretamente a capacidade discriminativa do experimento.

A inoculação foi realizada com estirpes do gênero *Bradyrhizobium*, reconhecido por sua ampla capacidade de nodulação em leguminosas tropicais e por desempenhar papel central na fixação biológica de nitrogênio (Beukes *et al.*, 2016). Especificamente, a espécie *Bradyrhizobium stylosanthis* tem sido destacada por sua eficiência simbiótica com *Stylosanthes* spp., demonstrando a importância de selecionar estirpes adaptadas ao hospedeiro para otimizar o desempenho agrônomico (Delamuta *et al.*, 2016).

Para o monitoramento do crescimento vegetal, optou-se por tecnologias de sensoriamento remoto como o Canopeo®, que possibilita medições não destrutivas da cobertura verde fracionada do dossel (FGCC). Essa abordagem permite análises em tempo real com base na relação entre os canais espectrais RGB, garantindo precisão na identificação da vegetação ativa (Shepherd, Lindsey e Lindsey, 2018). A avaliação da clorofila foliar foi realizada por métodos ópticos não destrutivos, utilizando o ClorofiLOG® Falker CFL1030, que permite estimativas confiáveis dos teores de clorofila a e b, essenciais para o diagnóstico nutricional relacionado à disponibilidade de nitrogênio (Dong *et al.*, 2019).

A investigação microbiológica das amostras de solo foi orientada pelo reconhecimento do papel ecológico das rizobactérias na dinâmica solo-planta. Assim, a coleta das amostras na camada de 0–20 cm e a realização de análises químicas foram justificadas pela necessidade de caracterizar o ambiente rizosférico em seus aspectos físico-químicos e biológicos. Os parâmetros analisados (pH, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, alumínio) seguem protocolos estabelecidos pela Embrapa (Teixeira *et al.*, 2017), garantindo padronização e confiabilidade nos dados obtidos. Essa caracterização é fundamental para correlacionar os atributos do solo com a presença e a atividade dos microrganismos investigados.

A coleta de solo para fins microbiológicos foi realizada com cuidados específicos de conservação para preservar a viabilidade celular e a integridade do DNA microbiano. O armazenamento sob refrigeração e o uso de frascos estéreis asseguram a qualidade das amostras até a realização das análises, refletindo a preocupação com a fidelidade dos resultados moleculares e culturais.

A relevância do gênero *Bradyrhizobium* e de outras *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria* (PGPR) justifica a abordagem empregada na quantificação e triagem desses microrganismos. PGPR são reconhecidas por sua habilidade de colonizar a rizosfera, estimular o crescimento vegetal por meio da FBN e produção de fitormônios como auxinas, giberelinas

e citocininas, além de atuar na supressão de patógenos (Kumawat *et al.*, 2022). Em sistemas com leguminosas de cobertura, tais interações simbióticas promovem o aumento da biodiversidade e da fertilidade do solo (Ríos-Ruiz *et al.*, 2024). Diante disso, a avaliação da comunidade microbiana com foco em bactérias diazotróficas simbióticas foi considerada estratégica.

A aplicação de protocolos de diluição seriada e cultivo em meios seletivos e não seletivos (*Tryptic Soy Broth* e *Rhizobium Medium*) foi adotada para permitir a detecção de uma ampla gama de microrganismos, incluindo espécies de difícil crescimento e rizóbios de interesse. A utilização do meio TSA garante o crescimento de diversas bactérias, enquanto o *Rhizobium Medium* possibilita o isolamento mais específico de estirpes dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. A triagem morfológica das colônias cultivadas viabiliza a seleção de estirpes promissoras para etapas posteriores de identificação molecular e testes de eficiência simbiótica.

No tocante ao delineamento experimental e ao tratamento estatístico dos dados, as escolhas metodológicas refletem a preocupação com a robustez e validade das inferências científicas. O uso de testes de normalidade (Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov) e homogeneidade de variâncias (Levene), seguido por análise de variância unidirecional (ANOVA) e testes *post hoc* (Tukey), visou garantir rigor na comparação entre os tratamentos. Casler (2015) salienta que o ajuste do delineamento à escala experimental é essencial para evitar pseudorreplicações, o que justifica o uso de blocos casualizados com replicações suficientes para controlar a variabilidade espacial e garantir poder estatístico.

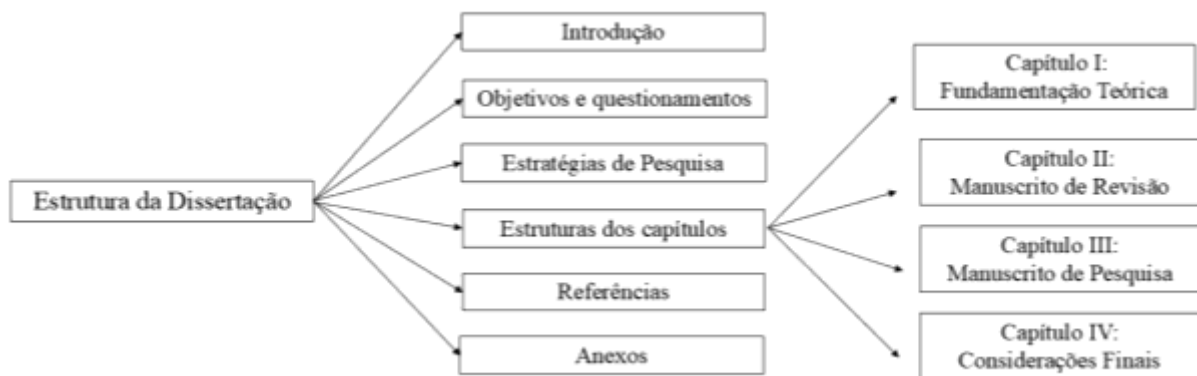
1.2 Estrutura da Dissertação

A dissertação está organizada em quatro capítulos principais: Fundamentação Teórica, Manuscrito de Revisão, Manuscrito de Pesquisa e Considerações Finais, seguido pelas Referências e Anexos. A estrutura está apresentada na figura 1.

- ❖ Capítulo I: Fundamentação teórica, reúne um panorama abrangente da literatura relacionado ao tema, organizado em quatro seções:
 - Seção 1. Simbiose leguminosa-*Bradyrhizobium*: aborda as características gerais das leguminosas e os processos de estabelecimento da simbiose com rizóbios, enfatizando a sinalização química
 - Seção 2. Aspectos gerais dos rizóbios: discute as características do gênero *Bradyrhizobium*, bem como fatores relacionados à sua distribuição e diversidade

- Seção 3. *Stylosanthes guianensis*: descreve o gênero e a espécie investigados, com ênfase em sua interação com o gênero *Bradyrhizobium*.
- Capítulo II: *Bradyrhizobium* e Fabaceae: apresenta uma revisão sobre as interações simbióticas e dos mecanismos de fixação biológica de nitrogênio
- Capítulo III: Eficiência simbiótica de *Bradyrhizobium japonicum* em *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. cultivado sob condições semiáridas: relata os resultados e discussões do estudo experimental desenvolvido
- Capítulo IV: Considerações finais: sintetiza as principais conclusões e contribuições da pesquisa.
- ❖ Referências.
- ❖ Anexos.

Figura 1: Fluxograma da estrutura da dissertação



2.1. Objetivo Geral

Investigar o potencial da inoculação do *Bradyrhizobium japonicum* no *Stylosanthes guianensis* no semiárido da Chapada do Araripe.

2.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar as propriedades químicas do solo da área experimental antes da implementação do experimento;
- Quantificar a densidade de plantas estabelecidas por tratamento;
- Comparar o desempenho vegetativo de *Stylosanthes guianensis* sob diferentes tratamentos;
- Mensurar o índice relativo de clorofila foliar (*Chl a* e *Chl b*);
- Quantificar as unidades formadoras de colônia (UFC) de solo rizosférico de *Stylosanthes guianensis* meio *Rizhobium* Medium®;
- Verificar se os isolados são possíveis fixadores de nitrogênio em meio NFB e LGI;
- Extrair o DNA das culturas puras isoladas;
- Realizar a reação de cadeia de polimerase (PCR) nas culturas puras.

2.3 Objetivos e Questionamentos

O nitrogênio (N) é um macronutriente essencial, participando diretamente da constituição de biomoléculas vitais, como proteínas, ácidos nucleicos, clorofila e hormônios, além de influenciar todos os estágios do metabolismo, crescimento e desenvolvimento vegetal (Lu *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2024). Sua importância fisiológica é amplamente reconhecida, sobretudo no contexto da fotossíntese, pois grande parte do N foliar está associado aos pigmentos fotossintéticos e aos complexos enzimáticos dos fotossistemas, sendo determinante para a formação e manutenção da clorofila (Lu *et al.*, 2021; Kubar *et al.*, 2022).

Apesar de sua relevância, a eficiência de uso do nitrogênio pelas plantas é notoriamente baixa, com estimativas de que apenas 30% a 50% do N aplicado é de fato assimilado pelas

culturas. O restante se perde para o ambiente, resultando em impactos ambientais severos, como eutrofização de corpos d'água, acidificação do solo e emissão de gases de efeito estufa, como o óxido nitroso (N₂O) (Lu *et al.*, 2021; Florencio *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2024). Essas perdas, além de comprometerem a sustentabilidade ambiental, aumentam significativamente os custos de produção agrícola, pressionando sobretudo os pequenos produtores. O uso intensivo e recorrente de fertilizantes sintéticos, especialmente a ureia, tem sido apontado como um dos grandes desafios à sustentabilidade dos sistemas agropecuários modernos (Florencio *et al.*, 2022; Singh *et al.*, 2025).

Diante desse contexto, torna-se urgente a busca por alternativas sustentáveis ao uso de adubação nitrogenada convencional. Nesse cenário, os bioinsumos surgem como alternativa promissoras por possuírem agentes biológicos na sua composição (Florencio *et al.*, 2022). Entre os microrganismos com maior destaque, os gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* têm ampla aplicação na agricultura brasileira, sendo responsáveis por boa parte da substituição da ureia na cultura da soja, atualmente, mais de 78% da área cultivada com soja no país utiliza inoculantes à base desses microrganismos (Florencio *et al.*, 2022).

No entanto, apesar do avanço no uso de bioinsumos, a eficiência da FBN varia de acordo com o genótipo da planta hospedeira, as estirpes bacterianas utilizadas e as condições edafoclimáticas (Florencio *et al.*, 2022). Muitos inoculantes comerciais ainda utilizam cepas exóticas cuja adaptação aos solos tropicais e semiáridos pode ser limitada. Nesse sentido, a seleção e avaliação de estirpes nativas de *Bradyrhizobium*, adaptadas a solos ácidos como os da região da Chapada do Araripe, torna-se uma estratégia relevante para o desenvolvimento de bioinoculantes regionais mais eficientes.

Na literatura, *Bradyrhizobium japonicum* é amplamente descrito por estabelecer associações simbióticas benéficas com diversas espécies de leguminosas, sendo objetivo de múltiplos estudos de inoculação. Dentre eles, destaca-se sua aplicação em culturas como *Glycine max* (Groppa *et al.*, 2022), *Vigna unguiculata* (Hamzavi *et al.*, 2022) e *Arachis hypogaea* (Udeh *et al.*, 2023). Também são relatados ensaios de coinoculação com a combinação de *Bradyrhizobium japonicum* e *Bacillus subtilis*, que promoveram maior tolerância ao estresse salino em *Vigna subterranea* (Udeh *et al.*, 2023), e sua associação com *Azospirillum brasilense*, resultou em fitoestabilização em *Glycine max* (Armendariz *et al.*, 2019).

Quanto a diversidade simbiótica, estudos taxonômicos identificaram a espécie *Bradyrhizobium stylosanthis* (BR446) em nódulos de *Stylosanthes guianensis* (Pereira-Gómez

et al., 2020), Além de sua ocorrência em outras leguminosas como *Tephrosia cinérea* (Pereira-Gómez *et al.*, 2020) e em *Arachis hypogaea* (Shao *et al.*, 2020), evidenciando sua ampla capacidade de se adaptar e colonizar leguminosas. No entanto não há na registros na literatura sobre experimentos em campo que avaliem o efeito da inoculação de *Stylosanthes guianensis* com *Bradyrhizobium japonicum*.

Nesse contexto, a leguminosa forrageira *Stylosanthes guianensis* cultivada em solos tropicais e subtropicais, apresenta elevado potencial para utilização em sistemas produtivos do semiárido, devido a sua adaptabilidade e tolerância à acidez do solo (Dong *et al.*, 2017), além de registros na literatura que indicam sua compatibilidade simbiótica com o gênero *Bradyrhizobium*. Essas características reforçam a relevância de investigar os efeitos da inoculação dessa espécie botânica como *Bradyrhizobium japonicum*, visando a promoção de sistemas agrícolas mais sustentáveis.

Com isso, a presente pesquisa surge da necessidade de estabelecer essa cultura forrageira a região da Chapada do Araripe, onde as características de solos ácidos se tornam críticas para o estabelecimento e produtividade das culturas. Nesse cenário, a fixação biológica de nitrogênio (FBN), por meio da simbiose entre leguminosas e rizóbios, é investigada como alternativa viável para reduzir o uso de fertilizantes nitrogenados industriais, que frequentemente são inacessíveis aos agricultores familiares e apresentam impactos ambientais significativos quando utilizados em excesso ou de forma inadequada.

Além disso, destaca-se que a maior parte dos inoculantes comerciais utiliza cepas exóticas, cuja eficiência pode ser limitada em ambientes específicos como o semiárido, o que fundamenta a hipótese de que microrganismos nativos possam apresentar desempenho superior, promovendo melhor fixação simbiótica e desenvolvimento vegetal, sendo uma alternativa para a produção de um bioinoculante adaptado a essa região. Portanto, o estudo avalia o potencial de estirpes nativas isoladas da rizosfera, buscando novas opções de inoculantes adaptados, bem como verifica em que medida a inoculação possa substituir total ou parcialmente a adubação convencional. Para responder a esses questionamentos, foram formuladas as seguintes questões norteadoras:

- Quais são as características químicas do solo da área experimental antes da implantação do experimento e como elas podem influenciar o desenvolvimento da *Stylosanthes guianensis*?
- A inoculação do *Stylosanthes* com *Bradyrhizobium* é eficiente?

- Como o desempenho vegetativo da *Stylosanthes guianensis* varia entre os diferentes tratamentos aplicados?
- A inoculação pode substituir total ou parcialmente a adubação aplicada?
- Quais são os microrganismos presentes no solo rizosférico do *Stylosanthes guianensis*?

3.1 Simbiose Leguminosa-*Bradyrhizobium*

As plantas absorvem nitrogênio principalmente nas formas de nitrato e amônio, sendo que a fixação biológica de nitrogênio (FBN) é responsável por aproximadamente 60% do nitrogênio fixado globalmente, enquanto os fertilizantes químicos suprem cerca de 25% da demanda total de nitrogênio necessária ao desenvolvimento vegetal (Hakim *et al.*, 2020). Entretanto, a literatura tem demonstrado que as interações simbióticas entre bactérias e leguminosas não se limitam à FBN, mas que abrangem também propriedades biofuncionais que ainda são pouco investigadas. Dentre essas propriedades, destacam-se as funções relacionadas à fitorremediação, como fitoextração, fitoestabilização, fitotransformação, fitovolatilização e fitoestimulação (Armendariz *et al.*, 2019). Além disso, algumas estirpes de rizóbios apresentam resistência a antibióticos, mesmo em concentrações consideradas inibitórias, o que pode acarretar implicações tanto ecológicas quanto agrônômicas (Marques *et al.*, 2023).

O Ministério da Agricultura e Pecuária por meio do Art. 1º, institui o Programa Nacional de Bioinsumos com a finalidade de ampliar e de fortalecer a utilização de bioinsumos no País para beneficiar o setor agropecuário, atuando sob o Decreto nº 10.375/2020 para ampliar e fortalecer o uso de bioinsumos no Brasil, promovendo práticas agropecuárias mais sustentáveis e alinhadas à preservação ambiental. Com isso, os bioinsumos são definidos como produtos, processos ou tecnologias de origem vegetal, animal ou microbiana utilizados na produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agropecuários, em sistemas aquícolas ou de florestas plantadas. Atuando sobre o crescimento, desenvolvimento e mecanismos de resposta de plantas, animais e microrganismos, além de interagir com substâncias derivadas e com processos físico-químicos e biológicos (Brasil, 2020).

Logo, a simbiose entre leguminosas e rizóbios é fundamental para o desenvolvimento das plantas, pois proporciona nitrogênio assimilável na forma de amônia, enquanto os rizóbios, predominantemente quimioorganotróficos, recebem substratos orgânicos necessários à sua atividade metabólica (Galindo *et al.*, 2021). As bactérias simbióticas associadas a leguminosas utilizam estratégias distintas para realizar a fixação de nitrogênio, dentre elas estão: os sistemas de secreção tipo III (T3SS), via clássica Nod e mecanismos alternativos independentes dos canais Nod e T3SS. Os flavonoides liberados pelas raízes das leguminosas são essenciais para a regulação dessas vias, assim como para processo de quimioatração de rizóbios e ativação da

organogênese dos nódulos e a seleção de simbioses compatíveis às culturas (Dong e Song, 2020).

3.2 Aspectos gerais dos rizóbios e diversidade do gênero *Bradyrhizobium*

Os rizóbios representam um grupo funcionalmente diverso de bactérias fixadoras de nitrogênio, reconhecidas por estabelecerem simbioses efetivas com leguminosas em nódulos radiculares. Atualmente, compreendem mais de 238 espécies distribuídas em aproximadamente 20 gêneros, organizados nas classes Alphaproteobacteria (α -rizóbios) e Betaproteobacteria (β -rizóbios), com relatos mais recentes incluindo também representantes da Gammaproteobacteria (Chen *et al.*, 2021; Idrissi *et al.*, 2021). Apesar dessa diversidade taxonômica, estima-se que apenas cerca de 23% das 19.000 espécies de leguminosas existentes no mundo são simbioses formalmente escritas, evidenciando assim uma lacuna significativa no conhecimento da biodiversidade rizobiana (Idrissi *et al.*, 2021).

Dentro desse contexto, o gênero *Bradyrhizobium*, pertencente à ordem *Hyphomicrobiales*, destaca-se pela sua ampla distribuição geográfica e adaptabilidade a diferentes condições edafoclimáticas. Considerado o grupo mais representado entre os rizóbios α , devido a plasticidade genômica, aos tempos de geração variando entre 9 a 90 horas e expressiva capacidade simbiótica com culturas de importância agrícolas, como a soja (*Glycine max*) e o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) (Chen *et al.*, 2021).

Estudos recentes demonstraram que *Bradyrhizobium* possui diversidade genética associada aos genes *nod*, *nif* e *fix*, bem como ao sistema de secreção tipo III (T3SS), permitindo sua ampla adaptação ecológica e eficiência simbiótica. Essa modularidade genética, aliada à transferência horizontal de genes, confere ao gênero flexibilidade evolutiva para se adaptar a distintos ambientes e promover sua persistência em ecossistemas diversos (Terra *et al.*, 2025).

A evolução e diversificação de *Bradyrhizobium* refletem adaptações funcionais aos ambientes abióticos, à nodulação de hospedeiros específicos e à eficiência na fixação de nitrogênio atmosférico (Hernández-Oaxaca *et al.*, 2022). Estudos filogenômicos apontam para a existência teórica de mais de mil espécies de *Bradyrhizobium* ainda não descritas, revelando uma diversidade funcional e taxonômica muito superior à atualmente catalogada (Hernández-Oaxaca *et al.*, 2022).

Do ponto de vista genético, os rizóbios possuem genes especializados organizados em regiões específicas do genoma, como ilhas de simbiose ou plasmídeos simbióticos. Nessas regiões, destacam-se os genes *nod*, responsáveis pela síntese dos fatores Nod, moléculas sinalizadoras essenciais para o reconhecimento entre bactéria e planta e para a formação dos nódulos (Chen *et al.*, 2021). Entretanto, nem todas as leguminosas dependem desse mecanismo. Espécies do gênero *Aeschynomene*, por exemplo, são capazes de formar nódulos sem a participação dos fatores Nod, utilizando vias alternativas, como o sistema de secreção do tipo III (T3SS). Esse sistema permite que a bactéria injete proteínas diretamente nas células da planta, ativando processos que levam ao estabelecimento da simbiose (Dong e Song, 2020; Chen *et al.*, 2021).

Além disso, os polissacarídeos extracelulares (EPSs) secretados por rizóbios também desempenham papel determinante na colonização radicular e no processo de infecção, podendo atuar como fatores de promoção ou inibição da simbiose dependendo de sua estrutura molecular (Chen *et al.*, 2021). Tais características ressaltam a importância da coevolução e da compatibilidade específica entre rizóbios e leguminosas, evidenciando que a eficiência simbiótica depende da interação entre especificidade do hospedeiro e especificidade do habitat (Chen *et al.*, 2021).

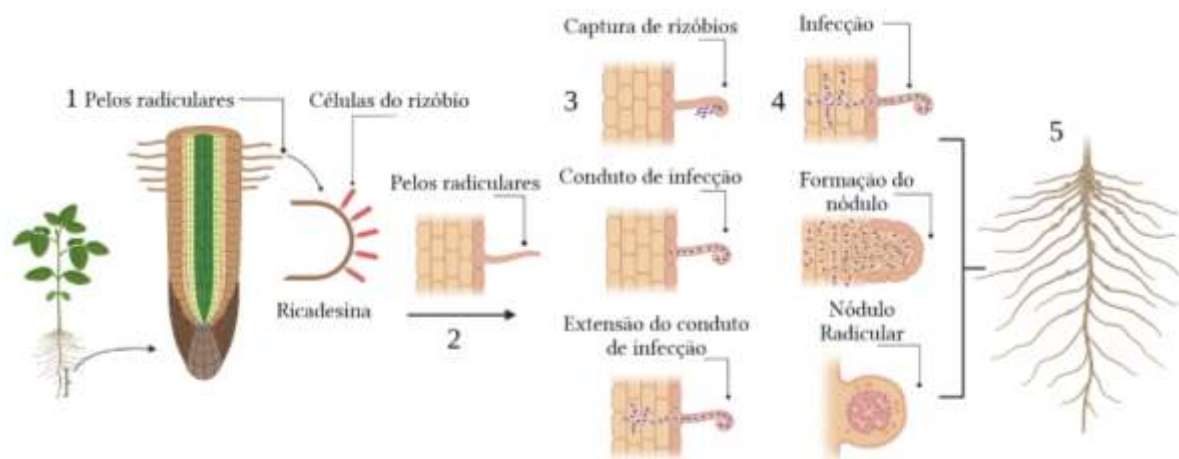
Nesse contexto, a sinalização inicial entre rizóbios e leguminosas assume papel central na determinação do sucesso da simbiose. Os flavonoides exsudados pelas raízes das leguminosas atuam como quimioatraentes específicos e indutores da expressão dos genes *nod*, cuja ativação depende da proteína reguladora NodD. Essa indução culmina na produção dos fatores Nod (NFs), moléculas-chave que desencadeiam o desenvolvimento dos nódulos radiculares (Shumilina *et al.*, 2023). A ativação de NodD por flavonoides específicos permite a ligação do regulador à caixa *nod* nos promotores dos genes *nod*, promovendo sua transcrição e, conseqüentemente, a síntese dos NFs. Essa regulação é complexa, envolvendo isoformas distintas de NodD e uma interação estruturalmente dependente com os polifenóis vegetais (Shumilina *et al.*, 2023). Após o reconhecimento dos NFs pelos receptores da planta (NFR1/NFR5), inicia-se uma cascata de sinalização altamente conservada que regula a infecção e a organogênese nodular.

A estrutura e composição química dos flavonoides, bem como das modificações estruturais dos fatores Nod, conferem especificidade à interação simbiótica, definindo quais cepas rizobianas são compatíveis com determinadas espécies de leguminosas. Dessa forma, os EPS, flavonoides e os fatores Nod ilustram a complexidade da simbiose rizóbio-leguminosa

como um processo coevolutivo altamente refinado, cuja eficácia depende da integração precisa de sinais moleculares entre parceiros específicos e adaptados ao ambiente (Chen, W. F. *et al.*, 2021; Shumilina *et al.*, 2023).

A figura 2 ilustra o processo de infecção das raízes de leguminosas, destacando as principais etapas envolvidas na formação dos nódulos radiculares. Inicialmente, ocorre a presença dos pelos radiculares e o reconhecimento inicial das rizobactérias. Esse reconhecimento e adesão são mediados por uma proteína de ligação presente na superfície das células rizobianas, conhecida como ricasina. Em seguida, após a adesão, as células rizobianas penetram nos pelos radiculares por meio da secreção de fatores de nodulação, que levam ao encurvamento dos pelos radiculares. Posteriormente, as bactérias induzem a planta a formar um fio de infecção baseado em celulose (conduto de infecção), permitindo a progressão bacteriana através do tecido radicular. Na sequência, células da raiz próximas aos pelos infectados são invadidas pelos rizóbios, desencadeando divisões celulares que permitem a colonização intracelular e o desenvolvimento de um nódulo radicular funcional. Por fim, o sistema radicular da planta atinge um estágio em que os bacteroides são formados no interior das células da raiz, resultando em uma estrutura nodular semelhante a um tumor, que marca o estabelecimento de uma relação simbiótica bem-sucedida.

Figura 2: Processo de infecção das raízes de leguminosas



Fonte: Criado pelo autor utilizando *BioRender* (2025), adaptado de Madigan, M. T. Brock – *Biologia de Micro-organismos* [recurso eletrônico]. 14ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. ISBN 978-85-8271-298-6, p. 674.

3.3 *Stylosanthes guianensis*

O gênero *Stylosanthes* Sw. (Fabaceae, subfamília Papilionoideae, tribo Dalbergieae), comumente conhecidos como *Stylos*, compreende cerca de 50 espécies de leguminosas forrageiras, com ampla distribuição em regiões tropicais e subtropicais, principalmente nas Américas, na África, Austrália e Sudeste Asiático (Gissi *et al.*, 2025; Wang, C. C. *et al.*, 2024). Filogeneticamente o gênero está inserido no clado *Pterocarpus*, caracterizado pelas folhas trifoliadas, estipulas amplexicaules, hábito subarbustivo e inflorescências compostas por múltiplos espigões (Gissi *et al.*, 2025).

O cerrado brasileiro é reconhecido como o principal centro de diversidade do gênero, reunindo aproximadamente 26 espécies, das quais sete apresentam ampla distribuição, sendo *S. viscosa*, *S. humilis*, *S. angustifolia*, *S. gracilis*, *S. capitata*, *S. scabra* e *S. guianensis* (Souza, *et al.*, 2021). Além dessa diversidade, destaca-se o valor agrônomo das espécies de *Stylosanthes* sobretudo pelo rendimento de biomassa, adaptabilidade a solos secos, ácidos e de baixa fertilidade, além de serem amplamente utilizadas em sistemas de produção de silagem, como adubação verde e cobertura de pomares (Wang, C. C. *et al.*, 2024).

Entre as espécies mais relevantes, *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. se destaca pelo porte arbustivo, com altura aproximada de 0,6 a 1,2 m, e caule de 0,3 a 0,8 cm de diâmetro. O arbusto apresenta grande quantidade de ramificações, além de maior diversidade genética e

distribuição geográfica dentro do gênero (Liu *et al.*, 2022). Nessas regiões, especialmente sob condições tropicais de alta temperatura e umidade, a ensilagem representa uma estratégia eficaz para garantir a conservação e disponibilidade da forragem durante períodos críticos (Mao *et al.*, 2024). No Brasil, em sistemas forrageiros tropicais, cultivares como ‘Bela’ (*S. guianensis*) e ‘Campo Grande’ (*S. capitata* × *S. macrocephala*) são relevantes devido à resistência a altas temperaturas e desempenho agrônômico, tornando o Brasil o maior produtor dessas variedades (Gissi *et al.*, 2025).

Stylosanthes guianensis exibe elevada tolerância à baixa disponibilidade de fósforo inorgânico (Pi), à toxicidade de alumínio (Al) e manganês (Mn), fatores comuns em solos tropicais ácidos (Chen *et al.*, 2021; Miao *et al.*, 2024; Jinhui *et al.*, 2025). Devido à sua origem em ambientes tropicais com predominância de solos ácidos, o *Stylo* apresenta alta adaptabilidade a essas condições limitantes, sendo considerado um modelo para estudos sobre mecanismos moleculares de adaptação vegetal a estresses edáficos (Miao *et al.*, 2024). Tal característica reforça sua importância como leguminosa pioneira em estratégias de manejo sustentável e uso eficiente de nutrientes. Na figura 3 está representado a visão geral do estabelecimento do *S. guianenses*.

Figura 3: Estabelecimento da cultivar



S. guianenses em campo (1); hábito de crescimento e cobertura vegetal formada pela planta, indicando padrão de ramificação característico da espécie (2); Padrão de ramificação da espécie no período de seca (3); detalhe das estruturas reprodutivas, evidenciando inflorescências e flores amarelas características da espécie (4-5).

Além disso, o gênero possui elevada capacidade de fixar nitrogênio em simbiose com bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, contribuindo para a melhoria da fertilidade dos solos, recuperação de áreas degradadas e aumento da produtividade (Gissi *et al.*, 2025). Por essas características, o *Stylosanthes* é frequentemente cultivado em consórcio com gramíneas forrageiras, como *Urochloa decumbens*, *Brachiaria brizantha* e *Andropogon gayanus*,

contribuindo para otimizar a eficiência da ciclagem de nutrientes e promover maior estabilidade produtiva, resultando em sistemas mais eficientes e sustentáveis (De Souza et al., 2021).

Entre as cultivares mais representativas desenvolvidas no Brasil, destaca-se o Estilosantes Bela, uma leguminosa forrageira tropical composta por mistura física em proporção igual das cultivares *Stylosanthes guianensis* BRS GROF 1463 e BRS GROF 1480, desenvolvida pelas Unidades da Embrapa Gado de Corte e Cerrados. Apresenta hábito semiperene, altura entre 80 à 130 cm, elevada produção de matéria orgânica, apresenta elevado potencial de simbiose com estirpes eficientes de rizóbios e alta capacidade de fixação biológica de nitrogênio, sendo adequada para sistemas de integração lavoura-pecuária e para recuperação de solos, com baixo custo e fácil utilização pela agricultura familiar (EMBRAPA, 2019).

Bradyrhizobium e Fabaceae: Uma revisão das interações simbióticas e dos mecanismos de fixação biológica de nitrogênio

Ângella Eduarda da Silva Sousa¹; Débora Feitosa Muniz¹; Larisse Bernardino dos Santos¹; José Vinícius Leite Lima¹; Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa¹, Thiago Leite de Alencar¹; Marcelo Ayres Carvalho², Janerson José Coelho¹, Francisco Assis Bezerra da Cunha¹

¹Laboratório de Bioprospecção do Semiárido e Métodos Alternativos, Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, Crato, Ceará, Brasil.

²Empresa Brasileira de Agropecuária (Embrapa), Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, Brasil.

ORCID: 0009-0001-2227-5465; 0000-0002-9166-2987; 0000-0002-4102-4389; 0009-0008-4174-2154; 0000-0001-9787-3980; 0000-0002-0420-2000; 0000-0003-2792-2980; 0000-0003-1570-9461; 0000-0001-5694-3188

Resumo: Associações simbióticas entre espécies da família Fabaceae e o gênero *Bradyrhizobium* possibilitam a fixação biológica de nitrogênio (FBN), aumentam a absorção de nutrientes pelas plantas, elevam a resistência a patógenos, salinidade e contribuem para a fitorremediação de solos contaminados por metais pesados. A aplicação de estirpes bacterianas eficientes como inoculantes representa um tipo de bioinsumos capaz de aumentar a produtividade agrícola, ao mesmo tempo em que promove a sustentabilidade. Este estudo tem como objetivo analisar as interações simbióticas entre leguminosas e *Bradyrhizobium*, com ênfase na formação de nódulos e nos mecanismos envolvidos na FBN. Foi realizada uma busca bibliográfica nas bases de dados *Scopus*, *Web of Science* e *ScienceDirect*. O termo de busca utilizado foi “*Biological nitrogen fixation in legumes AND Bradyrhizobium*”, abrangendo o período de 2019 a 2025. Os principais achados destacam que fatores edáficos e a microbiota nativa do solo influenciam o estabelecimento da simbiose. Além disso, a transferência horizontal de genes desempenha um papel significativo. Os resultados de estudos de inoculação identificaram *B. japonicum*, *B. diazoefficiens*, *B. elkanii*, como estirpes notáveis de *Bradyrhizobium* associadas a culturas importantes como *Glicine max*, *Vigna unguiculata*, *Phaseolos vulgaris*, *Vigna subterrânea* e *Arachis hypogaea*. Em relação a coinoculação, as associações mais eficazes de *Bradyrhizobium* ocorreram com os gêneros *Azospirillum*, *Rhizobium* e *Pseudomonas*. Essas inoculações resultaram em maior fixação de nitrogênio, aumento da produtividade de grãos e melhores retornos econômicos. Avanços recentes em abordagens multiômicas, engenharia genética e formulações inovadoras de inoculantes como

microcápsulas poliméricas, hidrogéis e nanopartículas indutoras de nodulação evidenciam novas oportunidades para aumentar a adaptabilidade das estirpes e o desempenho simbiótico. De modo geral, os achados ressaltam a necessidade de estratégias integradas que combinem componentes moleculares, ecológicos e biotecnológicos para o desenvolvimento de bioinoculantes mais eficientes e resilientes, adequados à agricultura sustentável.

Palavras-Chave: Diversidade genética de rizóbios. Fixação simbiótica de nitrogênio. Competitividade rizobiana. Biotecnologia agrícola. Sustentabilidade agrícola.

Introdução

As interações simbióticas entre microrganismos do solo, como rizóbios, fungos micorrízicos e bactérias endofíticas, exercem efeitos benéficos para as plantas, ao promoverem significativamente seu crescimento e desenvolvimento. Essas interações aumentam a absorção de nutrientes e contribuem para o incremento da resistência à patógenos (Beyene *et al.*, 2022). As simbioses são especialmente relevantes em ambientes edafoclimáticos adversos, como solos degradados e regiões semiáridas, onde favorecem a resiliência das culturas e a restauração funcional desses ecossistemas (Hussain *et al.*, 2019; Sulieman *et al.*, 2019).

Nesse contexto, as rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPR), incluindo os rizóbios, destacam-se pela capacidade de realizar a fixação biológica de nitrogênio (FBN) e de sintetizar fitohormônios e compostos bioativos que favorecem o crescimento e a saúde das plantas (Kumawat *et al.*, 2022). Ao interagirem com leguminosas, essas bactérias aumentam a eficiência do uso de nitrogênio, reduzem a necessidade de fertilizantes sintéticos e contribuem para a construção de sistemas agrícolas mais sustentáveis, resilientes e ambientalmente equilibrados (Galindo *et al.*, 2021; Amorim *et al.*, 2022; Beyene *et al.*, 2022; Hassen *et al.*, 2023).

Entre os gêneros de rizóbios, *Bradyrhizobium* destaca-se por sua elevada eficiência simbiótica com leguminosas, incluindo culturas de importância agrônômica, como a soja (*Glycine max*), com produção estimada em 340 milhões de toneladas entre 2017 e 2018, principalmente nos Estados Unidos, Brasil e Argentina (Arachchige *et al.*, 2020); o amendoim (*Arachis hypogaea*), que atingiu uma produção anual de 46 milhões de toneladas métricas em 2018 e constitui uma importante fonte de óleo, alimento e rações (Canellas *et al.*, 2022; Elsherbeny, Mousa e Zhran, 2023), e feijão (*Phaseolus vulgaris*), com produção variando entre

28 e 30 milhões de toneladas (FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, www.fao.org) (Leite *et al.*, 2022).

A inoculação com estirpes eficientes, como o *Bradyrhizobium japonicum*, induz a formação de nódulos radiculares que convertem o N₂ atmosférico em NH₃, que é posteriormente assimilado com compostos orgânicos nitrogenados. Esses compostos são transportados para os tecidos vegetais e incorporados em aminoácidos e proteínas, promovendo o crescimento das plantas e aumentando a produtividade por meio da fixação biológica de nitrogênio (FBN) (Armendariz *et al.*, 2019).

Entre os avanços recentes na aplicação de rizobactérias, Beukes *et al.* (2016) destacam que, nos últimos anos, estudos sobre a biogeografia dos rizóbios têm se concentrado na distribuição geográfica e temporal de grupos ou espécies específicas. A biogeografia procariótica tem recebido atenção crescente devido à capacidade das leguminosas de formar nódulos, um processo influenciado pela transferência horizontal de genes (HGT). Dessa forma, essas bactérias constituem modelos ideais para investigações biogeográficas e filogeográficas, oferecendo uma compreensão mais aprofundada da evolução de suas características biológicas.

As interações simbióticas entre bactérias e leguminosas vão além da fixação biológica de nitrogênio (FBN), apresentando propriedades biofuncionais ainda pouco exploradas. Destacam-se, entre elas, funções relacionadas à fitorremediação, como fitoextração, fitoestabilização, fitotransformação, fitovolatilização e fitoestimulação (Armendariz *et al.*, 2019). Além disso, algumas estirpes de rizóbios apresentam resistência a antibióticos em concentrações inibitórias, o que pode ter implicações ecológicas, como a disseminação de genes de resistência no solo, bem como preocupações agrônômicas, incluindo riscos à biossegurança e possíveis alterações na eficácia de inoculantes aplicados em ambientes agrícolas (Marques *et al.*, 2023).

Essas bactérias também podem atuar como biofertilizantes e fitoestimulantes, promovendo o crescimento vegetal e aumentando a tolerância das plantas a condições ambientais adversas, como pH ácido, elevada salinidade e contaminação por metais pesados. Algumas estirpes podem ainda apresentar potencial biopesticida, contribuindo para o manejo sustentável de culturas (Beyene *et al.*, 2022; Jiang *et al.*, 2023). Assim, a aplicação combinada de microrganismos benéficos pode potencializar a FBN e melhorar a adaptação das leguminosas, ampliando os benefícios dessa simbiose para a sustentabilidade agrícola e ambiental (Lopes *et al.*, 2022).

Apesar do número crescente de estudos sobre rizóbios e suas aplicações em leguminosas, poucos trabalhos apresentam uma revisão integrada da diversidade genética e funcional de espécies de *Bradyrhizobium* em associação com Fabaceae, especialmente sob diferentes condições edafoclimáticas. Compreender os fatores que afetam a eficiência da FBN, particularmente frente aos impactos das mudanças climáticas, é essencial para o desenvolvimento de bioinoculantes adaptados e de estratégias de manejo sustentável. Além disso, estudos sobre a coinoculação com fungos micorrízicos e outras bactéria promotoras de crescimento vegetal PGPB são promissores para revelar sinergias microbianas capazes de aumentar a tolerância das leguminosas a essas condições ambientais desfavoráveis.

Neste cenário, a presente revisão tem como objetivo analisar as interações simbióticas entre espécies de *Bradyrhizobium* e plantas da família Fabaceae, com ênfase na formação de nódulos e nos mecanismos de fixação biológica de nitrogênio (FBN). O estudo também busca identificar lacunas na literatura e discutir o potencial biotecnológico dessas bactérias em diferentes sistemas de produção.

Materiais e Métodos

Pesquisa na Literatura

Dados relacionados à inoculação, coinoculação e isolamento de espécies de *Bradyrhizobium*, bem como à sua associação com membros da família Fabaceae, foram obtidos por meio de bases de dados científicas como *Scopus*, *Web of Science* e *ScienceDirect*. Para a análise bibliográfica, utilizou-se o descritor “*Biological nitrogen fixation in legumes AND Bradyrhizobium*”. A busca inclui artigos publicados no período de 2019 a 2025.

Crerios de exclusão e inclusão

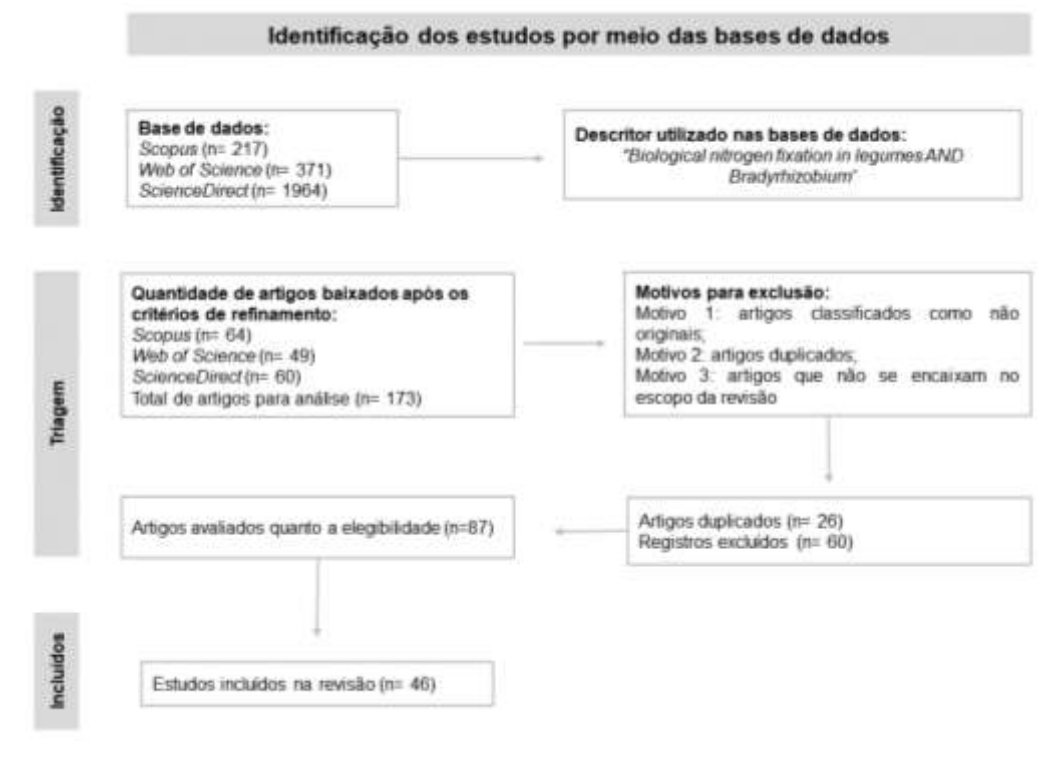
Para refinar o processo de seleção, foram aplicados critérios pré-definidos de inclusão e exclusão. Os critérios de inclusão foram: (I) abordar o tema principal do estudo; (II) disponibilidade do texto completo; (III) artigos científicos redigidos em inglês e publicados em periódicos revisados por pares; e (IV) estudos classificados como observacionais (prospectivos ou retrospectivos, analíticos e descritivos) ou experimentais.

Os critérios de exclusão foram: (I) artigos não classificados como pesquisa original, tais como cartas ao editor, prefácios, comunicações breves, comentários, editoriais, resenhas, relatos de casos, livros e capítulos de livros; (II) artigos duplicados; e (III) publicações cujo texto completo não estivesse disponível. A seleção dos artigos incluídos na amostra do estudo baseou-se nesses critérios, assegurando a relevância e a qualidade das evidências analisadas.

Resultados e discussões

Após o refinamento da pesquisa, foram selecionados 46 artigos que abordam a inoculação, coinoculação e o isolamento de espécies de *Bradyrhizobium* em associação com membros da família Fabaceae. A Figura 2 ilustra o processo de triagem dos estudos incluídos nesta revisão. Inicialmente, a busca geral utilizando os descritores resultou em 2.552 trabalhos, dos quais 46 foram selecionados para compor esta revisão, de acordo com os critérios estabelecidos.

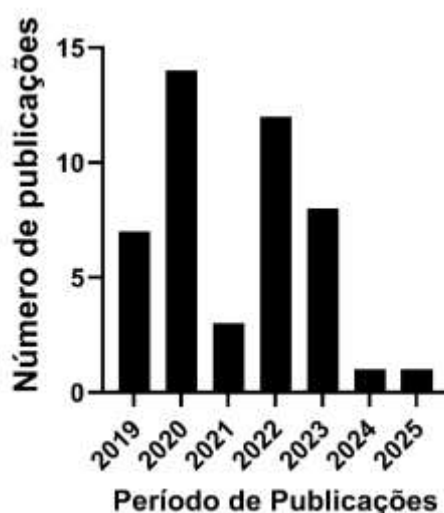
Figura 1: Diagrama de fluxo PRISMA



Representação do processo de triagem dos estudos identificados e selecionados na revisão. Reproduzido de Page et al. [21], Copyright (2025), com permissão da Sociedade/Editora.

O número de publicações sobre fixação biológica de nitrogênio em leguminosas mediada por *Bradyrhizobium* no período de 2019 a 2025 é apresentado na Figura 3. A análise demonstra que a maior produção científica ocorreu nos anos de 2020 (14 publicações) e 2022 (12 publicações), indicando um pico significativo nesses períodos. Em contraste, observou-se um declínio em 2023, com 8 publicações seguido por 2019, com 7 publicações. O ano de 2021 apresentou apenas 3 registros, enquanto os anos de 2024 e 2025 contabilizaram apenas uma publicação cada. Essas flutuações na produção científica são esperadas; no entanto, o número geral relativamente baixo de estudos com foco na relação entre *Bradyrhizobium* e Fabaceae em escala global sugere que ainda há amplo espaço para investigações adicionais.

Figura 2: Número de publicações por período



Número anual de artigos publicados sobre a fixação biológica de nitrogênio em leguminosas, mediada por *Bradyrhizobium*, de 2019 a 2025.

Simbiose entre leguminosas e bactérias do gênero Bradyrhizobium

O clado monofilético de angiospermas Eurosídeos I inclui quatro ordens reconhecidas pela capacidade de realizar fixação simbiótica de nitrogênio: Fabales, Fagales, Rosales e Cucurbitales (Das *et al.*, 2019). Dentre essas, a ordem Fabales se destaca por incluir a família Fabaceae, a qual estabelece simbioses com um grupo de bactérias Gram-negativas, sendo o gênero *Bradyrhizobium* particularmente relevante (Beukes *et al.*, 2016).

Além de desempenhar um papel central na Fixação biológica de nitrogênio (FBN), em ecossistemas terrestres, a família Fabaceae é uma das mais diversas entre as angiospermas e

apresenta ampla distribuição geográfica. Isso é evidenciado por dados do *Global Biodiversity Information Facility* (GBIF, www.gbif.org) que registram aproximadamente 30.068.765 ocorrências e 29.470 espécies descritas, ressaltando sua importância ecológica e agrícola (Li *et al.*, 2022).

A simbiose entre leguminosas e rizóbios beneficia o desenvolvimento das plantas ao fornecer compostos nitrogenados assimiláveis, como a amônia, ao mesmo tempo em que disponibiliza substratos orgânicos necessários para a atividade metabólica dos rizóbios, que são predominantemente quimioorganotróficos (Galindo *et al.*, 2021). Essa interação simbiótica é mediada por sinalização química, na qual cada tipo de rizóbio apresenta afinidade por espécies vegetais hospedeiras específicas. Essa especificidade determina o processo de infecção e a formação de nódulos radiculares (Amorim *et al.*, 2022). O processo envolve não apenas a ação dos fatores *Nod*, mas também outros mecanismos de comunicação reconhecidos pelas plantas, como a produção de polissacarídeos de superfície e secreção de proteínas efetoras pelos sistemas de secreção tipo 3 (T3SS) (Das *et al.*, 2019; Leite *et al.*, 2022).

Entre os principais fatores envolvidos na formação dos nódulos estão os receptores das proteínas externas de nodulações (NRE) que facilitam a fixação de nitrogênio ao direcionar os microrganismos para o sistema enzimático. Além disso, esses receptores atuam como estimuladores do crescimento vegetal, promovendo o desenvolvimento da planta, a mobilização de nutrientes e a atividade antagonista contra patógenos (Hakim *et al.*, 2020).

Após o reconhecimento inicial entre os rizóbios e a planta hospedeira, os fatores de nodulação interagem com receptores específicos da planta, como NFR1 e NFR5, desencadeando a cascata de sinalização conhecida como "Via Simbiótica Comum" (*Common Symbiotic Pathway*) (Das *et al.*, 2019). Esse passo inicial leva à ativação da simbiose e à mediação da cinética radicular (*Symbiosis and Mediation of Root Kinetics* - SYMRK), induzindo alterações na homeostase de cálcio no nucleoplasma. Esses fluxos de cálcio são regulados por proteínas transportadoras de íons, incluindo CASTOR, POLLUX e MCA8 (Das *et al.*, 2019). Esse mecanismo molecular é essencial, pois a assinatura específica de cálcio gerada nesse processo é decodificada pela proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina CCaMK, que, por sua vez, ativa fatores de transcrição como CYCLOPS (*Cytosolic Calcium-dependent Locus of Plant Symbiosis*). Essa ativação resulta na regulação transcricional de genes simbióticos-chave, incluindo *NIN* e *ERN1*, que promovem a diferenciação das células bacterianas em bacteroides, estruturas responsáveis pela fixação biológica do nitrogênio (Das *et al.*, 2019).

Essa simbiose torna as leguminosas autossuficientes em nitrogênio, favorecendo seu crescimento e contribuindo para a produtividade agrícola (Berriel *et al.*, 2021). O nitrogênio fixado pelas leguminosas pode representar cerca de 97 % do N total da planta, reduzindo, assim, a necessidade de fertilizantes sintéticos (Groppa *et al.*, 2022). Os nódulos radiculares formados durante a simbiose fornecem um microambiente especializado para a atividade da enzima bacteriana nitrogenase, que converte eficientemente o nitrogênio atmosférico (N₂) em amônia (NH₃) (Das *et al.*, 2019; Sulieman *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2022). No entanto, para confirmar o estabelecimento e a eficácia da simbiose mutualística, é necessário observar o tamanho e a coloração interna do nódulo. Uma coloração vermelha ou rosada indica a presença de leghemoglobina, uma proteína contendo heme cuja síntese é induzida pela interação entre bacteroides fixadores de nitrogênio e as células do nódulo radicular da planta (Cho *et al.*, 2024). Na ausência dessas características, o nódulo é considerado não fixador (Armendariz *et al.*, 2019).

Nesse contexto, a simbiose nodular entre leguminosas e *Bradyrhizobium* é estabelecida por meio da sinalização molecular (Das *et al.*, 2019). A interação tem início com a liberação de exsudatos radiculares, como flavonoides, que são moléculas-chave envolvidas na sinalização da prontidão da planta para a infecção bacteriana (Beukes *et al.*, 2016; Leite *et al.*, 2022). Essa comunicação inicial depende de mecanismos altamente específicos de reconhecimento, nos quais diferentes estirpes de rizóbios respondem quimiotaticamente aos flavonoides exsudados por espécies específicas de leguminosas. Essa especificidade simbiótica é observada entre diferentes gêneros de rizóbios, incluindo *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium* e *Sinorhizobium*, que formam associações simbióticas apenas com hospedeiras compatíveis, evidenciando a coevolução entre microrganismos e plantas (Cho *et al.*, 2024).

Além de regular o reconhecimento específico do hospedeiro, os flavonoides induzem expressão dos genes *nod*, responsáveis pela produção de lipo-quitto-oligossacarídeos (LCOs) específicos, conhecidos como fatores Nod. Essas moléculas dependem dos produtos de genes de nodulação conservados (*nodABC* e *nodIJ*), codificados pelos rizóbios (Beukes *et al.*, 2016; Riviezzi *et al.*, 2020). Esse processo de sinalização desencadeia divisões mitóticas nas células da raiz, resultando em alterações morfológicas nos pelos radiculares e na formação de estruturas especializadas conhecidas como nódulos, que se originam a partir da infecção rizobiana (Leite *et al.*, 2022).

Esses fatores Nod, são codificados pelos genes *nodABC*, que possibilitam o reconhecimento específico entre a planta hospedeira e o rizóbio, induzindo mudanças morfofisiológicas que culminam na formação de nódulos radiculares, estruturas especializadas geradas por meio da infecção simbiótica (Leite *et al.*, 2022). Entre esses genes, o *nodC* destaca-se por codificar uma N-acetilglucosaminiltransferase envolvida na polimerização de oligossacarídeos de quitina, essenciais para a formação estrutural do fator Nod. Devido ao seu papel na determinação da especificidade do hospedeiro o *nodC* é amplamente utilizado como marcados molecular de especificidade de nodulação. Além disso, a fixação biológica de nitrogênio é regulada pelo operon *nif*, no qual o gene *nifH* codifica a dinitrogenase redutase, um componente chave da nitrogenase. Essa enzima atua como um marcador funcional conservado entre bactérias e arqueias fixadoras de nitrogênio (Cho *et al.*, 2024). Apesar dos avanços na compreensão desses mecanismos, muitas vias secundárias de sinalização, bem como sua regulação sob condições de estresse ambiental, ainda permanecem pouco elucidadas.

A eficiência da FBN em sistemas simbióticos entre *Bradyrhizobium* e leguminosas é influenciada por fatores genéticos e edáficos, como a disponibilidade de fósforo e ferro, pH do solo, temperatura, umidade e os níveis de oxigênio, os quais regulam a fixação de N₂ (Galindo *et al.*, 2021). Dessa forma, para promover a sustentabilidade agrícola, é essencial adotar práticas que reduzem o uso de insumos químicos e aumentam a eficiência do uso do nitrogênio, como a utilização de bactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPB), visando melhorar tanto a produtividade das culturas quanto a qualidade dos alimentos (Galindo *et al.*, 2021).

Caracterização dos Rizóbios

Os rizóbios são, em sua maioria, bactérias Gram-negativas pertencentes principalmente às classes Alfaproteobactérias e, em alguns casos, Betaproteobactérias (Berriel *et al.*, 2021). Esses microrganismos estabelecem simbiose com espécies da família Fabaceae, fixando o nitrogênio atmosférico (N₂) e tornando as leguminosas autossuficientes em nitrogênio por meio da formação de nódulos radiculares (Groppa *et al.*, 2022). O gênero *Bradyrhizobium* foi descrito quase um século após a descoberta inicial dos rizóbios e é atualmente considerado um dos grupos mais representativos entre os simbioses nodulantes, em razão da sua elevada diversidade genética e do número crescente de novas espécies descritas nos últimos anos (Beukes *et al.*, 2016; Claassens *et al.*, 2023). Esse gênero é capaz de nodular uma ampla variedade de leguminosas, incluindo espécies das subfamílias Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae, como aqueles pertencentes às tribos Crotalarieae e Genisteeae. No total, há

registros de formação de nódulos em leguminosas de pelo menos 24 das 33 tribos reconhecidas, demonstrando a maior amplitude de hospedeiros entre todos os gêneros de rizóbios (Beukes *et al.*, 2016).

A transferência horizontal de genes (HGT) é considerada um fator-chave na evolução dos rizóbios, incluindo as espécies de *Bradyrhizobium*, uma vez que os loci simbióticos responsáveis pela nodulação (*nod*) e pela fixação de nitrogênio (*nif*) frequentemente estão localizados em elementos genéticos móveis, como plasmídeos e ilhas de simbiose (Beukes *et al.*, 2016). Estudos recentes relatam eventos de HGT tanto entre espécies quanto entre diferentes gêneros de rizóbios, facilitando a disseminação desses *loci* e contribuindo para o caráter polifilético desses microrganismos (Beukes *et al.*, 2016). Estudos genômicos demonstram que, devido à diversidade do grupo, originaram-se sete clados (supergrupos). Neste sentido, destaca-se o supergrupo *Bradyrhizobium japonicum* por apresentar maior número de descrição e ampla variedade em diferentes continentes e zonas climáticas (Claassens *et al.*, 2023).

De acordo com Claassens *et al.* (2023), outros supergrupos relevantes de *Bradyrhizobium* incluem o grupo *B. elkanii*, predominantemente isolado de leguminosas em regiões tropicais e subtropicais, bem como *B. jicamae* e *B. kakaduensis*, encontrados principalmente em climas mediterrâneos e tropicais. Os membros do supergrupo fotossintético, por sua vez, foram isolados de espécies do gênero *Aeschynomene* em regiões tropicais. Entre as 83 espécies descritas de *Bradyrhizobium*, a maioria das estirpes tem origem nas Américas (34 espécies), na Ásia (20 espécies) e na África (16 espécies), seguidas pela Europa, com quatro espécies, e pela Austrália, com nove.

Atividades biofuncionais das rizobactérias

Além de estabelecerem simbiose para a fixação biológica de nitrogênio, as rizobactérias desempenham uma ampla gama de atividades biofuncionais que promovem o crescimento vegetal e melhoram a saúde do solo. Entre essas funções, destaca-se a solubilização de fosfatos inorgânicos e de micronutrientes como o zinco (Zn), aumentando a disponibilidade desses elementos essenciais para a absorção pelas plantas (Kumawat *et al.*, 2022). Essas bactérias também atuam como fitoestimulantes, contribuindo para o desenvolvimento vegetal por meio da síntese e liberação de fitormônios, tais como citocinas, ácido giberélico (GA) ácido indol-3-acético (IAA) e o ácido abscísico (ABA) (Cho *et al.*, 2024). Além disso, auxiliam na redução dos níveis de etileno nas plantas, um hormônio associado ao estresse, por meio da ação da

enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase, que degrada seu precursor imediato (Lopes *et al.*, 2022; Hamzavi *et al.*, 2022).

De forma indireta, as rizobactérias também protegem as plantas contra fitopatógenos. Elas produzem sideróforos que quelam o ferro do ambiente, inibindo o crescimento de microrganismos competidores. Ademais secretam enzimas líticas e metabólitos com propriedades antifúngicas, atuando como biopesticidas naturais (Kumawat *et al.*, 2022). Com base nessas funcionalidades, as rizobactérias associadas ao sistema radicular são classificadas como agentes biofuncionais de múltiplas funções: atuam como biofertilizantes, ao aumentar a biodisponibilidade de nutrientes; como fitoestimuladores, ao favorecerem o crescimento vegetal; como rizoremediadores, ao contribuírem para a recuperação de solos contaminados; e como bioprotetores, ao elevar a tolerância das plantas a estresses abióticos, como pH extremo, salinidade e poluição por metais pesados (Beyene *et al.*, 2022; Jiang *et al.*, 2023).

Fitorremediação

A fitorremediação é uma estratégia na qual plantas são utilizadas para remover de contaminantes do solo por meio de diferentes mecanismos biológicos, incluindo: fitoextração, fitoestabilização, fitotransformação, fitovolatilização, rizofiltração ou fitoestimulação (Armendariz *et al.*, 2019). A fitoestabilização consiste em um processo no qual as plantas imobilizam contaminantes do solo na rizosfera, reduzindo sua biodisponibilidade. Nos últimos anos, essa abordagem tem sido reconhecida como um método eficaz para a imobilização de metais em solos contaminados. Além disso, a elevada capacidade das raízes em reter metais e metaloides é particularmente relevante para espécies vegetais comestíveis, pois reduz o risco de contaminação dos tecidos aéreos (Armendariz *et al.*, 2019). As bactérias noduladoras são frequentemente descritas como um suporte logístico invisível para uma fitorremediação eficaz e ecologicamente sustentável (Jiang *et al.*, 2023). A fitorremediação assistida, que envolve a aplicação de bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPB), pode intensificar o desenvolvimento das plantas sob estresse por contaminantes e potencializar o processo de fitoestabilização (Armendariz *et al.*, 2019).

Em *Glycine max* (L.), estudos demonstram que o acúmulo de arsênio (As) e de outros metais nas raízes favorece a fitoestabilização, ao reduzir a mobilidade dos metaloides na rizosfera e minimizar sua translocação para os tecidos aéreos. Assim, leguminosas nativas associadas a rizóbios resistentes ao arsênio apresentam elevado potencial para a recuperação de solos contaminados por metais pesados. Por outro lado, quando os simbiontes são sensíveis ao

As, a coinoculados com bactérias resistentes pode ser utilizada para melhorar o desempenho das plantas em condições adversas por meio de interações sinérgicas (Armendariz *et al.*, 2019).

Com essa abordagem, a coinoculação de rizóbios sensíveis ao AS com bactérias da rizosfera resistentes a esse elemento constitui uma estratégia biotecnológica eficiente para mitigar os efeitos da contaminação do solo. A interação entre *Bradyrhizobium japonicum* E109 e *Azospirillum brasilense* Az39 exemplifica como essa estratégia pode otimizar tanto o crescimento vegetal quanto a fixação biológica de nitrogênio (FBN), mesmo em solos contaminados. Esse sinergismo não apenas reduz a mortalidade dos rizóbios mais sensíveis, como também contribui para a imobilização do arsênio na rizosfera, favorecendo a recuperação de áreas degradadas (Armendariz *et al.*, 2019).

Salinidade

A salinidade é um estresse abiótico que limita o desenvolvimento das plantas e pode afetar negativamente a simbiose leguminosa-rizóbio, ao reduzir a absorção de água e nutrientes. Nesse contexto, o uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPB) tem sido proposto como uma estratégia para mitigar esses efeitos, sustentando a interação simbiótica mesmo sob condições salinas. Assim, a utilização combinada de microrganismos benéficos representa uma abordagem promissora para otimizar a fixação biológica de nitrogênio (FBN) em ambientes adversos (Lopes *et al.*, 2022).

Lopes *et al.* (2022) conduziram um estudo de coinoculação de feijão-fava, utilizando *Bradyrhizobium* e *Azospirillum baldaniorum*, o qual demonstrou aumento da tolerância das plantas ao estresse salino e maior eficiência da FBN. O estudo indicou relações sinérgicas entre estirpes de *Bradyrhizobium* (*B. elkanii*, *B. pachyrhizi*, *B. yuanmingense*, *B. paxllaeri* e *B. icense*), *A. baldaniorum* e o feijão-fava sob condições salinas. Os melhores resultados foram obtidos com a coinoculação de *B. elkanii* BR 2003 e *B. icense* BR 10399, que atenuaram os efeitos negativos do estresse salino e aumentaram a fixação de nitrogênio nos nódulos, favorecendo a produção de solutos orgânicos envolvidos na adaptação ao estresse. Dessa forma, bactérias diazotróficas simbióticas podem ser utilizadas em ambientes com elevada salinidade para mitigar seus efeitos prejudiciais. No entanto, a resposta à salinidade depende da estirpe de *Bradyrhizobium* empregada, sendo necessários estudos adicionais para compreender melhor essa interação e validar seus benefícios em outras leguminosas. Esses resultados podem contribuir para o desenvolvimento de inoculantes eficientes para o crescimento de leguminosas e o estabelecimento da simbiose em ambientes desafiadores.

Toxicidade

Um dos desafios atuais dos solos agrícolas é o uso disseminado de fluoroquinolonas, frequentemente introduzidas no ambiente por meio da aplicação de esterco bovino como biofertilizante. Esses compostos são antimicrobianos utilizados na medicina veterinária e podem contaminar ecossistemas terrestres e aquáticos, uma vez que não são totalmente metabolizados pelos animais tratados. As fluoroquinolonas atuam como agentes bactericidas ao interferirem nas enzimas topoisomerases II e IV, comprometendo processos essenciais como a replicação e na transcrição do DNA bacteriano. Entre esses compostos, destaca-se a enrofloxacin (Enro), um antimicrobiano de amplo espectro, eficaz principalmente contra bactérias Gram-negativas, algumas bactérias Gram-positivas e micoplasmas. Estima-se que cerca de 90 % do princípio ativo seja excretado, tornando o esterco um importante via de introdução desses contaminantes no ambiente quando utilizado como fertilizante orgânico (Marques *et al.*, 2023).

A presença de Enro pode ser nociva às plantas e aos microrganismos do solo. Nas plantas, pode interferir na fotossíntese, na assimilação de nitrogênio e na capacidade antioxidante. Além disso, pode alterar o equilíbrio das comunidades microbianas e reduzir a fertilidade do solo, afetando os processos de fixação de nitrogênio. Sua persistência no solo é de aproximadamente 90 dias, prolongando seus efeitos tóxicos sobre a microbiota edáfica. No Brasil, foi detectada uma média de 22,93 µg de Enro por quilograma de solo no estado de São Paulo, enquanto na Austrália e na Turquia foram encontradas concentrações de 370 µg/kg e 204 µg/kg, respectivamente (Marques *et al.*, 2023). Espécies Gram-negativas, como *Bradyrhizobium japonicum*, podem apresentar efeitos bacteriostáticos ou bactericidas devido à presença desse antimicrobiano, comprometendo a nodulação e o desenvolvimento das culturas de soja. Assim, a contaminação do solo por Enro pode acarretar problemas tanto econômicos quanto ambientais em função de sua toxicidade.

Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN)

O nitrogênio (N) é um elemento essencial para a biossíntese de proteínas e ácidos nucleicos, desempenhando um papel fundamental no crescimento e desenvolvimento das plantas (Hussain *et al.*, 2019). As plantas absorvem o nitrogênio nas formas de nitrato (NO₃⁻) ou amônio (NH₄⁺). Uma parcela significativa desse nutriente é fornecida pela fixação biológica

de nitrogênio (FBN), que contribui com aproximadamente 60% do nitrogênio fixado globalmente. Em contraste, os fertilizantes químicos fornecem cerca de 25% da demanda total de nitrogênio requerida pelas plantas (Hakim *et al.*, 2020). simbiose leguminosa–rizóbio representa a principal via de FBN em sistemas agrícolas, contribuindo para a redução do uso de fertilizantes nitrogenados e para a promoção de práticas agrícolas sustentáveis (Leng *et al.*, 2023). Dessa forma, os rizóbios desempenham um papel-chave no ciclo global do nitrogênio, oferecendo benefícios econômicos e ambientais em sistemas agrícolas e agroflorestais (Hassen *et al.*, 2023).

A FBN é mediada pela ação enzimática do complexo nitrogenase produzido por microrganismos diazotróficos (Marques *et al.*, 2023). O nitrogênio fixado pode ser incorporado a compostos orgânicos e, no caso da soja, é transportado na forma de ureídeos como alantoína e ácido alantóico, das estruturas nodulares para outras partes da planta, onde são convertidos em aminoácidos e proteínas. Assim, o número de nódulos ativos, caracterizados pela coloração róseo-avermelhada indicativa da presença de leghemoglobina, representa a funcionalidade simbiótica e é essencial para as culturas cujo o suprimento de nitrogênio depende predominantemente da FBN (Armendariz *et al.*, 2019).

No Brasil, cultivares de soja inoculadas com estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* eliminam a necessidade do uso de fertilizantes nitrogenados, resultando em uma economia estimada em US\$ 15 bilhões por safra. Essa eficiência coloca o país entre os maiores produtores mundiais de soja (Marques *et al.*, 2023). No entanto, apesar do sucesso da inoculação em larga escala, a eficácia da nodulação ainda pode ser comprometida por estresses ambientais, como a presença de pesticidas, antimicrobianos e contaminantes metálicos, incluindo oligoelementos (Marques *et al.*, 2023).

Entre os 46 estudos revisados, foram selecionados aqueles que abordam espécies representativas do gênero *Bradyrhizobium* isoladas de leguminosas, com base em sua diversidade taxonômica, distribuição geográfica e relevância ecológica e agrônômica. A Tabela 1 resume as principais estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas, destacando sua variabilidade em relação às condições edafoclimáticas dos locais de coleta. A tabela também inclui informações sobre os microrganismos/estirpes utilizados, a planta hospedeira, a técnica de isolamento, os dados de sequenciamento, as características do solo e o local de coleta.

Tabela 1: Diversidade de cepas de *Bradyrhizobium* isoladas em associação com leguminosas para fixação biológica de nitrogênio

Microorganismo utilizado/Cepa	Cultura vegetal	Técnica de isolamento e meios de cultivo	Sequenciamento	Characteristics do solo	Localização	Citação
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Vigna unguiculata</i> (L.)	Extração de DNA do solo: kit <i>PowerLyzer PowerSoil</i> DNA <i>Isolation</i> (MoBIO)	Sequenciamento de Amplicons 16S rRNA, Illumina MiSeq	P (175 - 125mg kg ⁻¹), Ca (4,5 - 2,1 cmolc kg ⁻¹), Mg (2,0 - 0,9 cmolc kg ⁻¹), K (1,40 - 0,37 cmolc kg ⁻¹), sum of bases (7,7 - 2,5 cmolc kg ⁻¹), and CEC (9,7 - 4,5 cmolc kg ⁻¹)	Brasil	(Amorim <i>et al.</i> , 2022)
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Vigna unguiculata</i> (L.)	Extração de DNA do solo: kit <i>PowerLyzer PowerSoil</i> DNA <i>Isolation</i> (MoBIO)	Sequenciamento de Amplicons 16S rRNA, Illumina MiSeq	P (36 - 3,0 mg kg ⁻¹), Ca (2,4 - 0,3 cmolc kg ⁻¹), Mg (0,8 - 0,4 cmolc kg ⁻¹), K (0,19 - 0,03 cmolc kg ⁻¹), sum of bases (81 - 21	Brasil	(Amorim <i>et al.</i> , 2022)

				cmolc kg ⁻¹), and CEC (4,5 – 4,5 cmolc kg ⁻¹)		
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Vigna unguiculata</i> (L.)	Extração de DNA do solo: <i>kit PowerLyzer PowerSoil DNA Isolation</i> (MoBIO)	Sequenciamento de Amplicons 16S rRNA, Illumina MiSeq	P (25 - 13 mg kg ⁻¹), Ca (2,6 – 0,7 cmolc kg ⁻¹), Mg (1,3 – 0,4 cmolc kg ⁻¹), K (0,28 – 0,02) cmolc kg ⁻¹), sum of bases (68 - 34 cmolc kg ⁻¹) and CEC (6,4 – 3,5 cmolc kg ⁻¹)	Brasil	(Amorim <i>et al.</i> , 2022)
<i>Bradyrhizobium algeriense</i> , <i>Bradyrhizobium valentinum</i> , <i>Bradyrhizobium canariense</i>	<i>Genista ferox</i>	Isolamento por maceração de nódulos / Ágar Levedura-Manitol (YMA)	Análise de Sequenciamento Multilocus (MLSA) - Genes <i>Housekeeping</i> , Sequenciamento por <i>BigDye Terminator</i>	-	Argélia	(Boudehouche <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bradyrhizobium cytisi</i> , <i>Bradyrhizobium rifense</i> , <i>Bradyrhizobium</i>	<i>Genista numidica</i>	Isolamento por maceração de nódulos /	Análise de Sequenciamento Multilocus (MLSA) -	-	Argélia	(Boudehouche <i>et al.</i> , 2020)

<i>Bradyrhizobium algeriense</i>	<i>diazoefficiens</i> ,	Ágar Levedura-Manitol (YMA)	Genes <i>Housekeeping</i> , Sequenciamento por <i>BigDye Terminator</i>			
<i>Bradyrhizobium canariense</i>	<i>Genista tricuspidat</i>	Isolamento por maceração de nódulos / Ágar Levedura-Manitol (YMA)	Análise de Sequenciamento Multilocus (MLSA) - Genes <i>Housekeeping</i> , Sequenciamento por <i>BigDye Terminator</i>	-	Argélia	(Boudehouche <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> , <i>Bradyrhizobium ottawaense</i>	<i>Genista tricuspidat</i>	Isolamento por maceração de nódulos / Ágar Levedura-Manitol (YMA)	Análise de Sequenciamento Multilocus (MLSA) - Genes <i>Housekeeping</i> , Sequenciamento por <i>BigDye Terminator</i>	-	Argélia	(Boudehouche <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bradyrhizobium</i> sp. VrB1	<i>Vigna radiata</i> (L.)	Isolamento por maceração de nódulos / Ágar Levedura-Manitol (YMA) com adição de Vermelho Congo, Meio Luria-Bertani (LB). Kit	Amplificação do gene 16S rRNA, Sequenciamento Illumina	pH: 7,84 ±0,15; OM: 0,629 ± 0,04; N: 0,0066 ± 0,001 µg/g; P: 3,27 ± 0,14	Paquistão	(Hakim <i>et al.</i> , 2020)

		de isolamento de DNA (MP Biomedicals, Santa Ana, Califórnia, EUA)		$\mu\text{g/g}$; K: $72 \pm 3,61$ $\mu\text{g/g}$.		
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Tephrosia apollinea</i>	Isolamento por maceração de nódulos / Ágar Levedura-Manitol (YMA)	-	-	Emirados Árabes Unidos	(Hussain <i>et al.</i> , 2019)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (USDA6)	<i>Aeschynomene montevidensis</i>	Isolamento por maceração de nódulos / Ágar Levedura-Manitol (YMA) suplementado com glutamato, Extração de DNA genômico, e amplificação do gene 16S rRNA por PCR	Sequenciamento Sanger	-	Uruguai	(Pereira-Gómez <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (USDA6)	<i>Indigofera suffruticosa</i>	Isolamento por maceração de nódulos / Ágar Levedura-Manitol (YMA) suplementado com glutamato, extração	Sequenciamento Sanger	-	Uruguai	(Pereira-Gómez <i>et al.</i> , 2020)

de DNA genômico, e
amplificação do gene
16S rRNA por PCR

<i>Bradyrhizobium stylosanthis</i> (BR446)	<i>Stylosanthes</i> <i>guianensis</i>	Isolamento por maceração de nódulos / Ágar Levedura-Manitol (YMA) suplementado com glutamato, extração de DNA genômico, e amplificação do gene 16S rRNA por PCR	Sequenciamento Sanger	-	Uruguai	(Pereira-Gómez <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bradyrhizobium stylosanthis</i> (BR446)	<i>Tephrosia cinerea</i>	Isolamento por maceração de nódulos / Ágar Levedura-Manitol (YMA) suplementado com glutamato, extração de DNA genômico, e amplificação do gene 16S rRNA por PCR	Sequenciamento Sanger	-	Uruguai	(Pereira-Gómez <i>et al.</i> , 2020)

<i>Bradyrhizobium betae</i> (PL7HG1)	<i>Erythrina crista-galli</i>	Isolamento por maceração de nódulos / Ágar Levedura-Manitol (YMA) suplementado com glutamato, extração de DNA genômico, e amplificação do gene 16S rRNA por PCR	Sequenciamento Sanger	-	Uruguai	(Pereira-Gómez <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bradyrhizobium guangdongense</i> (CCBAU51649)	<i>Inga vera</i>	Isolamento por maceração de nódulos / Ágar Levedura-Manitol (YMA) suplementado com glutamato, extração de DNA genômico, e amplificação do gene 16S rRNA por PCR	Sequenciamento Sanger	-	Uruguai	(Pereira-Gómez <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bradyrhizobium quistisi</i> (CTAW11)	<i>Vigna luteola</i>	Isolamento por maceração de nódulos / Ágar Levedura-Manitol (YMA) suplementado com glutamato, extração	Sequenciamento Sanger	-	Uruguai	(Pereira-Gómez <i>et al.</i> , 2020)

		de DNA genômico, e amplificação do gene 16S rRNA por PCR				
<i>Bradyrhizobium oligotrophicum</i>	<i>Aeschynomene denticulata</i>	Isolamento por maceração de nódulos / Ágar Levedura-Manitol (YMA) suplementado com glutamato, extração de DNA genômico, e amplificação do gene 16S rRNA por PCR	Sequenciamento Sanger	-	Uruguai	(Pereira-Gómez <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bradyrhizobium</i> sp. (Oc8)	<i>Crotalaria ochroleuca</i>	Isolamento por maceração de nódulos / Ágar Extrato de Levedura-Manitol (YEM); extração de DNA: kit QIAamp DNA Micro (Qiagen)	Illumina NovaSeq, leitura pareada (paired-end, PE), 2 × 151 pb	-	Uruguai	(Berriel <i>et al.</i> , 2021)
<i>Bradyrhizobium xenonodulans</i> sp. nov.	<i>Acacia mearnsii</i>	Isolamento por maceração de nódulos / Ágar Levedura-Manitol	Oxford Nanopore (MinION, kit SQK- LSK108) e Illumina	-	África do Sul	(Claassens <i>et al.</i> , 2023)

		(YMA); extração de DNA: Qiagen Genomic-tip 20/G	MiSeq (leitura pareada de 300 pb)			
<i>Bradyrhizobium xenonodulans</i> sp. nov.	<i>Acacia dealbata</i>	Isolamento por maceração de nódulos / Ágar Levedura-Manitol (YMA); extração de DNA: Qiagen Genomic-tip 20/G.	Oxford Nanopore (MinION, kit SQK-LSK108) e Illumina MiSeq (leitura pareada de 300 pb)	-	África do Sul	(Claassens <i>et al.</i> , 2023)
<i>Bradyrhizobium</i> spp. (SEMIA 6144)	<i>Arachis hypogaea</i> (L.)	Raízes e nódulos isolados em Ágar Levedura-Manitol (YMA); extração de DNA: kit NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel)	Sequenciamento Sanger	-	Índia	(Das <i>et al.</i> , 2019)
<i>Bradyrhizobium nanningense</i> sp. nov. (CCBAU 53390T)	<i>Arachis hypogaea</i> (L.)	Isolamento por maceração de nódulos / Ágar Levedura-Manitol (YMA); extração de DNA: Wizard Genomic	Sequenciamento por Sanger, HiSeq com leitura pareada (paired-end) e tecnologia PacBio	-	China	(Li <i>et al.</i> , 2019)

		DNA Purification Kit A1120 (Promega)				
<i>Bradyrhizobium guangzhouense</i> sp. (CCBAU 51670T)	<i>Arachis hypogaea</i> (L.)	Isolamento por maceração de nódulos / Ágar Levedura-Manitol (YMA); extração de DNA: Wizard Genomic DNA Purification Kit A1120 (Promega)	Sequenciamento por Sanger, HiSeq com leitura pareada (paired-end) e tecnologia PacBio	-	China	(Li <i>et al.</i> , 2019)
<i>Bradyrhizobium zhanjiangense</i> sp. nov. (CCBAU 51778T)	<i>Arachis hypogaea</i> (L.)	Isolamento por maceração de nódulos / Ágar Levedura-Manitol (YMA); extração de DNA: Wizard Genomic DNA Purification Kit A1120 (Promega)	Sequenciamento por Sanger, HiSeq com leitura pareada (paired-end) e tecnologia PacBio	-	China	(Li <i>et al.</i> , 2019)
<i>Bradyrhizobium</i> sp. (UFPI-06)	<i>Phaseolus lunatus</i> (L.)	Isolamento por maceração de nódulos / Ágar Levedura-Manitol (YMA), suplementado com 5 g L ⁻¹ de manitol	Sequenciamento Sanger	Red Yellow Podzol, pH: 7,2; (OM): 2,4 g dm ⁻³ ; P: 1,8 mg kg ⁻¹ ; K: 95,9 mg kg ⁻¹ , Ca: 1,6 cmolc	Brasil	(Chibeba <i>et al.</i> , 2020)

		e 0,00125% de vermelho do Congo		kg ⁻¹ ; Mg: 0,9 cmolc kg ⁻¹		
<i>Bradyrhizobium</i> sp. (UFPI-16)	<i>Phaseolus lunatus</i> (L.)	Isolamento por maceração de nódulos / Ágar Levedura-Manitol (YMA), suplementado com 5 g L ⁻¹ de manitol e 0,00125% de vermelho do Congo	Sequenciamento Sanger	Red Yellow Podzol, pH: 7,2; (OM): 2,4 g dm ⁻³ ; P: 1,8 mg kg ⁻¹ ; K: 95,9 mg kg ⁻¹ , Ca: 1,6 cmolc kg ⁻¹ ; Mg: 0,9 cmolc kg ⁻¹	Brasil	(Chibeba <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bradyrhizobium</i> sp. (UFPI-26)	<i>Phaseolus lunatus</i> (L.)	Isolamento por maceração de nódulos / Ágar Levedura-Manitol (YMA), suplementado com 5 g L ⁻¹ de manitol e 0,00125% de vermelho do Congo	Sequenciamento Sanger	Red Yellow Podzol, pH: 7,2; (OM): 2,4 g dm ⁻³ ; P: 1,8 mg kg ⁻¹ ; K: 95,9 mg kg ⁻¹ , Ca: 1,6 cmolc kg ⁻¹ ; Mg: 0,9 cmolc kg ⁻¹	Brasil	(Chibeba <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bradyrhizobium</i> sp. (UFPI-31)	<i>Phaseolus lunatus</i> (L.)	Isolamento por maceração de nódulos / Ágar Levedura-Manitol (YMA), suplementado	Sequenciamento Sanger	Red Yellow Podzol, pH: 7,2; (OM): 2,4 g dm ⁻³ ; P: 1,8 mg kg ⁻¹ ; K: 95,9 mg	Brasil	(Chibeba <i>et al.</i> , 2020)

		com 5 g L ⁻¹ de manitol e 0,00125% de vermelho do Congo		kg ⁻¹ , Ca: 1,6 cmolc kg ⁻¹ ; Mg: 0,9 cmolc kg ⁻¹		
<i>Bradyrhizobium</i> sp. (UFPI-32)	<i>Phaseolus lunatus</i> (L.)	Isolamento por maceração de nódulos / Ágar Levedura-Manitol (YMA), suplementado com 5 g L ⁻¹ de manitol e 0,00125% de vermelho do Congo	Sequenciamento Sanger	Red Yellow Podzol, pH: 7,2; (OM): 2,4 g dm ⁻³ ; P: 1,8 mg kg ⁻¹ ; K: 95,9 mg kg ⁻¹ , Ca: 1,6 cmolc kg ⁻¹ ; Mg: 0,9 cmolc kg ⁻¹	Brasil	(Chibeba <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bradyrhizobium</i> sp. (UFPI-50)	<i>Phaseolus lunatus</i> (L.)	Isolamento por maceração de nódulos / Ágar Levedura-Manitol (YMA), suplementado com 5 g L ⁻¹ de manitol e 0,00125% de vermelho do Congo	Sequenciamento Sanger	Red Yellow Podzol, pH: 7,2; (OM): 2,4 g dm ⁻³ ; P: 1,8 mg kg ⁻¹ ; K: 95,9 mg kg ⁻¹ , Ca: 1,6 cmolc kg ⁻¹ ; Mg: 0,9 cmolc kg ⁻¹	Brasil	(Chibeba <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bradyrhizobium</i> (ALSPC3051)	<i>Cajanus cajan</i> (L.)	Isolamento por maceração de nódulos / Ágar Levedura-Manitol	Sequenciamento Sanger	-	República Dominicana	(Araujo <i>et al.</i> , 2020)

		(YMA); extração do 16S rRNA para RAPD (DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso)				
<i>Bradyrhizobium</i> (AMBPC1040)	<i>Cajanus cajan</i> (L.)	Isolamento por maceração de nódulos / Ágar Levedura-Manitol (YMA); extração do 16S rRNA para RAPD (DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso)	Sequenciamento Sanger	-	República Dominicana	(Araujo <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bradyrhizobium</i> (AMBPC1010)	<i>Cajanus cajan</i> (L.)	Isolamento por maceração de nódulos / Ágar Levedura-Manitol (YMA); extração do 16S rRNA para RAPD (DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso)	Sequenciamento Sanger	-	República Dominicana	(Araujo <i>et al.</i> , 2020)

<i>Bradyrhizobium arachidis</i> (60,890; 62,318; 65,078; 65,090)	<i>Arachis hypogaea</i> (L.)	Isolamento a partir de nódulo / Ágar Levedura- Manitol (YMA); extração de DNA genômico: kit Tiangen Genomic DNA (Tiangen)	Sequenciamento Sanger	-	China	(Shao <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bradyrhizobium liaoningense</i> (60,896; 60,904; 65,059)	<i>Arachis hypogaea</i> (L.)	Isolamento a partir de nódulo / Ágar Levedura- Manitol (YMA); extração de DNA genômico: kit Tiangen Genomic DNA (Tiangen)	Sequenciamento Sanger	-	China	(Shao <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bradyrhizobium ottawaense</i> (60,894; 62,303; 62,250; 62,311; 62,325)	<i>Arachis hypogaea</i> (L.)	Isolamento a partir de nódulo / Ágar Levedura- Manitol (YMA); extração de DNA genômico: kit Tiangen Genomic DNA (Tiangen)	Sequenciamento Sanger	-	China	(Shao <i>et al.</i> , 2020)

<i>Bradyrhizobium guangdongense</i> (61,102; 61,103)	<i>Arachis hypogaea</i> (L.)	Isolamento a partir de nódulo / Ágar Levedura-Manitol (YMA); extração de DNA genômico: kit Tiangen Genomic DNA (Tiangen)	Sequenciamento Sanger	-	China	(Shao <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> (65,010)	<i>Arachis hypogaea</i> (L.)	Isolamento a partir de nódulo / Ágar Levedura-Manitol (YMA); extração de DNA genômico: kit Tiangen Genomic DNA (Tiangen)	Sequenciamento Sanger	-	China	(Shao <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bradyrhizobium huanghuaihaiense</i> (65,027)	<i>Arachis hypogaea</i> (L.)	Isolamento a partir de nódulo / Ágar Levedura-Manitol (YMA); extração de DNA genômico: kit Tiangen Genomic DNA (Tiangen)	Sequenciamento Sanger	-	China	(Shao <i>et al.</i> , 2020)

<i>Bradyrhizobium stylosanthis</i> (61,077)	<i>Arachis hypogaea</i> (L.)	Isolamento a partir de nódulo / Ágar Levedura-Manitol (YMA); extração de DNA genômico: kit Tiangen Genomic DNA (Tiangen)	Sequenciamento Sanger	-	China	(Shao <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bradyrhizobium</i> (nov. sp.) (60,954; 65,054)	<i>Arachis hypogaea</i> (L.)	Isolamento a partir de nódulo / Ágar Levedura-Manitol (YMA); extração de DNA genômico: kit Tiangen Genomic DNA (Tiangen)	Sequenciamento Sanger	-	China	(Shao <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bradyrhizobium</i> (GMF14)	<i>Glycine max</i> (L.)	Inóculo cultivado em Extrato de Levedura-Manitol (YEM); kit de extração de DNA não informado	Análise de Sequência de Multilocus (MLSA)	C: 6,5 ± 0,71 g kg ⁻¹ ; N: 0,5 ± 0,03 g kg ⁻¹ ; S: 0,2 ± 0,02 g kg ⁻¹ ; P: 20,9 ± 0,35 mg 100 g ⁻¹ ; Mg: 1,4 ± 0,08 mg 100 g ⁻¹ ;	Alemanha	(Omari <i>et al.</i> , 2022)

pH: 6,7; Sand: 61;
Silt: 27; Clay: 12

<i>Bradyrhizobium</i> (GMM36)	<i>Glycine max</i> (L.)	Inóculo cultivado em Extrato de Levedura-Manitol (YEM); kit de extração de DNA não informado	Análise de Sequência de Multilocus (MLSA)	C: $6.5 \pm 0,71 \text{ g kg}^{-1}$; N: $0,5 \pm 0,03 \text{ g kg}^{-1}$; S: $0,2 \pm 0,02 \text{ g kg}^{-1}$; P: $20,9 \pm 0,35 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$; Mg: $1,4 \pm 0,08 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$; pH: 6,7; Sand: 61; Silt: 27; Clay: 12	Alemanha	(Omari <i>et al.</i> , 2022)
<i>Bradyrhizobium</i> (GEM96)	<i>Glycine max</i> (L.)	Inóculo cultivado em Extrato de Levedura-Manitol (YEM); kit de extração de DNA não informado	Análise de Sequência de Multilocus (MLSA)	C: $6.5 \pm 0,71 \text{ g kg}^{-1}$; N: $0,5 \pm 0,03 \text{ g kg}^{-1}$; S: $0,2 \pm 0,02 \text{ g kg}^{-1}$; P: $20,9 \pm 0,35 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$; Mg: $1,4 \pm 0,08 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$; pH: 6,7; Sand: 61; Silt: 27; Clay: 12	Alemanha	(Omari <i>et al.</i> , 2022)

TOC = Total organic carbon; OM = Organic matter

Culturas associadas e diversidade simbiótica do gênero Bradyrhizobium

Os dados apresentados na Tabela 1 sintetizam estudos sobre o isolamento de *Bradyrhizobium* a partir de leguminosas e sua relevância como alternativa sustentável aos fertilizantes nitrogenados. Entre as culturas mais frequentemente associadas a esses microrganismos, destacam-se o amendoim (*Arachis hypogaea*), o feijão-lima (*Phaseolus lunatus*), o feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), o feijão-guandu (*Cajanus cajan*) e a soja (*Glycine max*). No que se refere às espécies do gênero *Bradyrhizobium*, sobressaem-se *Bradyrhizobium sp.*, *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium stylosanthis*, se destacam devido à sua eficiência amplamente documentada na fixação biológica de nitrogênio (FBN). As pesquisas sobre a interação simbiótica entre *Bradyrhizobium* e leguminosas são particularmente expressivas no Brasil, China e Uruguai, refletindo um interesse global na otimização da FBN em sistemas agrícolas.

Entre as metodologias empregadas para o isolamento e a identificação dessas estirpes, o uso do meio Ágar Manitol com Extrato de Levedura (YMA) e de técnicas de sequenciamento, como o sequenciamento do gene 16S rRNA e análises metagenômicas, possibilita uma caracterização mais abrangente da diversidade simbiótica.

Influência dos fatores ambientais na nodulação

É amplamente reconhecido que a eficiência da fixação biológica de nitrogênio (FBN) pode ser influenciada por fatores ambientais, diversidade microbiana e compatibilidade entre simbionte e hospedeiro. O estudo de Amorim *et al.* (2022) analisou a composição microbiana de nódulos do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) em seis áreas de três regiões distintas do Brasil. As análises demonstraram que, mesmo diante das variações físico-químicas entre os solos, a comunidade bacteriana associada aos nódulos foi amplamente dominada pelos gêneros *Bradyrhizobium* (97%) e *Rhizobium* (2,63%). Esse padrão sugere um processo de coevolução entre a planta hospedeira e esses microrganismos, no qual ocorre uma seleção mútua que favorece associações mais eficientes. Assim, mais do que uma simples influência das condições do solo, observa-se que a interação planta-bactéria resulta de adaptações ao longo do tempo, garantindo a colonização preferencial por simbiontes especializados.

Além disso, a presença de apenas 0,03% de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) nos nódulos, em comparação com 99,3% de OTUs exclusivas do solo, reforça a

hipótese de seletividade mediada pelo hospedeiro e evidencia a distinção entre a microbiota da rizosfera e a comunidade recrutada para a simbiose.

O estudo de Boudehouche *et al.* (2020) também confirmou esse comportamento seletivo, demonstrando que diferentes espécies de *Genista* se associam preferencialmente a linhagens específicas de *Bradyrhizobium*.

Entretanto, há certa divergência entre os estudos quanto ao papel dos fatores ambientais. Enquanto Amorim *et al.* (2022) concluíram que a composição dos nódulos não varia significativamente entre diferentes tipos de solos, sugerindo que a planta seleciona seus simbioses de forma independente das condições edáficas, Boudehouche *et al.* (2020) sugeriram que o ambiente pode afetar a distribuição de determinados simbioses. Embora a seletividade da planta permaneça predominante, seus resultados indicam que, no caso de *Genista*, as condições edáficas podem exercer um papel mais relevante na estruturação das comunidades simbióticas do que no caso do feijão-caupi.

A análise de sequências multilocus (MLSA) realizada por Boudehouche *et al.* (2020) permitiu a identificação de sete espécies distintas de *Bradyrhizobium*, revelando elevada diversidade genética e um potencial de adaptação a diferentes condições ambientais. Esses autores relataram discrepâncias entre árvores filogenéticas baseadas em genes housekeeping e aquelas associadas à ilha de simbiose (IS), indicando a ocorrência frequente de eventos de transferência horizontal de genes relacionados à FBN e à nodulação. Em contraste, Amorim *et al.* (2022) não abordaram diretamente esse aspecto genético, mas seus resultados sugerem que a seleção dos simbioses ocorre de forma consistente, o que pode ser interpretado como evidência de relações co-evolutivas mais consolidadas.

Pereira-Gómez *et al.* (2020) investigaram a diversidade de rizóbios associados a leguminosas nativas em um ecossistema heterogêneo no Uruguai e identificaram os seguintes gêneros simbióticos: *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Paraburkholderia* e *Cupriavidus*, indicando que diferentes espécies de leguminosas podem recrutar simbioses distintos em função das condições ecológicas regionais. Esses achados reforçam a ideia de que a nodulação é um processo seletivo governado pela planta hospedeira e que a distribuição dos rizóbios pode ser modulada por fatores ambientais, como o tipo de solo e o microclima. Adicionalmente, a variação morfológica dos nódulos observada entre diferentes leguminosas sugere que a estrutura nodular pode constituir um caráter taxonômico relevante na classificação das interações simbióticas.

Os estudos de Hakim *et al.* (2020) e Hussain *et al.* (2019) fornecem importantes contribuições para a compreensão das relações simbióticas entre rizóbios e leguminosas. Ambos concordam que múltiplos gêneros rizobianos podem estar envolvidos no processo de nodulação, com predominância de *Bradyrhizobium* e *Ensifer* em *Vigna radiata* (Hakim *et al.*, 2020) e de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* em *Tephrosia apollinea* (Hussain *et al.*, 2019). Esses resultados são consistentes com os achados de Amorim *et al.* (2022), especialmente no que se refere à seletividade do hospedeiro no recrutamento dos simbioss, evidenciada pela estabilidade da microbiota nodular mesmo diante de elevada diversidade microbiana no solo.

A pesquisa conduzida por Hakim *et al.* (2020) enfatizou a diversidade e a distribuição espacial das populações rizobianas, em vez de avaliar diretamente a eficiência da fixação biológica de nitrogênio sob diferentes condições ambientais. Os autores sugerem que a distribuição dos simbioss está mais relacionada a propriedades do solo, como o teor de matéria orgânica e a disponibilidade de fósforo. Em contraste, o estudo de Hussain *et al.* (2019) utilizou isótopos estáveis de carbono e nitrogênio para demonstrar que o estresse hídrico não apenas reduz a nodulação, mas também afeta a assimilação de carbono e a eficiência do uso da água. Os resultados mostraram que o estresse hídrico diminuiu significativamente tanto o número quanto o peso dos nódulos. Sob condições de seca induzidas por polietilenoglicol (PEG), o número médio de nódulos em *T. apollinea* foi reduzido de 30 em plantas controle para apenas um em plantas submetidas a 15% de PEG, enquanto o peso total dos nódulos caiu de 32,3 mg para 0,08 mg por planta. Esses achados destacam a importância de considerar tanto a variabilidade dos simbioss quanto os estressores ambientais no desenvolvimento de estratégias para otimizar a FBN, especialmente em regiões áridas ou em sistemas agrícolas com limitação hídrica.

Investigações de Claassens *et al.* (2023) explorou a diversidade simbiótica no contexto da introdução de uma nova espécie de *Acacia* na África do Sul. Os autores isolaram uma nova espécie de *Bradyrhizobium*, denominada *Bradyrhizobium xenonodulans*, a partir de nódulos de *Acacia dealbata* e *Acacia mearnsii*. A introdução de *Acacia* em solos africanos alterou a microbiota da rizosfera, favorecendo simbioss exóticos e potencialmente deslocando rizóbios nativos, o que pode afetar significativamente a dinâmica da fixação de nitrogênio no solo. Os autores também discutiram como a simbiose entre *Bradyrhizobium* e *Acacia* pode impactar negativamente os ecossistemas nativos. Essa perspectiva levanta importantes implicações

ecológicas e ressalta a necessidade de uma compreensão mais ampla sobre como a introdução de simbioses não nativos pode influenciar os ecossistemas naturais.

Estudos recentes indicam que o uso de estirpes nativas de *Bradyrhizobium* é mais eficaz na promoção da nodulação e da produtividade em guandu (*Cajanus cajan*) e soja (*Glycine max*) do que o uso de inoculantes comerciais (Araujo *et al.*, 2020; Omari *et al.*, 2022). Em ambos os estudos, a eficiência da inoculação foi influenciada pela umidade do solo e pela densidade de rizóbios nativos, sugerindo que a seleção de estirpes bem adaptadas é essencial para maximizar a FBN. No entanto, Araujo *et al.* (2020) relataram que uma alta densidade de rizóbios nativos pode limitar a resposta das plantas à inoculação, tornando a introdução de novas estirpes menos eficaz em solos já colonizados por simbioses, mesmo quando estes apresentam baixa eficiência. Outro fator limitante para a otimização da FBN, conforme descrito por Omari *et al.* (2022), é a disponibilidade hídrica, que influencia diretamente a nodulação e a absorção de nitrogênio em soja. Estirpes como GEM96 e GMM36 apresentaram melhor desempenho sob condições adequadas de irrigação.

Novas espécies e potenciais simbióticos emergentes

Um estudo sobre monocultivo de amendoim demonstrou que o cultivo repetido ao longo dos anos reduziu a diversidade de *Bradyrhizobium* no solo, favorecendo a predominância de estirpes menos eficientes na fixação biológica de nitrogênio (FBN) (Shao *et al.*, 2020). O estudo também relatou que o carbono orgânico do solo, o nitrogênio total, o fósforo disponível e o potássio disponível foram os principais fatores que afetaram a composição da comunidade rizobiana. Além disso, ao avaliar a competição microbiana, *B. liaoningense* apresentou maior competitividade e passou a dominar as populações simbióticas após anos de monocultivo. Como o estudo também avaliou a transferência horizontal de genes e adaptações simbióticas, sugeriu-se que trocas genéticas possam ter contribuído para a adaptação das linhagens dominantes, permitindo que se tornassem mais competitivas ao longo do tempo.

Explorando os mecanismos moleculares que regulam a FBN em *Bradyrhizobium*, Das *et al.* (2019), relataram a influência da regulação gênica, de fatores ambientais e da transferência horizontal de genes sobre a eficiência simbiótica. O estudo identificou o gene AhCYCLOPS como um fator essencial no desenvolvimento de nódulos em *Arachis hypogaea* (amendoim), regulando a interação simbiótica com *Bradyrhizobium*. Berriel *et al.* (2021) identificaram a estirpe *Bradyrhizobium* Oc8, isolada de nódulos de *Crotalaria ochroleuca* no Uruguai, demonstrando sua eficácia em nodular outras leguminosas como *C. juncea*, *C. spectabilis* e

Cajanus cajan. A análise filogenética baseada nos genes *recA* e *ftsA* revelou baixa identidade com espécies conhecidas de *Bradyrhizobium*, sustentando a hipótese de uma nova espécie simbiótica. No entanto, análises adicionais, como a hibridização digital DNA-DNA (dDDH) e testes fenotípicos detalhados, ainda são necessárias para confirmar sua classificação como uma nova espécie.

A identificação de novas espécies foi relatada na Tabela 1, conforme evidenciado pelo estudo de Li *et al.* (2019), que se concentrou na caracterização molecular e taxonômica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de *Arachis hypogaea* na China. O estudo utilizou o sequenciamento do gene 16S rRNA e a análise de sequências multilocus (MLSA) para identificar novas linhagens rizobianas, demonstrando que a diversidade de *Bradyrhizobium* associada ao amendoim é maior do que a previamente descrita. A caracterização funcional revelou genes-chave para a nodulação e a FBN, como aqueles envolvidos na síntese de fatores Nod e na regulação das interações planta–rizóbio. Esses achados reforçam a ideia de que a compatibilidade simbiótica é amplamente determinada pela identidade genética dos simbioss, independentemente do ambiente em que ocorrem. Além disso, o estudo sugere que a introdução de estirpes geneticamente modificadas pode superar barreiras ambientais, possibilitando a seleção de simbioss altamente eficientes para aplicações agrícolas em diferentes regiões.

De modo geral, os estudos revisados destacam que a nodulação e a fixação de nitrogênio são processos influenciados pelas interações entre o microbioma do solo, a plasticidade genética dos simbioss e a capacidade seletiva da planta hospedeira. A dominância do gênero *Bradyrhizobium* nos nódulos de diversas leguminosas reflete sua elevada eficiência simbiótica e sua forte capacidade adaptativa a diferentes hospedeiros. A Tabela 2 sintetiza as principais associações rizóbio–planta descritas na literatura, destacando a diversidade de estirpes, suas plantas hospedeiras e a distribuição geográfica. Esses dados evidenciam a diversidade ecológica do gênero *Bradyrhizobium* e sua importância como inoculante em sistemas agrícolas.

A Tabela 2 sintetiza as principais associações entre rizóbio–planta descritas na literatura, destacando a diversidade de cepas, suas plantas hospedeiras e a distribuição geográfica. Esses dados evidenciam a diversidade ecológica do gênero *Bradyrhizobium* e sua importância como inoculante para culturas em sistemas agrícolas.

Tabela 2: Inoculação de estirpes de *Bradyrhizobium* em associação com leguminosas para a fixação biológica de nitrogênio

Microrganismo utilizado/Cepas	Cultura vegetal	Localização	Citação
<i>Bradyrhizobium</i> sp. (Oc8)	<i>Crotalaria ochroleuca</i>	Uruguai	(Berriel <i>et al.</i> , 2021)
<i>Bradyrhizobium</i> sp. (Oc8)	<i>Crotalaria juncea</i> (L.)	Uruguai	(Berriel <i>et al.</i> , 2021)
<i>Bradyrhizobium</i> sp. (Oc8)	<i>Crotalaria spectabilis</i>	Uruguai	(Berriel <i>et al.</i> , 2021)
<i>Bradyrhizobium</i> sp. (Oc8)	<i>Cajanus cajan</i> (L.)	Uruguai	(Berriel <i>et al.</i> , 2021)
<i>Bradyrhizobium shewense</i> (AU27)	<i>Erythrina brucei</i>	Etiópia	(Beyene <i>et al.</i> , 2022)
<i>Bradyrhizobium cytisi</i> (HU3)	<i>Erythrina brucei</i>	Etiópia	(Beyene <i>et al.</i> , 2022)
<i>Bradyrhizobium cajani</i> (HO2)	<i>Erythrina brucei</i>	Etiópia	(Beyene <i>et al.</i> , 2022)
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> (USDA110)	<i>Glycine max</i> (L.)	Japão	(Suliman <i>et al.</i> , 2019)
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> (CB1809)	<i>Glycine max</i> (L.)	Japão	(Suliman <i>et al.</i> , 2019)
<i>Bradyrhizobium</i> sp. (SEMIA 6462)	<i>Vigna unguiculata</i> (L.)	Brasil	(Galindo <i>et al.</i> , 2021)

<i>Bradyrhizobium</i> sp. (SEMIA 6463)	<i>Vigna unguiculata</i> (L.)	Brasil	(Galindo <i>et al.</i> , 2021)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (E109)	<i>Glycine max</i> (L.)	Argentina	(Groppa <i>et al.</i> , 2022)
<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> (Vr50)	<i>Vigna radiata</i> (L.)	Paquistão	(Hakim <i>et al.</i> , 2023)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Vigna unguiculata</i> (L.)	Irã	(Hamzavi <i>et al.</i> , 2022)
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> (ESTIRPE WB1)	<i>Vigna subterranea</i> (L.)	África do Sul	(Hassen <i>et al.</i> , 2023)
<i>Bradyrhizobium zhangangense</i> (ESTIRPE XBD2)	<i>Vigna subterranea</i> (L.)	África do Sul	(Hassen <i>et al.</i> , 2023)
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> (ESTIRPE XBQ5)	<i>Vigna subterranea</i> (L.)	África do Sul	(Hassen <i>et al.</i> , 2023)
<i>Bradyrhizobium centrosematis</i> (ESTIRPE XS34)	<i>Vigna subterranea</i> (L.)	África do Sul	(Hassen <i>et al.</i> , 2023)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (AC20)	<i>Glycine max</i> (L.)	China	(Jiang <i>et al.</i> , 2023)
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> (Y63-1)	<i>Glycine max</i> (L.) (Zhongdou 63)	China	(Leng <i>et al.</i> , 2023)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (USDA110)	<i>Glycine max</i> (L.) (Zhongdou 63)	China	(Leng <i>et al.</i> , 2023)
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> (113-2)	<i>Glycine max</i> (L.) (Zhongdou 63)	China	(Leng <i>et al.</i> , 2023)

<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Glycine max</i> (L.) (cultivar 95Y52)	Brasil	(Marques <i>et al.</i> , 2023)
<i>Bradyrhizobium</i> sp. (CEPA USDA 3456)	<i>Vigna unguiculata</i> (L.)	Quênia	(Muindi <i>et al.</i> , 2021)
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> (U-1301)	<i>Glycine max</i> (L.)	Uruguai	(Riviezzi <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> (U-1302)	<i>Glycine max</i> (L.)	Uruguai	(Riviezzi <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	<i>Lotus corniculatus</i> (L.)	Polônia	(Sujkowska-Rybkowska <i>et al.</i> , 2022)
<i>Bradyrhizobium</i> sp. (IC-4059 - NAIMCC-B-00252)	<i>Cajanus cajan</i> (L.)	Índia	(Tewari <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> (USDA110)	<i>Glycine max</i> (L.)	Espanha	(Tortosa <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (SEMIA 5079)	<i>Arachis hypogaea</i> (L.)	África do Sul	(Udeh <i>et al.</i> , 2023)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (SEMIA 5080)	<i>Arachis hypogaea</i> (L.)	África do Sul	(Udeh <i>et al.</i> , 2023)
<i>Bradyrhizobium frederickii</i> sp. nov.	<i>Chamaecrista fasciculata</i>	Brasil	(Urquiaga <i>et al.</i> , 2019)
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> (USDA110)	<i>Cajanus cajan</i> (L.)	Estados Unidos da América	(Alaswad <i>et al.</i> , 2019)
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> (USDA110)	<i>Cajanus cajan</i> (L.)	Estados Unidos da América	(Alaswad <i>et al.</i> , 2019)

<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (USDA 136)	<i>Glycine max</i> (L.)	Estados Unidos da América	(Arachchige <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (USDA 138)	<i>Glycine max</i> (L.)	Estados Unidos da América	(Arachchige <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (USDA 442)	<i>Glycine max</i> (L.)	Estados Unidos da América	(Arachchige <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (TAL379)	<i>Phaseolus vulgaris</i> (L.)	Finlândia	(Aserse <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> (SBR2B)	<i>Phaseolus vulgaris</i> (L.)	Finlândia	(Aserse <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> (SBR8B)	<i>Phaseolus vulgaris</i> (L.)	Finlândia	(Aserse <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bradyrhizobium</i> sp. (SBR6)	<i>Phaseolus vulgaris</i> (L.)	Finlândia	(Aserse <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bradyrhizobium</i> genosp. SA2 strain (SBR1B)	<i>Phaseolus vulgaris</i> (L.)	Finlândia	(Aserse <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> (SBR7B)	<i>Phaseolus vulgaris</i> (L.)	Finlândia	(Aserse <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> (SBR5B)	<i>Phaseolus vulgaris</i> (L.)	Finlândia	(Aserse <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> (SBR7A)	<i>Phaseolus vulgaris</i> (L.)	Finlândia	(Aserse <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Vigna unguiculata</i> (L.)	Namíbia	(Becker <i>et al.</i> , 2023)

<i>Bradyrhizobium japonicum</i> strain (SEMIA 566)	<i>Glycine max</i> (L.)	Brasil	(Bender <i>et al.</i> , 2022)
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> parental strain (SEMIA 586)	<i>Glycine max</i> (L.)	Brasil	(Bender <i>et al.</i> , 2022)
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> (SEMIA 587)	<i>Vigna radiata</i> (L.)	Brasil	(Favero <i>et al.</i> , 2022)
<i>Bradyrhizobium viridifuturi</i> (UFLA 3-84)	<i>Vigna radiata</i> (L.)	Brasil	(Favero <i>et al.</i> , 2022)
<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> (BR 3267)	<i>Vigna radiata</i> (L.)	Brasil	(Favero <i>et al.</i> , 2022)
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> (INPA 03-11B)	<i>Vigna radiata</i> (L.)	Brasil	(Favero <i>et al.</i> , 2022)
<i>Bradyrhizobium</i> (GMF14)	<i>Glycine max</i> (L.)	Alemanha	(Omari <i>et al.</i> , 2022)
<i>Bradyrhizobium</i> (GMM36)	<i>Glycine max</i> (L.)	Alemanha	(Omari <i>et al.</i> , 2022)
<i>Bradyrhizobium</i> (GEM96)	<i>Glycine max</i> (L.)	Alemanha	(Omari <i>et al.</i> , 2022)
<i>Bradyrhizobium</i> (USDA110)	<i>Glycine max</i> (L.)	Alemanha	(Omari <i>et al.</i> , 2022)
<i>Bradyrhizobium</i> (CEPA KNUST 1002)	<i>Arachis hypogaea</i> (L.)	Gana	(Osei <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bradyrhizobium</i> (CEPA KNUST 1006)	<i>Arachis hypogaea</i> (L.)	Gana	(Osei <i>et al.</i> , 2020)

<i>Bradyrhizobium</i> (CEPA KNUST 1002)	<i>Vigna unguiculata</i> (L.)	Gana	(Osei et al., 2020)
<i>Bradyrhizobium</i> (CEPA KNUST 1006)	<i>Vigna unguiculata</i> (L.)	Gana	(Osei et al., 2020)
<i>Bradyrhizobium</i> sp. (SEMIA 6144)	<i>Arachis hypogaea</i> 'Tifrunner'	Estados Unidos da América	(Raul et al., 2022)
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> (USDA 110)	<i>Glycine max</i> (L.)	Espanha	(Salas et al., 2020)
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> (CEPA 4001 bjgb)	<i>Glycine max</i> (L.)	Espanha	(Salas et al., 2020)

Síntese geral da inoculação de estirpes

Os dados apresentados na Tabela 2 reúnem informações sobre a inoculação de estirpes de *Bradyrhizobium* em leguminosas de importância econômica. Entre as espécies do gênero *Bradyrhizobium*, destacam-se *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium diazoefficiens*, *Bradyrhizobium elkanii* e *Bradyrhizobium* sp. As espécies de leguminosas mais frequentemente estudadas foram a soja (*Glycine max*), o feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), o feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*), o feijão-bambara (*Vigna subterranea*), o amendoim (*Arachis hypogaea*) e o feijão-mungo (*Vigna radiata*). A maioria das pesquisas foi conduzida no Brasil, Estados Unidos, Uruguai, China, África do Sul e Finlândia.

A inoculação de microrganismos simbiotes e promotores de crescimento vegetal tem se mostrado uma estratégia eficaz para otimizar a fixação biológica de nitrogênio (FBN) e melhorar a nutrição mineral das plantas. Os estudos relataram abordagens diversas quanto ao uso de estirpes de *Bradyrhizobium*, refletindo a complexidade das interações entre microrganismos e plantas hospedeiras. Berriel *et al.* (2021) identificaram a estirpe *Bradyrhizobium* sp. Oc8 como promissora para leguminosas como *Crotalaria ochroleuca* e *Cajanus cajan*, enquanto Sulieman *et al.* (2019) demonstraram que *B. diazoefficiens* CB1809 apresentou maior capacidade de fixação de nitrogênio em condições de deficiência de fósforo, superando a estirpe USDA110. Outros estudos evidenciaram a especificidade rizóbio–planta; por exemplo, Favero *et al.* (2022) relataram que algumas estirpes de *Bradyrhizobium* eficazes em feijão-caupi e soja não apresentaram eficiência em feijão-mungo.

A combinação de rizóbios com outros microrganismos também tem apresentado efeitos positivos na absorção de nutrientes. Galindo *et al.* (2021) observaram que a coinoculação de *Bradyrhizobium* com *Azospirillum brasilense* aumentou a FBN em feijão-caupi e beneficiou a cultura do trigo, indicando um efeito residual positivo.

Beyene *et al.* (2022) também relataram aumento na absorção de nitrogênio e fósforo em *E. brucei* após múltiplas inoculações, demonstrando que interações simbióticas bem estabelecidas contribuem para a melhoria da fertilidade do solo. Por outro lado, Becker *et al.* (2023) relataram que a inoculação de feijão-caupi na Namíbia não aumentou significativamente a nodulação nem os teores de carbono e nitrogênio do solo, possivelmente devido à presença de rizóbios nativos eficientes. Essa contradição ressalta a importância de avaliar previamente a microbiota nativa do solo antes da realização da inoculação.

Novas abordagens têm sido testadas com o objetivo de otimizar a FBN. Tewari *et al.* (2020) demonstraram que a adição de metabólitos bacterianos, como ácido ascórbico e fosfatidilserina, à inoculação com *Bradyrhizobium* aumentou a nodulação e o crescimento do feijão-guandu (*Cajanus cajan*), evidenciando o potencial das bioformulações. Riviezzi *et al.* (2020) relataram que a adição de isoflavonas ao meio de cultivo de *Bradyrhizobium elkanii* favoreceu a nodulação e a produtividade da soja, sugerindo que compostos secundários podem modular a simbiose. Groppa *et al.* (2022) exploraram o uso de nanopartículas de magnetita (Fe₃O₄-NPs) para aumentar a adesão bacteriana às raízes e melhorar a FBN. Os resultados indicaram aumento da biomassa vegetal e da produção de leghemoglobina, sem os efeitos inibitórios comumente associados ao nitrogênio mineral.

A interação rizóbio-planta também influencia a composição da microbiota do solo. Jiang *et al.* (2023) demonstraram que a inoculação de *B. japonicum* AC20 em plantas de soja expostas à atrazina modulou a estrutura microbiana da rizosfera, aumentando a abundância de Acidobacteria e Actinobacteria, microrganismos associados ao metabolismo do carbono. Esse efeito também foi relatado por Hassen *et al.* (2023) em feijão-bambara (*Vigna subterranea*), no qual estirpes não nativas foram capazes de estabelecer simbioses eficientes.

Os estudos revisados demonstram que a seleção de estirpes eficientes de *Bradyrhizobium* é fundamental para maximizar a FBN. Entretanto, o sucesso dessas estratégias depende de diversos fatores, como a presença de rizóbios nativos, a cultura hospedeira e as condições edafoclimáticas locais. A coinoculação, o uso de formulações avançadas e a aplicação da nanotecnologia são estratégias capazes de intensificar a nodulação e a absorção de nutrientes, enquanto a modulação da microbiota do solo surge como um novo paradigma nas interações planta–microrganismo. Estudos de longo prazo e validações em condições de campo são essenciais para consolidar essas abordagens e maximizar a produtividade de leguminosas em sistemas agrícolas sustentáveis.

Os resultados também indicam que a combinação de *Bradyrhizobium* com outros microrganismos promotores do crescimento vegetal, como *Azospirillum* e *Pseudomonas*, pode intensificar a nodulação, melhorar a absorção de nutrientes e aumentar a produtividade das culturas. A Tabela 3 apresenta diferentes combinações de microrganismos utilizadas em estratégias de coinoculação para Fabaceae, destacando sua diversidade em distintos contextos agrícolas. Os estudos analisados demonstram que as interações entre rizóbios e bactérias de vida livre podem aprimorar a simbiose e beneficiar as plantas hospedeiras. Dessa forma,

compreender os efeitos dessas interações é essencial para a formulação de inoculantes mais eficientes, contribuindo para a redução do uso de fertilizantes nitrogenados e para o aumento da produtividade agrícola.

Na Tabela 3 são apresentadas diferentes combinações de microrganismos utilizados na coinoculação em Fabaceae, evidenciando sua diversidade em diferentes contextos agrícolas. Os estudos relatados demonstram que a interação entre rizóbios e bactérias de vida livre pode melhorar a simbiose e beneficiar as plantas hospedeiras. Com isso, a compreensão dos efeitos dessas interações é essencial para a formulação de inoculantes mais eficientes para contribuir na redução do uso de fertilizantes nitrogenados e para o aumento da produtividade das culturas vegetais.

Tabela 3: Coinoculação de *Bradyrhizobium* e outros microrganismos promotores do crescimento vegetal em espécies de leguminosas

Microrganismo utilizado/cepas	Cultura vegetal	Atividades biofuncionais	Localização	Citação
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (E109) + <i>Azospirillum brasilense</i> (Az39)	<i>Glycine max</i> (L.)	Fitoestabilização	Argentina	(Armendariz <i>et al.</i> , 2019)
<i>Bradyrhizobium</i> sp. (SEMIA 6462) + <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5	<i>Vigna unguiculata</i> (L.)	Aumento na eficiência do uso do nitrogênio	Brasil	(Galindo <i>et al.</i> , 2021)
<i>Bradyrhizobium</i> sp. (SEMIA 6463) + <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V6	<i>Vigna unguiculata</i> (L.)	Bioestimulação através da produção de fitormônios Bioestimulação através da produção de fitormônios	Brasil	(Galindo <i>et al.</i> , 2021)
<i>Bradyrhizobium</i> sp. (LSBR-3) + <i>Pseudomonas oryzae</i> (LSE-3)	<i>Glycine max</i> (L.)	Aumento na eficiência do uso do nitrogênio	Índia	(Kumawat <i>et al.</i> , 2022)
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> (29w) + <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 (SEMIA 4077)	<i>Phaseolus vulgaris</i> (L.)	Melhoria na nodulação e na fixação biológica de nitrogênio	Brasil	(Leite <i>et al.</i> , 2022)
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> (USDA 110) + <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 (SEMIA 4077)	<i>Phaseolus vulgaris</i> (L.)	Aumento da produtividade e do rendimento dos grãos	Brasil	(Leite <i>et al.</i> , 2022)
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> (BR 2003) + <i>Azospirillum baldaniorum</i> (Sp245)	<i>Phaseolus lunatus</i> (L.)	Maior biomassa de raiz e parte aérea, maior acúmulo de nitrato	Brasil	(Lopes <i>et al.</i> , 2022)
<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i> (BR 3262) + <i>Azospirillum baldaniorum</i> (Sp245)	<i>Phaseolus lunatus</i> (L.)	Maior concentração de proteínas solúveis e redução de prolina	Brasil	(Lopes <i>et al.</i> , 2022)
<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> (BR 3267) + <i>Azospirillum baldaniorum</i> (Sp245)	<i>Phaseolus lunatus</i> (L.)	Resistência ao estresse salino	Brasil	(Lopes <i>et al.</i> , 2022)

<i>Bradyrhizobium paxllaeri</i> (BR 10398) + <i>Azospirillum baldaniorum</i> (Sp245)	<i>Phaseolus lunatus</i> (L.)	Higher number of nodules and nodulation efficiency, increase in chlorophyll a	Brasil	(Lopes <i>et al.</i> , 2022)
<i>Bradyrhizobium icense</i> (BR 10399) + <i>Azospirillum baldaniorum</i> (Sp245)	<i>Phaseolus lunatus</i> (L.)	Greater resistance to water stress	Brasil	(Lopes <i>et al.</i> , 2022)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (SEMIA 5080) + <i>Bacillus subtilis</i> (BD234)	<i>Vigna subterranea</i> (L.)	Greater resistance to water stress	África do Sul	(Udeh <i>et al.</i> , 2023)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (SEMIA 5079) + <i>Claroideoglossum claroideum</i> (BEG210)	<i>Vigna subterranea</i> (L.)	Greater resistance to water stress	África do Sul	(Udeh <i>et al.</i> , 2023)
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> + <i>Rhizobium</i> sp.	<i>Vigna subterranea</i> (L.)	Higher crude protein content in seeds under water deficit	Portugal	(Pereira <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bradyrhizobium</i> sp. + <i>Claroideoglossum claroideum</i> (BEG210)	<i>Vigna subterranea</i> (L.)	Higher nodulation and nitrogen fixation	Portugal	(Pereira <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bradyrhizobium</i> spp. + <i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Glycine max</i> (L.)	Increase in plant dry weight, nodule biomass, and nitrogen content	Croatia	(Kajić <i>et al.</i> , 2025)

Coinoculação e sinergias microbianas

Os dados apresentados na Tabela 3 resumem estudos sobre a coinoculação de espécies de *Bradyrhizobium* com outros simbiossiontes em leguminosas. Entre as culturas mais comumente estudadas em associação com a coinoculação destacam-se *Vigna unguiculata* (feijão-caupi), *Phaseolus lunatus* (feijão-fava), *Phaseolus vulgaris* (feijão-comum), *Glycine max* (soja) e *Vigna subterranea* (feijão-bambara).

Quanto aos microrganismos utilizados na coinoculação, destacam-se combinações como *Bradyrhizobium* + *Azospirillum baldaniorum* (Sp245), *Bradyrhizobium* + *Rhizobium tropici*, *Bradyrhizobium* + *Azospirillum brasilense*, *Bradyrhizobium* + *Claroideoglomus claroideum*, *Bradyrhizobium* + *Pseudomonas oryzihabitans* e *Bradyrhizobium* + *Bacillus subtilis*. A maioria dos estudos de coinoculação foi conduzida no Brasil, Portugal, África do Sul, Argentina e Índia, indicando um interesse crescente nessas tecnologias nesses países.

Armendariz *et al.* (2019) avaliaram a coinoculação de *Bradyrhizobium japonicum* E109 e *Azospirillum brasilense* Az39 em soja sob estresse por arsênio (As). Os resultados demonstraram que essa abordagem potencializa a fixação biológica de nitrogênio (FBN) e contribui para a fitorremediação. Enquanto a inoculação isolada com *B. japonicum* E109 promoveu aumento de 27% na biomassa radicular e de 47% na biomassa da parte aérea, e *A. brasilense* Az39 proporcionou incrementos de 22% e 17%, respectivamente, a coinoculação não resultou em melhorias significativas no crescimento geral das plantas. No entanto, o número de nódulos foi maior nas plantas co-inoculadas, especialmente sob exposição ao arsênio. Esses resultados sugerem que a produção de ácido indol-3-acético (AIA) por *A. brasilense* pode ter contribuído para reduzir a mortalidade de *B. japonicum* e melhorar a eficiência simbiótica.

A coinoculação de *Bradyrhizobium* LSBR-3 com *Pseudomonas oryzihabitans* LSE-3 aumentou a nodulação em *Glycine max* (L.), resultando em maior número de nódulos ativos e aumento da produção de ácido indol-3-acético (AIA), o que estimulou o crescimento radicular e melhorou a absorção de nutrientes (Kumawat *et al.*, 2022). Além disso, a inoculação com *Pseudomonas* contribuiu para maior disponibilidade de fósforo para as plantas. Esses efeitos levaram a um aumento de 10,85% na produtividade de grãos e a ganhos econômicos.

Pereira *et al.* (2020) avaliaram o feijão-caupi inoculado com uma estirpe rizobacteriana (*Bradyrhizobium elkanii*) e um fungo micorrízico arbuscular (*Claroideoglomus claroideum*) sob condições de estresse hídrico. Os principais benefícios observados dessa associação foram um aumento de até 30% no teor de proteína bruta dos grãos. Isso pode resultar em uso mais

eficiente do nitrogênio fixado, maior adaptação ao estresse hídrico, aumento da biomassa vegetal e melhoria da eficiência fotossintética.

Lopes *et al.* (2022) investigaram a coinoculação da soja com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum baldaniorum*. Entre os benefícios relatados destacam-se o aumento da tolerância ao estresse salino, a maior eficiência da fixação biológica de nitrogênio (FBN), com melhor assimilação do nitrogênio atmosférico, e maior retenção de nitrogênio nos tecidos vegetais. De forma semelhante, Galindo *et al.* (2021) demonstraram que a coinoculação de *Bradyrhizobium* com *Azospirillum brasilense* aumentou a eficiência do uso do nitrogênio no feijão-caupi em 216,5% e a produtividade de grãos em 40,5%. Esses achados sugerem que a associação de *Bradyrhizobium* com outras estirpes bacterianas e fúngicas pode ser uma estratégia promissora para aumentar a resistência das leguminosas a condições adversas.

Outros ensaios envolvendo espécies de feijão, como o estudo de Leite *et al.* (2022), avaliaram a associação de *Bradyrhizobium diazoefficiens* CPAC 7 com *Rhizobium tropici* CIAT 899. Os principais resultados indicaram um aumento de 20% na produtividade de grãos em comparação à inoculação convencional utilizando apenas *Rhizobium tropici*. Também foram observadas melhorias na eficiência da nodulação e na absorção de nutrientes, resultando em maior acúmulo de nitrogênio.

Udeh *et al.* (2023) investigaram o feijão-bambara co-inoculado com *B. japonicum* e *Bacillus subtilis* sob diferentes níveis de estresse hídrico. Os resultados mais relevantes incluíram aumento da taxa fotossintética, da assimilação de carbono e maior eficiência no uso da água. Além disso, as plantas apresentaram melhor adaptação às condições de seca e maior produção de biomassa da parte aérea. Udeh *et al.* (2023) relataram que a coinoculação bacteriana pode intensificar respostas adaptativas. Alguns resultados sugeriram que os efeitos da coinoculação são mais evidentes sob condições de estresse abiótico, (Pereira *et al.*, 2020; Galindo *et al.*, 2021; Lopes *et al.*, 2022). No entanto, Pereira *et al.* (2020) também observaram que a eficácia da coinoculação pode variar em função da microbiota nativa do solo e das condições ambientais, e que, em solos com populações nativas de rizóbios já eficientes, os benefícios da coinoculação podem ser reduzidos.

A comparação entre diferentes estudos revela que os maiores benefícios foram observados quando a interação entre os microrganismos promoveu tanto a fixação biológica de nitrogênio (FBN) quanto a absorção de outros nutrientes essenciais. A associação do feijão-caupi com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum brasilense* foi uma das mais eficazes, devido ao seu impacto direto na fixação de nitrogênio e no aumento da produtividade de grãos (Galindo *et al.*,

2021). De forma semelhante, a combinação de *Bradyrhizobium* e *Pseudomonas* em soja apresentou vantagens significativas em termos de crescimento vegetal e retorno econômico (Kumawat *et al.*, 2022).

Sob condições de estresse hídrico, a coinoculação com fungos micorrízicos, como no estudo de Pereira *et al.* (2020), mostrou-se eficaz ao aumentar a absorção de fósforo e a adaptação à seca. Dessa forma, os resultados desses estudos indicam que a coinoculação é uma estratégia viável para aumentar a produtividade agrícola, reduzir o uso de fertilizantes químicos e melhorar a tolerância das plantas a condições adversas. Entretanto, a seleção adequada dos microrganismos e a avaliação das condições do solo são essenciais para garantir o sucesso dessa estratégia, uma vez que a microbiota nativa pode influenciar a competitividade e a eficiência dos inoculantes aplicados (Pereira *et al.*, 2020).

A eficácia da coinoculação varia de acordo com o tipo de solo, a microbiota nativa, as condições ambientais e a interação com fertilizantes orgânicos e químicos, exigindo formulações adaptadas a cada contexto. A adoção em larga escala desse método demanda o desenvolvimento de tecnologias eficientes, economicamente viáveis e ambientalmente sustentáveis, além de uma maior integração entre a pesquisa científica e as políticas públicas para promover o uso de bioinsumos. Assim, embora a coinoculação represente uma alternativa promissora, ela requer abordagens multidisciplinares e validação em campo a longo prazo para consolidar seu papel na agricultura sustentável em diferentes sistemas.

Conclusão

O uso de bactérias fixadoras de nitrogênio representa uma alternativa viável e sustentável para a agricultura. Além de reduzir a dependência de fertilizantes nitrogenados, as práticas de inoculação e coinoculação contribuem para a redução dos impactos ambientais, promovendo a conservação dos ecossistemas e a mitigando a contaminação do solo e dos recursos hídricos. A longo prazo, a fixação biológica de nitrogênio também melhora a qualidade e a fertilidade do solo, tornando-o mais produtivo e equilibrado.

A interação simbiótica entre estirpes de *Bradyrhizobium* e espécies de Fabaceae constitui um pilar estratégico para a sustentabilidade agrícola, especialmente em regiões vulneráveis à degradação do solo e a estresses abióticos. Além de sua reconhecida eficiência na fixação biológica de nitrogênio, essas associações contribuem para o aumento da fertilidade do solo, a redução da dependência de fertilizantes sintéticos e o incremento da produtividade de

leguminosas de importância econômica. Destaca-se que estudos recentes demonstram que determinadas estirpes de *Bradyrhizobium* podem induzir respostas fisiológicas nas plantas hospedeiras que aumentam a tolerância a estresses abióticos, como a deficiência hídrica. Esse avanço é estrategicamente relevante, sobretudo diante dos atuais cenários de mudanças climáticas e da intensificação de eventos extremos de seca. Tais adaptações não apenas asseguram a produtividade em condições adversas, como também contribuem para a sustentabilidade e a segurança alimentar em regiões vulneráveis. Dessa forma, a valorização da diversidade funcional dessas bactérias e o uso de inoculantes adaptados a condições edafoclimáticas específicas emergem como estratégias-chave para a construção de sistemas agrícolas mais resilientes, eficientes e ambientalmente equilibrados.

Perspectivas Futuras

Apesar dos avanços na identificação de estirpes eficientes e na compreensão dos mecanismos moleculares que sustentam a simbiose leguminosa–rizóbio, permanecem lacunas críticas, particularmente no que diz respeito à adaptação desses organismos a condições edafoclimáticas extremas, como solos ácidos ou contaminados por metais pesados. Além disso, há escassez de estudos funcionais que integrem análises genômicas com ensaios de campo em larga escala. Outro fator limitante é a insuficiente integração de dados bioquímicos, como os perfis de exopolissacarídeos, sideróforos e metabólitos secundários produzidos por *Bradyrhizobium*, com sua correlação direta com a eficiência simbiótica em ambientes degradados.

Sob a perspectiva molecular, estudos futuros devem aprofundar a compreensão de como exsudatos radiculares e receptores de reconhecimento molecular interagem para atrair e selecionar rizóbios, bem como de que forma a coinoculação influencia a eficiência da fixação biológica de nitrogênio em solos degradados. Outra lacuna refere-se à competição entre estirpes comerciais e nativas e ao papel da comunidade microbiana autóctone durante o estabelecimento da simbiose. Também é essencial intensificar as investigações sobre a regulação de genes envolvidos no estresse oxidativo, *operons* associados à síntese de polissacarídeos de superfície e sistemas de secreção (T3SS e T4SS), que modulam tanto a compatibilidade simbiótica quanto a tolerância microbiana a ambientes hostis. Estudos sobre a dinâmica espacial dos nódulos, microgradientes de oxigênio, metabolismo de ureídeos e o papel regulatório da leghemoglobina podem elucidar restrições fisiológicas à fixação de nitrogênio sob condições de estresse.

Pesquisas futuras devem priorizar abordagens integrativas, como metagenômica, transcriptômica e análises funcionais de coocorrência, juntamente com o aprimoramento contínuo das técnicas de isolamento, inoculação e coinoculação. Em abordagens metagenômicas, é necessário elucidar os mecanismos genéticos que regulam a simbiose e a adaptação dos rizóbios a diferentes ambientes. Esse tipo de estudo será fundamental para o desenvolvimento de bioinoculantes mais eficientes. A integração de abordagens multi-ômicas (metagenômica, metabolômica e transcriptômica) é essencial para a compreensão precisa dos determinantes genéticos e bioquímicos da adaptação e da eficiência simbiótica de *Bradyrhizobium*. Essas ferramentas permitirão a identificação de genes-chave associados à resistência a metais pesados, solubilização de fósforo, produção de fitormônios, biossíntese de sideróforos e exopolissacarídeos, bem como de enzimas regulatórias como a ACC desaminase, facilitando a seleção de estirpes altamente adaptadas e com elevado potencial biotecnológico. Ademais, análises multi-ômicas integradas são cruciais para elucidar como consórcios microbianos complexos modulam a resposta planta–rizóbio, influenciam a montagem do microbioma da rizosfera e aumentam a resiliência ecológica em solos degradados ou submetidos a múltiplos estresses.

No campo da biologia molecular e da engenharia genética, as tendências mais promissoras envolvem a geração de estirpes hipercompetitivas de *Bradyrhizobium* por meio de seleção genômica avançada ou edição genética utilizando sistemas *CRISPR/Cas*. A modulação direcionada de genes associados à tolerância à salinidade, acidez, altas temperaturas, toxicidade por metais e estresse oxidativo, bem como de vias metabólicas responsáveis pela síntese de exopolissacarídeos e sideróforos, aumenta significativamente a capacidade dessas bactérias de estabelecer simbioses eficazes em ambientes hostis. De forma complementar, a engenharia das vias simbióticas clássicas (*nod*, *nif* e *fix*) surge como uma estratégia decisiva para melhorar a nodulação, potencializar a fixação biológica de nitrogênio (FBN) e garantir maior estabilidade da interação ao longo do ciclo de desenvolvimento da planta.

Do ponto de vista biotecnológico, é essencial expandir o uso de tecnologias avançadas de formulação de bioinoculantes, uma vez que ainda existem limitações significativas quanto à sobrevivência, estabilidade e competitividade das estirpes de *Bradyrhizobium* em condições de campo. Nesse contexto, o desenvolvimento de microcápsulas poliméricas representa uma área promissora que requer maior investigação, pois essas estruturas biodegradáveis têm potencial para proteger os microrganismos contra estresses ambientais e permitir sua liberação gradual na rizosfera; contudo, ainda faltam padronização, escalabilidade e validação em diferentes

contextos edafoclimáticos. De modo semelhante, o uso de hidrogéis altamente hidratados, apesar de apresentar resultados positivos na manutenção da viabilidade bacteriana e na promoção do estabelecimento simbiótico em solos secos ou quentes, demanda estudos mais robustos sobre sua interação com o microbioma, sua degradação no solo e seu desempenho em larga escala.

Outra linha promissora de desenvolvimento futuro envolve nanopartículas indutoras de nodulação capazes de transportar moléculas sinalizadoras, como flavonoides e lipoquitooligossacarídeos (LCOs) artificiais, para intensificar a comunicação planta–rizóbio. No entanto, os mecanismos precisos de liberação, absorção radicular e impacto ecológico dessas nanopartículas — especialmente em cenários de longo prazo — ainda necessitam de esclarecimento. Além disso, a aplicação de carreadores orgânicos enriquecidos com flavonoides, embora já demonstre aumento da competitividade das estirpes inoculadas frente à microbiota nativa, requer investigações adicionais sobre formulações otimizadas, dosagens adequadas e desempenho em diferentes tipos de solo. Assim, o aprimoramento dessas bioformulações avançadas destaca-se como uma prioridade para as próximas décadas, pois pode aumentar substancialmente a sobrevivência, a funcionalidade simbiótica e o desempenho agrônômico dos inoculantes, contribuindo para o desenvolvimento de biofertilizantes mais eficientes, resilientes e sustentáveis.

Referências

- Alaswad, A. A., Oehrle, N. W., & Krishnan, H. B. (2019). Classical soybean (*Glycine max* (L.) merr) symbionts, *sinorhizobium fredii* USDA191 and *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110, reveal contrasting symbiotic phenotype on pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.) millsp). *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5). <https://doi.org/10.3390/ijms20051091>
- Amorim, M. R., Mendes, L. W., Antunes, J. E. L., Oliveira, L. M. De S., Melo, V. M. M., Oliveira, F. A. S., Aquino, J. P. A., Rocha, S. M. B., Pereira, A. P. De A., Da Costa, A. F., Oliveira, J. De P., Araujo, F. F., Figueiredo, M. Do V. B., & Araujo, A. S. F. (2022). Cowpea nodules host a similar bacterial community regardless of soil properties. *Applied Soil Ecology*, 172(September 2021). <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104354>
- Araujo, J., Díaz-Alcántara, C. A., Urbano, B., & González-Andrés, F. (2020). Inoculation with native *Bradyrhizobium* strains formulated with biochar as carrier improves the

- performance of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). *European Journal of Agronomy*, 113(February 2019). <https://doi.org/10.1016/j.eja.2019.125985>
- Armendariz, A. L., Talano, M. A., Olmos Nicotra, M. F., Escudero, L., Bresler, M. L., Porporatto, C., & Agostini, E. (2019). Impact of double inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* E109 and *Azospirillum brasilense* Az39 on soybean plants grown under arsenic stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 138(February), 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.02.018>
- Aserse, A. A., Markos, D., Getachew, G., Yli-Halla, M., & Lindström, K. (2020). Rhizobial inoculation improves drought tolerance, biomass and grain yields of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and soybean (*Glycine max* L.) at Halaba and Boricha in Southern Ethiopia. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 66(4), 488–501. <https://doi.org/10.1080/03650340.2019.1624724>
- Becker, J. N., Grozinger, J., Sarkar, A., Reinhold-Hurek, B., & Eschenbach, A. (2023). Effects of cowpea (*Vigna unguiculata*) inoculation on nodule development and rhizosphere carbon and nitrogen content under simulated drought. *Plant and Soil*, 500(1), 33–51. <https://doi.org/10.1007/s11104-023-06051-1>
- Bender, F. R., Nagamatsu, S. T., Delamuta, J. R. M., Ribeiro, R. A., Nogueira, M. A., & Hungria, M. (2022). Genetic variation in symbiotic islands of natural variant strains of soybean *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium diazoefficiens* differing in competitiveness and in the efficiency of nitrogen fixation. *Microbial Genomics*, 8(4). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000795>
- Berriel, V., Morel, M. A., Filippi, C. V., & Monza, J. (2021). Draft genome sequence of *Bradyrhizobium* sp. strain Oc8 isolated from *Crotalaria ochroleuca* nodule. *Current Research in Microbial Sciences*, 2. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100074>
- Berza Beyene, B., Pagano, M. C., Vaiyapuri R, P., & Assefa Tuji, F. (2022). Microbial consortia inoculation of woody legume *Erythrina brucei* increases nodulation and shoot nitrogen and phosphorus under greenhouse conditions. *Biotechnology Reports*, 33. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00707>
- Beukes, C. W., Stepkowski, T., Venter, S. N., Cłapa, T., Phalane, F. L., Le Roux, M. M., & Steenkamp, E. T. (2016). Crotalariaeae and Genisteeae of the South African Great Escarpment are nodulated by novel *Bradyrhizobium* species with unique and diverse symbiotic loci. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 100, 206–218.

<https://doi.org/10.1016/j.ympbev.2016.04.011>

- Boudehouche, W., Parker, M. A., & Boulila, F. (2020). Relationships of *Bradyrhizobium* strains nodulating three Algerian Genista species. *Systematic and Applied Microbiology*, 43(3). <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126074>
- Canellas, L. P., Olivares, F. L., Canellas, N. O. A., Jindo, K., Rosa, R. C. C., & Piccolo, A. (2022). Challenge of transition: the history of a case study involving tropical fruits polyculture stimulated by humic acids and plant-growth promoting bacteria. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 9(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s40538-022-00342-y>
- Chibeba, A. M., Pereira, C. S., Antunes, J. E. L., Ribeiro, R. A., De Almeida Lopes, A. C., Gomes, R. L. F., Hungria, M., & Araujo, A. S. F. (2020). Polyphasic characterization of nitrogen-fixing and co-resident bacteria in nodules of *Phaseolus lunatus* inoculated with soils from Piauí State, Northeast Brazil. *Symbiosis*, 80(3), 279–292. <https://doi.org/10.1007/s13199-020-00672-1>
- Cho, A., Joshi, A., Hur, H. G., & Lee, J. H. (2024). Nodulation Experiment by Cross-Inoculation of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Root Nodules of Several Leguminous. *Plants. Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(3), 570–579. <https://doi.org/10.4014/jmb.2310.10025>
- Claassens, R., Venter, S. N., Beukes, C. W., Stępkowski, T., Chan, W. Y., & Steenkamp, E. T. (2023). *Bradyrhizobium xenonodulans* sp. nov. isolated from nodules of Australian Acacia species invasive to South Africa. *Systematic and Applied Microbiology*, 46(5). <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2023.126452>
- Das, D. R., Horváth, B., Kundu, A., Kaló, P., & Dasgupta, M. (2019). Functional conservation of CYCLOPS in crack entry legume *Arachis hypogaea*. *Plant Science*, 281(September 2018), 232–241. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.12.003>
- El-Sherbeny, T. M. S., Mousa, A. M., & Zhran, M. A. (2023). Response of peanut (*Arachis hypogaea* L.) plant to bio-fertilizer and plant residues in sandy soil. *Environmental Geochemistry and Health*, 45(2), 253–265. <https://doi.org/10.1007/s10653-022-01302-z>
- Favero, V. O., De Carvalho, R. H., Leite, A. B. C., Dos Santos, D. M. T., De Freitas, K. M., Zilli, J. É., Xavier, G. R., Rumjanek, N. G., & Urquiaga, S. (2022). Cross-Inoculation of Elite Commercial *Bradyrhizobium* Strains from Cowpea and Soybean in Mung Bean and Comparison with Mung Bean Isolates. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*,

- Galindo, F. S., Da Silva, E. C., Pagliari, P. H., Fernandes, G. C., Rodrigues, W. L., Biagini, A. L. C., Baratella, E. B., Da Silva Júnior, C. A., Moretti Neto, M. J., Silva, V. M., Muraoka, T., & Teixeira Filho, M. C. M. (2021). Nitrogen recovery from fertilizer and use efficiency response to *Bradyrhizobium* sp. and *Azospirillum brasilense* combined with N rates in cowpea-wheat crop sequence. *Applied Soil Ecology*, 157(May 2020), 103764. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103764>
- Groppa, M. D., Zawoznik, M. S., Benavides, M. P., & Iannone, M. F. (2022). Beneficial effects of magnetite nanoparticles on soybean-*Bradyrhizobium japonicum* and alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* associations. *Plant Physiology and Biochemistry*, 180(October 2021), 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.03.025>
- Hakim, S., Imran, A., Hussain, M. S., & Mirza, M. S. (2023). RNA-Seq analysis of mung bean (*Vigna radiata* L.) roots shows differential gene expression and predicts regulatory pathways responding to taxonomically different rhizobia. *Microbiological Research*, 275(July). <https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127451>
- Hakim, S., Mirza, B. S., Imran, A., Zaheer, A., Yasmin, S., Mubeen, F., Mclean, J. E., & Mirza, M. S. (2020). Illumina sequencing of 16S rRNA tag shows disparity in rhizobial and non-rhizobial diversity associated with root nodules of mung bean (*Vigna radiata* L.) growing in different habitats in Pakistan. *Microbiological Research*, 231(October 2019). <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126356>
- Hamzavi, F., Naseri, B., Hassanpour, M., Razmjou, J., & Golizadeh, A. (2022). Biology and life table parameters of *Callosobruchus maculatus* (F.) on *Vigna unguiculata* (L.) Walp. fertilized with some mineral- and bio-fertilizers. *Journal of Stored Products Research*, 97(February). <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2022.101978>
- Hassen, A. I., Bopape, F. L., Van Vuuren, A., Gerrano, A. S., & Morey, L. (2023). Symbiotic interaction of bambara groundnut (*Vigna subterranea*) landraces with rhizobia spp. from other legume hosts reveals promiscuous nodulation. *South African Journal of Botany*, 160, 493–503. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.07.032>
- Hussain, M. I., El-Keblawy, A., Aljabi, A. E., Aljabi, D. E., Hafez, M., Al Jasmi, A., Schampoel, T., & Temperton, V. M. (2019). Nitrogen fixation and carbon assimilation of the desert legume *Tephrosia apollinea* under PEG-induced osmotic stress. *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 251(June 2018), 105–113.

<https://doi.org/10.1016/j.flora.2019.01.004>

- Jiang, D., Li, Y., Wang, J., Lv, X., Jiang, Z., Cao, B., Qu, J., Ma, S., & Zhang, Y. (2023). Exogenous application of *Bradyrhizobium japonicum* AC20 enhances soybean tolerance to atrazine via regulating rhizosphere soil microbial community and amino acid, carbohydrate metabolism related genes expression. *Plant Physiology and Biochemistry*, 196(February), 472–483. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.02.007>
- Kumawat, K. C., Singh, I., Nagpal, S., Sharma, P., Gupta, R. K., & Sirari, A. (2022). Co-inoculation of indigenous *Pseudomonas oryzihabitans* and *Bradyrhizobium* sp. modulates the growth, symbiotic efficacy, nutrient acquisition, and grain yield of soybean. *Pedosphere*, 32(3), 438–451. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(21\)60085-1](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(21)60085-1)
- Leite, R. De A., Martins, L. C., Ferreira, L. V. Dos S. F., Barbosa, E. S., Alves, B. J. R., Zilli, J. E., Araújo, A. P., & Jesus, E. Da C. (2022). Co-inoculation of Rhizobium and *Bradyrhizobium* promotes growth and yield of common beans. *Applied Soil Ecology*, 172(March 2021). <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104356>
- Leng, P., Jin, F., Li, S., Huang, Y., Zhang, C., Shan, Z., Yang, Z., Chen, L., Cao, D., Hao, Q., Guo, W., Yang, H., Chen, S., Zhou, X., Yuan, S., & Chen, H. (2023). High efficient broad-spectrum *Bradyrhizobium elkanii* Y63-1. 8(July), 228–235.
- Li, Y. H., Wang, R., Sui, X. H., Wang, E. T., Zhang, X. X., Tian, C. F., Chen, W. F., & Chen, W. X. (2019). *Bradyrhizobium nanningense* sp. nov., *Bradyrhizobium guangzhouense* sp. nov. and *Bradyrhizobium zhanjiangense* sp. nov., isolated from effective nodules of peanut in Southeast China. *Systematic and Applied Microbiology*, 42(5). <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2019.126002>
- Li, Y., Liu, G., Han, K., Sun, L., Gao, K., Liu, W., Wang, E. T., & Chen, W. (2022). Distribution and biodiversity of rhizobia nodulating *Chamaecrista mimosoides* in the Shandong peninsula of china. *Systematic and Applied Microbiology*, 45(1). <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2021.126280>
- Lopes, Á. L. De O., Setubal, I. S., Costa Neto, V. P. Da, Zilli, J. E., Rodrigues, A. C., & Bonifacio, A. (2022). Synergism of *Bradyrhizobium* and *Azospirillum baldaniorum* improves growth and symbiotic performance in lima bean under salinity by positive modulations in leaf nitrogen compounds. *Applied Soil Ecology*, 180(October 2021). <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2022.104603>
- Marques, R. Z., Rodrigues, L. P., Kaschuk, G., Moreira Brito, J. C., & Gomes, M. P. (2023).

- Protecting soybean yields from enrofloxacin toxicity: The role of *Bradyrhizobium japonicum* inoculation. *Rhizosphere*, 28(July).
<https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2023.100813>
- Muindi, M. M., Muthini, M., Njeru, E. M., & Maingi, J. (2021). Symbiotic efficiency and genetic characterization of rhizobia and non rhizobial endophytes associated with cowpea grown in semi-arid tropics of Kenya. *Heliyon*, 7(4).
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06867>
- Omari, R. A., Yuan, K., Anh, K. T., Reckling, M., Halwani, M., Egamberdieva, D., Ohkama-Ohtsu, N., & Bellingrath-Kimura, S. D. (2022). Enhanced Soybean Productivity by Inoculation With Indigenous *Bradyrhizobium* Strains in Agroecological Conditions of Northeast Germany. *Frontiers in Plant Science*, 12(January), 1–14.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.707080>
- Osei, O., Abaidoo, R. C., Opoku, A., Rouws, J. R. C., Boddey, R. M., Ahiabor, B. D. K., & Rouws, L. F. M. (2020). Native *Bradyrhizobium* Strains From Ghana Can Enhance Grain Yields of Field-Grown Cowpea and Groundnut. *Frontiers in Agronomy*, 2(April), 1–11.
<https://doi.org/10.3389/fagro.2020.00002>
- Pereira, S., Singh, S., Oliveira, R. S., Ferreira, L., Rosa, E., & Marques, G. (2020). Co-inoculation with rhizobia and mycorrhizal fungi increases yield and crude protein content of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) under drought stress. *Landbauforschung*, 70(2), 56–65. <https://doi.org/10.3220/LBF1607613362000>
- Pereira-Gómez, M., Ríos, C., Zabaleta, M., Lagurara, P., Galvalisi, U., Iccardi, P., Azziz, G., Battistoni, F., Platero, R., & Fabiano, E. (2020). Native legumes of the Farrapos protected area in Uruguay establish selective associations with rhizobia in their natural habitat. *Soil Biology and Biochemistry*, 148(May). <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107854>
- Pitumpe Arachchige, P. S., Rosso, L. H. M., Hansel, F. D., Ramundo, B., Torres, A. R., Asebedo, R., Ciampitti, I. A., & Jagadish, S. V. K. (2020). Temporal biological nitrogen fixation pattern in soybean inoculated with *Bradyrhizobium*. *Agrosystems, Geosciences and Environment*, 3(1), 1–10. <https://doi.org/10.1002/agg2.20079>
- Raul, B., Bhattacharjee, O., Ghosh, A., Upadhyay, P., Tembhare, K., Singh, A., Shaheen, T., Ghosh, A. K., Torres-Jerez, I., Krom, N., Clevenger, J., Udvardi, M., Scheffler, B. E., Ozias-Akins, P., Sharma, R. D., Bandyopadhyay, K., Gaur, V., Kumar, S., & Sinharoy, S. (2022). Microscopic and Transcriptomic Analyses of Dalbergoid Legume Peanut Reveal

- a Divergent Evolution Leading to Nod-Factor-Dependent Epidermal Crack-Entry and Terminal Bacteroid Differentiation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 35(2), 131–145. <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-21-0122-R>
- Riviezzi, B., Cagide, C., Pereira, A., Herrmann, C., Lombide, R., Lage, M., Sicardi, I., Lage, P., Castro-Sowinski, S., & Morel, M. A. (2020). Improved nodulation and seed yield of soybean (*Glycine max*) with a new isoflavone-based inoculant of *Bradyrhizobium elkanii*. *Rhizosphere*, 15(March). <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100219>
- Salas, A., Tortosa, G., Hidalgo-García, A., Delgado, A., Bedmar, E. J., Richardson, D. J., Gates, A. J., & Delgado, M. J. (2020). The Hemoglobin Bjgb From *Bradyrhizobium diazoefficiens* Controls NO Homeostasis in Soybean Nodules to Protect Symbiotic Nitrogen Fixation. *Frontiers in Microbiology*, 10(January), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02915>
- Shao, S., Chen, M., Liu, W., Hu, X., Wang, E. T., Yu, S., & Li, Y. (2020). Long-term monoculture reduces the symbiotic rhizobial biodiversity of peanut. *Systematic and Applied Microbiology*, 43(5). <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126101>
- Sujkowska-Rybikowska, M., Rusaczzonek, A., & Kochańska-Jeziorska, A. (2022). Exploring apoplast reorganization in the nodules of *Lotus corniculatus* L. growing on old Zn–Pb calamine wastes. *Journal of Plant Physiology*, 268(July 2021). <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2021.153561>
- Sulieman, S., Kusano, M., Ha, C. Van, Watanabe, Y., & Ali, M. (2019). *Plant Science Divergent metabolic adjustments in nodules are indispensable for efficient N₂ fixation of soybean under phosphate stress*. 289(June).
- Tewari, S., Pooniya, V., & Sharma, S. (2020). 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*, 147 (September 2019). <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103363>
- Tortosa, G., Pacheco, P. J., Hidalgo-García, A., Granados, A., Delgado, A., Mesa, S., Bedmar, E. J., & Delgado, M. J. (2020). Copper modulates nitrous oxide emissions from soybean root nodules. *Environmental and Experimental Botany*, 180(July). <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104262>
- Udeh, E. L., Ngmenzuma, T. Y., Maseko, S. T., Nyila, M. A., Kanu, S. A., & Mohale, K. C.

(2023). Gas exchange and carbon assimilation of *Bambara groundnut* landraces co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* and *Bacillus subtilis* under simulated drought stress. *Scientific African*, 21(February), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2023.e01823>

Urquiaga, M. C. De O., Klepa, M. S., Somasegaran, P., Ribeiro, R. A., Delamuta, J. R. M., & Hungria, M. (2019). *Bradyrhizobium frederickii* sp. Nov., a nitrogen-fixing lineage isolated from nodules of the Caesalpinioideae species *Chamaecrista fasciculata* and characterized by tolerance to high temperature in vitro. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(12), 3863–3877. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003697>

Estabelecimento do *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. inoculada com *Bradyrhizobium japonicum* cultivado sob condições semiáridas

Ângella Eduarda da Silva Sousa¹; Larisse Bernardino dos Santos¹; Débora Feitosa Muniz¹; José Vinícius Leite Lima¹, Thiago Leite de Alencar¹, Janerson José Coelho¹; Francisco Assis Bezerra da Cunha¹

¹Laboratório de Bioprospecção do Semiárido e Métodos Alternativos, Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, Crato, Ceará, Brasil.

Resumo:

A espécie *Stylosanthes guianensis* destaca-se como uma leguminosa forrageira de alto valor agrônomo, especialmente em ambientes tropicais e semiáridos, devido à sua tolerância à seca, acidez do solo e potencial de fixação biológica de nitrogênio (FBN). Este estudo objetivou avaliar a eficiência simbiótica da cepa *Bradyrhizobium japonicum* no desenvolvimento de *S. guianensis* cultivada em Latossolo Amarelo da Chapada do Araripe (Crato – CE), por meio de diferentes tratamentos (inoculação, adubação mineral e orgânica, e inoculação com a adubação química e orgânica). O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com quatro tratamentos e quatro repetições totalizando 16 m². Foram realizadas análises de crescimento, cobertura do dossel com e sem plantas daninhas, teor de clorofilas e quantificação de unidades formadoras de colônia (UFC g⁻¹ de solo). Os dados foram submetidos à análise estatística paramétrica e não paramétrica. Os resultados indicaram que, embora a inoculação com *B. japonicum* tenha promovido uma tendência de aumento na atividade microbiana do solo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas quanto ao crescimento e à cobertura vegetal. As colônias isoladas da rizosfera foram posteriormente submetidas aos meios semissólidos NFB e LGI para a confirmação do caráter diazotrófico, sendo que todos os isolados apresentaram a formação de halo característico, indicativo de potencial atividade de fixação biológica de nitrogênio. Quanto a contagem das UFC para solo cultivado em meio TSA e Rizobium, e nódulos cultivados em meio Rizobium, as análises estatísticas demonstraram que não houve resultados estatisticamente significantes. Conclui-se que a eficiência da inoculação simbiótica é condicionada por múltiplos fatores edafoclimáticos e biológicos, e que a adoção integrada de práticas de manejo pode potencializar os efeitos benéficos desses microrganismos

em sistemas agroecológicos sustentáveis, entretanto, nesse contexto não foi significante quando aos tratamentos aplicados.

Palavras-chave: Inoculação de microrganismos. Microbioma do solo. Estabelecimento vegetal. Dizotróficos.

Introdução

O gênero *Stylosanthes* possui 44 espécies, com distribuição em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, com representação de espécies nativas no Brasil e Colômbia (Wang *et al.*, 2024). Entre as espécies, *Stylosanthes guianenses* (Aubl.) Sw., destaca-se como uma leguminosa forrageira de porte subarbustivo com aproximadamente 0,6 a 1,2 m de altura e 0,3 a 0,8 cm de diâmetro do caule (Liu *et al.*, 2022). Essa espécie é tolerante à seca e a solos com acidez elevada, amplamente utilizada em pastagens, para melhoria do solo, adubação verde, sistemas de consórcio e alta produção de biomassa, o que a torna uma espécie com alto valor agronômico (Liu *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2024; Miao *et al.*, 2024).

A cultivar *S. guianensis* apresenta elevada adaptabilidade a ambientes edafoclimáticos adversos, com alta tolerância a deficiência de fósforo (P), a toxicidade por alumínio (Al) e manganês (Mn), sendo considerada modelo em estudos fisiológicos e moleculares relacionados à adaptação vegetal em solos restritivos (Chen *et al.*, 2021; Miao *et al.*, 2024; Jinhui *et al.*, 2025; Wang *et al.*, 2025). O seu alto valor produtivo como forragem, aliado a produtividade e resistência ao estresse, reforça a sua importância em sistemas de produção animal (Mao *et al.*, 2024; Jinhui *et al.*, 2025). Além disso, *S. guianensis* contribui para a fertilidade do solo através da fixação biológica de nitrogênio e contribui para a mitigação de gases de efeito estufa (Huang *et al.*, 2023; Gissi *et al.*, 2025). O Brasil figura entre os maiores produtores de sementes desse gênero, destacando-se os cultivares “Campo Grande” (*S. capitata* e *S. macrocephala*) e “Bela” (*S. guianensis*) (Gissi *et al.*, 2025).

A simbiose entre leguminosas e bactérias fixadoras de nitrogênio é fundamental para a sustentabilidade dos sistemas agropecuários, especialmente em ambientes tropicais. Nesse contexto, destaca-se o gênero *Bradyrhizobium*, composto por microrganismos altamente diversos e adaptados a solos tropicais, embora ainda pouco explorados em leguminosas forrageiras (Delamuta *et al.*, 2016).

A seleção de estirpes de *Bradyrhizobium* adaptadas às condições edafoclimáticas locais é determinante para maximizar os benefícios da simbiose. Na região da Chapada do Araripe, onde os solos apresentam limitações como acidez elevada e toxidez por alumínio, a adoção de bioinoculantes eficientes representa uma estratégia promissora para aumentar o desempenho agrônômico de *S. guianensis*.

Diante disso, este estudo hipotetizou que o uso do inoculante bacteriano tem potencial de aumentar a produtividade do *Stylosanthes guianenses*, assim como o inoculante associado a adubação química e orgânica. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da inoculação com a cepa *Bradyrhizobium japonicum* sobre o desenvolvimento e a eficiência simbiótica de *Stylosanthes guianensis*, cultivada em Latossolo Amarelo da Chapada do Araripe.

Metodologia

Descrição da área de estudo e estabelecimento da cultura

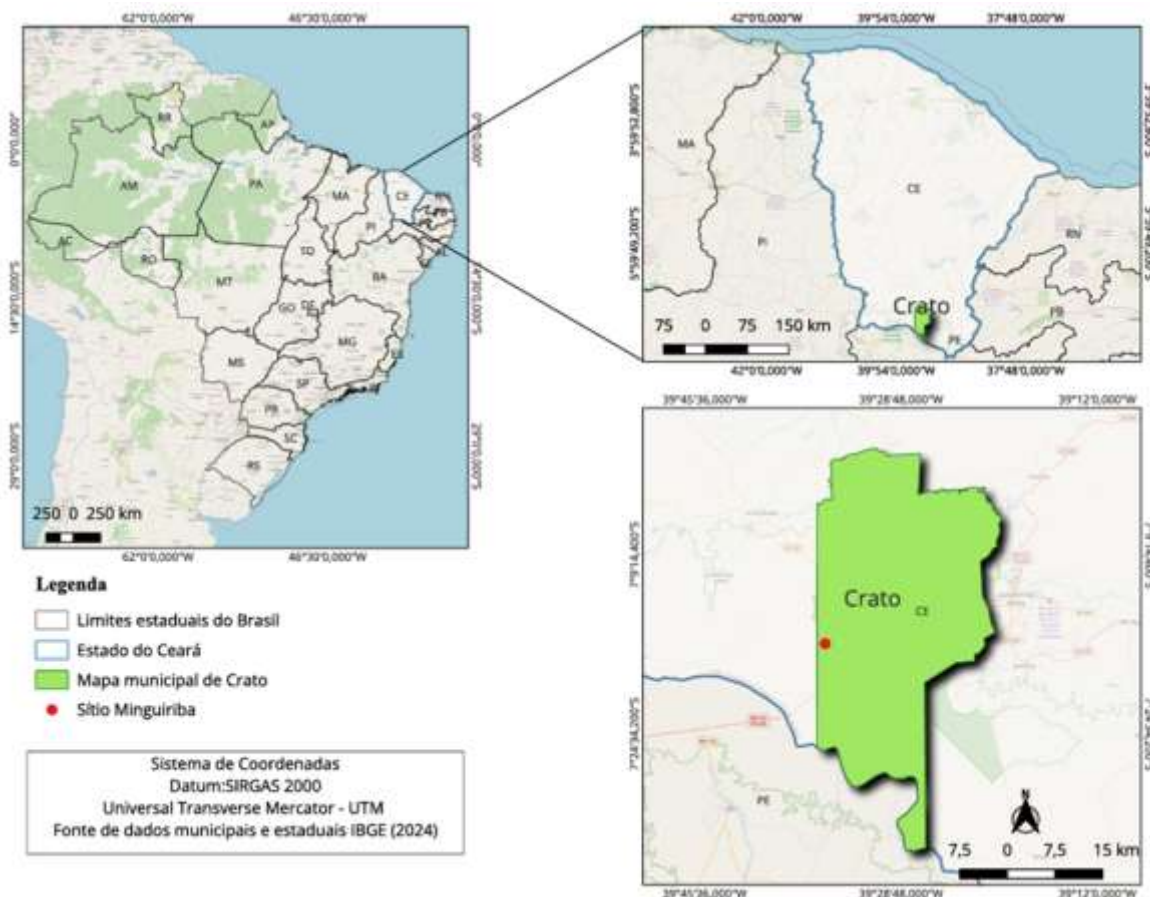
O estudo foi conduzido em uma propriedade privada localizada no Sítio Minguiriba, zona rural do município do Crato – CE, na região da Chapada do Araripe (7°16'48"S; 39°35'16"W) ilustrado na Figura 2. A implantação do experimento ocorreu em janeiro de 2025 durante a estação chuvosa, precedida por análise química do solo realizada em novembro de 2024. Para caracterização da área experimental, foram coletadas quatro amostras compostas de solo na profundidade de 0–15 cm, sendo a amostra 01 correspondente à área destinada ao cultivo de *Stylosanthes guianensis*, registrada sob o boletim nº 141124 – 09 6671.

O solo experimental foi classificado como Latossolo Amarelo Distrófico típico com textura argilosa, desenvolvido sobre relevo plano e originado da alteração dos arenitos da Formação Exu (Grupo Araripe), a região do estudo localiza-se em fase de transição floresta subcaducifólia/cerrado tropical caducifólio de relevo plano (FUNCEME, 2024). A área destinada ao experimento encontrava-se anteriormente sob vegetação nativa, preservada em seu estado natural de fertilidade, sem registro de práticas anteriores de adubação química, entretanto, a área apresentou histórico de incêndio recente, o que reforçou a necessidade de intervenções. Dessa forma, foram aplicadas práticas corretivas para adequação das condições químicas do solo, para a viabilidade do experimento e o adequado desenvolvimento das plantas.

O experimento foi conduzido em monocultivo de *Stylosanthes guianensis*, utilizando sementes fornecidas pela Embrapa Cerrados. A inoculação foi realizada com inoculante

comercial na formulação líquida (Rhizonit), contendo *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079 E 5080) em uma concentração de 5×10^9 UFC/mL, disponibilizado pela empresa Innova LTDA. A escolha do gênero *Bradyrhizobium* justifica-se por sua ampla capacidade de estabelecer simbiose com diversas espécies de leguminosas, promovendo a fixação biológica de nitrogênio e contribuindo para a melhoria da fertilidade do solo (Beukes *et al.*, 2016).

Figura 4: Representação cartográfica da localização do município de Crato – CE

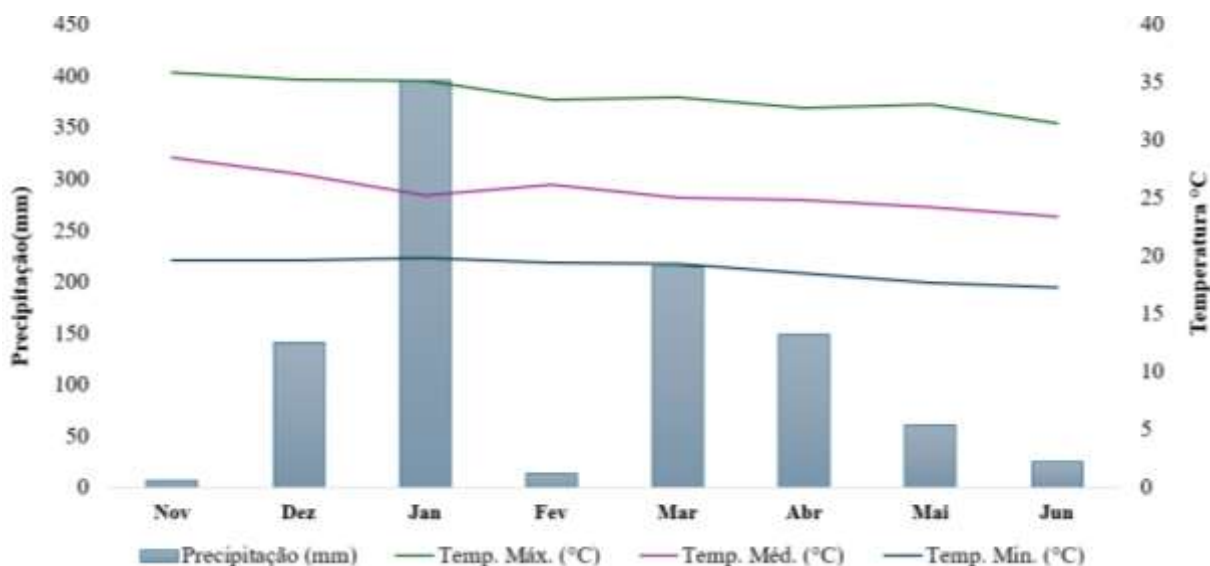


Fonte: Dados cartográficos (IBGE, 2024).

As informações climáticas referentes ao período experimental foram obtidas a partir da estação meteorológica automática localizada entre os municípios de Crato e Santana do Cariri, operada pela Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos (FUNCEME) e disponibilizados pela estação meteorológica convencional posto 315 – Santa Fé - Crato. A Figura 3 apresenta a variação da precipitação acumulada (mm), bem como das temperaturas máximas e mínimas do ar (°C) registradas ao longo do experimento conduzido no sítio Minguiriba, município de Crato – CE, no período de novembro de 2024 a junho de 2025. Esses

dados são essenciais para a interpretação dos resultados obtidos, uma vez que os fatores climáticos influenciam diretamente a atividade microbológica no solo, o desenvolvimento das culturas e a dinâmica dos processos bioquímicos em ambientes tropicais semiáridos.

Figura 5: Precipitação pluviométrica, temperaturas máximas e mínimas do ar obtidas durante o experimento



Fonte: FUNCEME (2025).

Estimativa da textura, caracterização química do solo e caracterização química da adubação orgânica

Antes da implantação dos tratamentos experimentais, foram coletadas amostras de solo na camada de 0–15 cm para a avaliação química da área de estudo. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Análise de Solo e Plantas (LASP), realizado no âmbito do Convênio IPA–VALEEXPORT–EMBRAPA, com foco na caracterização química, conforme estabelecido no respectivo Boletim técnico nº 141124 – 09 6671. As análises químicas do solo realizados no LASP foram conduzidas de acordo com os procedimentos descritos pela EMBRAPA (2017) e interpretados pelo guia prático de Sobral et al., (2013).

O teor de matéria orgânica (MO) foi determinado pelo método de Walkley–Black (Silva, 1999). A extração de fósforo (P), potássio (K), sódio (Na), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn) foi realizada pelo método Mehlich 1 (HCl + H₂SO₄). Cálcio (Ca), magnésio (Mg) e alumínio (Al) foram extraídos com solução de KCl 1 mol L⁻¹; a acidez

potencial ($H^+ + Al^{3+}$) foi determinada por acetato de cálcio; e o enxofre (S) foi extraído por fosfato de cálcio. A soma de bases (SB) foi calculada como $SB = Ca^{2+} + Mg^{2+} + Na^+ + K^+$; a capacidade de troca catiônica a pH 7,0 [CTC (pH 7,0)] foi obtida por $CTC = SB + (H^+ + Al^{3+})$; a CTC efetiva (CTCe) foi determinada pela expressão $CTCe = SB + Al^{3+}$; e a saturação por bases (V%) foi calculada por $V\% = (SB/CTC) \times 100$. O boro (B) foi determinado por extração com HCl quente 1 mol L^{-1} . A condutividade elétrica (CE) foi avaliada na pasta de saturação; a porcentagem de sódio trocável (PST) e a saturação por alumínio [m(%)] foram calculadas conforme metodologia padrão. A interpretação dos resultados baseou-se nos critérios estabelecidos por Sobral *et al.* (2015), SiBCS (2018) e Prezotti & Guarçoni (2013).

No mesmo laboratório, procedeu-se à análise química do adubo orgânico (esterco) empregado como cobertura no experimento, conforme o Boletim nº 131025-152212 referente à caracterização do composto e interpretação com base no protocolo de Malavolta *et al.*, (1997) As determinações dos nutrientes foram realizadas conforme os procedimentos descritos por Malavolta (1997). O nitrogênio (N) foi determinado por digestão sulfúrica; os teores de fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), zinco (Zn) e sódio (Na) foram obtidos após digestão nítrico-perclórica; e o boro (B) foi determinado por digestão via seca.

A análise realizada em novembro de 2024 evidenciou que o solo apresenta caráter ácido (pH 4,8), com elevada acidez potencial ($5,12 \text{ cmol}_k/\text{dm}^3$) e presença de alumínio trocável ($0,90 \text{ cmol}_k/\text{dm}^3$), fatores limitantes para o desenvolvimento de culturas sensíveis. A capacidade de troca catiônica (CTC) a pH 7,0 ($7,62 \text{ cmol}_k/\text{dm}^3$) é considerada moderada; entretanto, a baixa saturação por bases (33 %) e a soma de bases ($2,50 \text{ cmol}_k/\text{dm}^3$) indicam restrição na disponibilidade de cátions básicos, demandando práticas corretivas, como calagem e suplementação de potássio e cobre. Os teores de fósforo, ferro, manganês, zinco e boro encontram-se em níveis adequados. O resultado dessa análise possibilitou o planejamento dos tratamentos adequados para implementação do experimento. O detalhamento dos parâmetros químicos está apresentado na Tabela 4.

Tabela 4: Caracterização química do solo

PH (H ₂ O) 1:2,5	Mat. Org.	C	S-SO ₄ ⁻²	P disponível			V	
		g kg ⁻¹		mg kg ⁻¹			%	
4,8	12,9	7,5	5,4	15,6		33		
K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	SB	Al ³⁺	H+Al	CTC a PH 7,0	CTC efetiva
cmolc dm ⁻³								
0,08	2,13	0,29	0,01	2,50	0,90	5,12	7,62	3,40
Cu		Fe		Mn		Zn		B
mg dm ⁻³								
0,1		54,0		2,6		1,0		0,8

MO: Matéria orgânica; C: Carbono orgânico; SB: Soma de bases; CTC: Capacidade de troca de cátions; V: Saturação por bases; pH: Potencial hidrogeniônico; H⁺+Al³⁺: Acidez potencial; Al³⁺: Alumínio trocável; K⁺: Potássio; Ca²⁺: Cálcio; Mg²⁺: Magnésio; Na⁺: Sódio; S-SO₄⁻²: Enxofre disponível na forma de sulfato; P: Fósforo disponível; Cu: Cobre; Fe: Ferro; Mn: Manganês; Zn: Zinco; B: Boro. Valores expressos em g kg⁻¹, mg kg⁻¹, mg dm⁻³, cmol_k/dm³ ou %, conforme indicado.

Na tabela 5, está representada a análise do adubo orgânico, com pH alcalino (9,3), elevado teor de matéria orgânica (486,3 g kg⁻¹) e relação C/N de 15, indicando material estabilizado e com potencial de mineralização gradual. A CTC elevada (298,67 cmolc kg⁻¹) reflete alta capacidade de retenção de cátions, enquanto a condutividade elétrica (14,59 dS m⁻¹) indica elevada concentração de sais solúveis. Observou-se ainda, alto conteúdo de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg) e micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn e Zn).

Tabela 5: Caracterização química do adubo orgânico

pH	Mat. Org.		Teor umidade	CTC	C.E./25°C		
	g/kg		%	cmolc/kg	dS/m		
9,3	486,3		6,20	298,67	14,59		
N	P	K	Ca	Mg	C	C/N	S
g/kg							
19,43	11,13	30,50	24,80	7,50	282,09	15	8
B		Cu	Fe	Mn	Zn	Na	
mg/kg							
55,9		540	3960	494	310	8100	

MO: Matéria orgânica; C: Carbono orgânico; SB: Soma de bases; CTC: Capacidade de troca de cátions; V: Saturação por bases; pH: Potencial hidrogeniônico; $H^+ + Al^{3+}$: Acidez potencial; Al^{3+} : Alumínio trocável; K^+ : Potássio; Ca^{2+} : Cálcio; Mg^{2+} : Magnésio; Na^+ : Sódio; $S-SO_4^{2-}$: Enxofre disponível na forma de sulfato; P: Fósforo disponível; Cu: Cobre; Fe: Ferro; Mn: Manganês; Zn: Zinco; B: Boro. Valores expressos em $g\ kg^{-1}$, $mg\ kg^{-1}$, $mg\ dm^{-3}$, $cmol_k/dm^3$ ou %, conforme indicado

Com o objetivo de complementar a caracterização textural do solo, previamente classificado como latossolo amarelo distrófico típico de textura argilosa, realizou-se o Teste da Jarra Simplificado, uma metodologia empírica baseada na sedimentação diferencial das partículas de solo (areia, silte e argila) em coluna líquida. O teste é reconhecido por sua aplicabilidade em avaliações de campo e foi conduzido conforme protocolo adaptado para estimar as frações texturais por meio de medidas diretas das alturas de cada camada sedimentada após repouso.

Foram analisadas três amostras independentes do solo da camada superficial (0–15 cm), obtidas na área destinada ao experimento com *Stylosanthes guianensis*. Após o preparo das amostras, as soluções decantadas foram medidas com régua milimetrada e convertidas em porcentagens relativas com base na altura total da coluna de sedimentos, segundo a fórmula:

Equação 1: Estimativa textural das porções do solo

$$\text{Porcentagem da Areia} = \frac{A}{T} \times 100$$

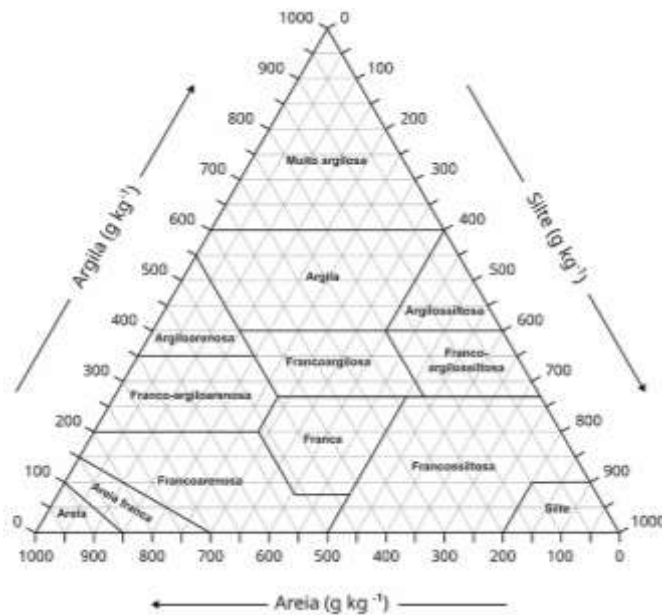
$$\text{Porcentagem do Silte} = \frac{S}{T} \times 100$$

$$\text{Porcentagem da Argila} = \frac{C}{T} \times 100$$

Onde: A = Altura da Areia; S = Silte; C = Argila; T = Altura total dos sedimentos

As proporções obtidas foram posteriormente comparadas ao Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (SiBCS), o que permitiu a classificação das amostras como arenoso para as amostras. A figura 8 representa o triângulo textural do solo.

Figura 6: Triângulo textural do solo



Fonte: SiBCS / Embrapa (2025).

Determinação da umidade do solo

A determinação da umidade do solo foi realizada por meio do método gravimétrico, conforme descrito no Manual de Métodos de Análise de Solo da Embrapa (Teixeira, 2017),

com o objetivo de ajustar as contagens das unidades formadoras de colônia (UFCs). Amostras de solo úmido, com massa inicial de 15 g, foram pesadas em cápsulas de alumínio previamente taradas. Em seguida, as amostras foram submetidas à secagem em estufa a 105 °C por 24 horas, após foram novamente pesadas para obtenção da massa seca. O conteúdo gravimétrico de água (CGA), expresso em kg kg^{-1} , foi calculado a partir da diferença entre a massa da amostra úmida (a) e a massa da amostra seca (b), conforme apresentado na equação a seguir:

Equação 2: Determinação gravimétrica da umidade

$$\text{CGA} = \left(\frac{a - b}{b} \right)$$

CGA – conteúdo gravimétrico de água (umidade em base gravimétrica) em kg kg^{-1} .

a – massa da amostra úmida, em g.

b – massa da amostra seca a 105 °C até atingir peso constante, em g.

A tabela 6 apresenta os valores estimados das frações texturais do solo obtidas pelo método de sedimentação em jarra, para as três amostras avaliadas, os resultados evidenciaram elevadas porcentagem de areia, variando entre 87,23 % e 91,49 %, associada a baixos teores de silte (6,38 % e 10,64 %) e argila (2,13 %). Essa distribuição caracteriza texturais predominantemente arenoso, incluindo o material classificado como franco-arenoso na amostra 2.

Tabela 6: Estimativa das frações texturais do solo por método de sedimentação em jarra

Amostra	Areia (%)	Silte (%)	Argila (%)	Textura
1	87,23	10,64	2,13	Arenoso
2	86,96	6,52	6,52	Franco-arenoso
3	91,49	6,38	2,13	Arenoso

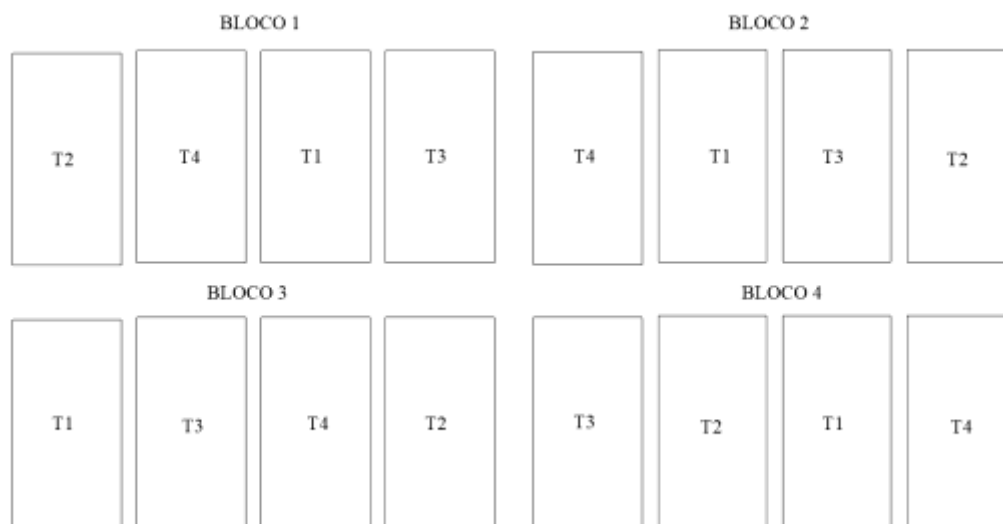
Fonte: Agritech, 2025

A média das porcentagens correspondentes a Areia (88,56 %), Silte (7,85 %) e Argila (3,59 %) foram submetidos a análise no triângulo textural do solo, tais resultados indicam uma predominância da fração areia, condizente com as observações em campo. Este tipo de solo possui baixa capacidade de retenção de umidade, menor teor de matéria orgânica, e alta taxa de infiltração podendo ocasionar alta susceptibilidade à erosão e à perda de fertilidade, o podendo resultar em efeitos negativos quanto as propriedades químicas e físicas do solo, como menor produtividade da cultura (Alghamdi, Majrashi e Ibrahim, 2024).

Delineamento experimental e especificação dos tratamentos

O experimento em monocultivo de *S. guianensis* foi conduzido em delineamento em blocos casualizados, com quatro repetições. Cada parcela experimental possuía 16 m² (2 × 8 m), totalizando 16 unidades experimentais, distribuídas em quatro blocos, com quatro tratamentos: controle negativo (sem inoculação) (CN), inoculação com *Bradyrhizobium japonicum* (INO) (SEMIA 5079 E 5080 em concentração de 5x10⁹ UFC/mL foi inoculado diretamente sobre a semente dentro do sulco com volume aproximado de 1,55 mL), adubação nitrogenada mineral (ureia) associada à adubação orgânica (esterco bovino) (NPK+ADUB), e a combinação de inoculação + N mineral (ureia) + adubação orgânica (esterco bovino) (INO+NPK+ADUB). Cada parcela foi composta por quatro sulcos de 0,5 m de espaçamento, conforme representado na Figura 5.

Figura 7: Delineamento dos blocos casualizados



A figura 5 representa o delineamento em blocos casualizados na área de estudo do campo, para minimizar a interferência entre tratamentos e adequar-se às condições da área experimental. Onde T = Tratamento; T1=Controle Negativo; T2 = Inoculante; T3= NPK + Adubo orgânico; T4 = Inoculante + NPK + Adubo orgânico.

Previamente à instalação do experimento (Aproximadamente 30 dias), foi realizada a correção da acidez do solo com calcário dolomítico, para atingir saturação por bases de 50% ($V = 50\%$), valor recomendado para culturas de pastagem e leguminosas forrageiras (IPCE, 2008). A calagem foi fundamental para elevar o pH do solo, aumentar a disponibilidade de cálcio e magnésio e reduzir a toxidez por alumínio. Além disso, todos os tratamentos receberam adubação de fundação com fósforo e potássio, utilizando superfosfato simples como fonte de fósforo e o cloreto de potássio (KCl, 58% e 3 K₂O) como fonte de potássio, conforme as recomendações para a cultura e os resultados da análise química preliminar do solo da área experimental.

As quantidades aplicadas seguiram recomendações técnicas de Gonçalves Rodrigues, (2013) equivalentes a 60 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 30 kg ha⁻¹ de K₂O na fundação, correspondendo a 533,3 g de superfosfato simples e 82,8 g de KCl por parcela (2 × 8 m). Na adubação de cobertura, foram aplicadas 266,7 g de superfosfato simples e 41,4 g de KCl por parcela, ajustando-se para os tratamentos que incluíram também aplicações de esterco bovino como fonte complementar de nutrientes orgânicos, e ureia como fonte de nitrogênio mineral de rápida liberação (45 % N).

O uso do esterco bovino na adubação orgânica se justifica por sua ação benéfica na melhoria das propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, promovendo incremento da

capacidade de retenção de água, maior atividade microbiana e liberação gradual de nutrientes essenciais como nitrogênio, fósforo e enxofre (IPECE, 2008). Além disso, o uso de fontes orgânicas contribui com o acúmulo de carbono orgânico no solo.

Esse manejo fornece os macronutrientes essenciais (NPK), e estabelece condições ideais para a simbiose entre leguminosas e rizóbios, uma vez que a disponibilidade adequada de fósforo é determinante para a nodulação, crescimento do sistema radicular e eficiência da fixação biológica de nitrogênio (FBN). O uso do adubo orgânico (esterco bovino), fornecer nutrientes orgânicos, contribui para a melhoria das propriedades físicas e biológicas do solo, favorecendo a atividade de microrganismos simbióticos e o acúmulo de carbono no sistema radicular.

*Avaliação do crescimento e cobertura vegetal no estabelecimento de *Stylosanthes guianensis**

O crescimento de *Stylosanthes guianensis* foi avaliado por meio de quatro mensurações periódicas da cobertura do dossel verde, utilizando o aplicativo Canopeo® (<https://canopeoapp.com>). As medições foram realizadas nas duas linhas centrais de cada parcela, em uma área útil de 0.25 m². A estimativa da cobertura do dossel foi realizada de forma precisa e em tempo real, permitindo o acompanhamento do desenvolvimento vegetativo. A cobertura verde do dossel foi estimada em dois tempos experimentais (pré e pós-intervenção), correspondentes às avaliações realizadas antes e após a remoção manual das plantas daninhas. Paralelamente, foram determinados os teores de clorofila a (*Chl a*) e b (*Chl b*) por meio da análise da radiação transmitida pelas folhas, utilizando o equipamento ClorofiLOG® Falker CFL1030.

O manejo de plantas daninhas foi conduzido de forma seletiva, com intervenções manuais realizadas conforme a necessidade identificada em campo, em resposta à intensidade da infestação observada. Essa estratégia objetiva reduzir a competição por recursos como luz, água e nutrientes, especialmente nos estádios iniciais de desenvolvimento da cultivar, em que a interferência de plantas espontâneas pode comprometer o estabelecimento e a produtividade do dossel. O uso do método mecânico manual é uma abordagem que possui baixo impacto ambiental e de alta eficiência em sistemas de pequena escala no campo, e sem o uso de herbicidas (Moond *et al.*, 2023). Além disso, a adoção do manejo sob demanda permite intervenções mais eficientes e pontuais, de acordo com a dinâmica específica das espécies

daninhas presentes, favorecendo o uso racional da mão de obra e evitando o impacto físico excessivo sobre o solo (Moond *et al.*, 2023).

Análise estatística

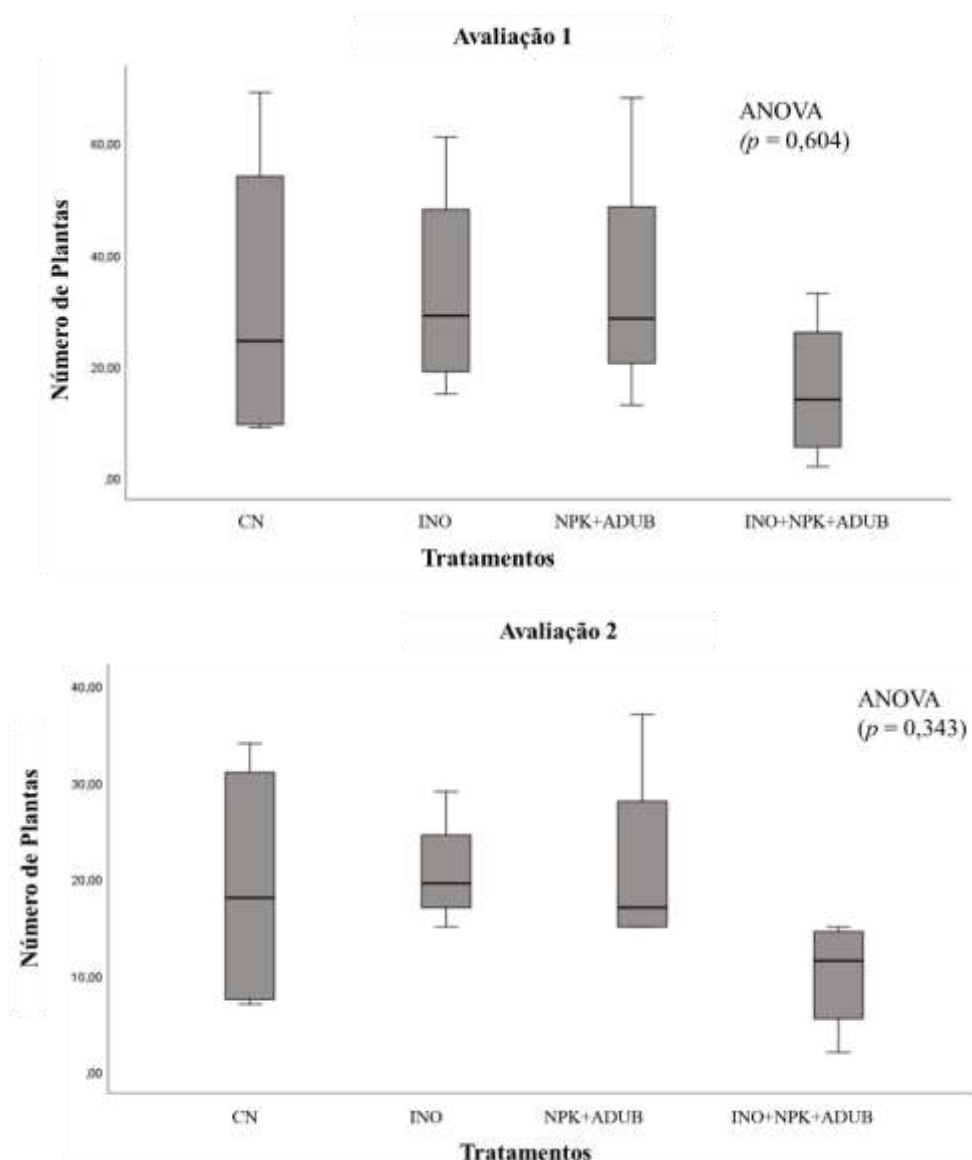
Os dados referentes ao crescimento vegetal foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov $p > 0,05$), homocedasticidade (Levene $p > 0,05$) e submetidas a análise de variância (ANOVA) unidirecional ($p < 0,05$), com testes *post hoc* de Tukey com nível de significância ($p < 0,05$). As análises respectivas a cobertura do dossel verde (Canopeo®), clorofila e unidades formadoras de colônias foram submetidas a ANOVA não paramétrica (Kruskal–Wallis). As análises foram submetidas ao software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) 27 (IBM®).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Estabelecimento da cultivar e dinâmica do número de plantas nas avaliações

A dinâmica de crescimento foi avaliada por meio da contagem do número de plantas com desenvolvimento visível nas duas linhas centrais de cada parcela experimental, dentro de cada bloco. Os dados foram analisados estatisticamente em dois períodos distintos, considerando os períodos correspondentes à primeira avaliação realizada em 14 de março de 2025 (49 dias após o plantio) e à segunda avaliação em 09 de abril de 2025 (75 dias após o plantio). Inicialmente foi realizada a análise descritiva dos resultados, seguido dos testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) para verificar a normalidade das amostras. Dessa forma, os pressupostos de normalidade foram atendidos, permitindo a aplicação de testes paramétricos subsequentes, como a ANOVA unifatorial ($p > 0,05$), para verificar o efeito dos tratamentos sobre o número de plantas. Os resultados da avaliação estão expressos no Figura 6.

Figura 8: Avaliação do crescimento da cultivar



Nos gráficos está representado a dinâmica de crescimento das plântulas (Eixo Y), e os seguintes tratamentos (Eixo X): CN: controle negativo; INO: inoculação com *Bradyrhizobium japonicum*; NPK+ADUB: Nitrogênio, Fósforo, Potássio e esterco bovino; INO+NPK+ADUB: *Bradyrhizobium japonicum* associada à adubação NPK e esterco bovino. Os dados são apresentados como diagramas de caixa (*boxplots*). Avaliação 1 (49 dias), Avaliação 2 (75 dias).

A semeadura de *Stylosanthes guianensis* foi realizada em 24 de janeiro de 2025, em condições de solo úmido, favorecidas pelo regime pluviométrico típico do início da estação chuvosa. A resposta do crescimento sob diferentes tratamentos avaliados foi mensurada por meio de duas avaliações independentes, realizadas aos 49 e 75 dias após a semeadura (DAS), correspondendo às Avaliações 1 e 2, respectivamente. Para cada avaliação foi aplicada Análise de Variância (ANOVA) com nível de significância padrão ($p = 0,05$), de forma a determinar se os tratamentos (controle negativo (CN); inoculação microbiana (INO); adubação mineral

(NPK+ADUB); e combinação de inoculação com adubação (INO+NPK+ADUB) influenciaram significativamente o estabelecimento e o desenvolvimento inicial das plantas.

Na avaliação 1 aos 49 DAS, os resultados da ANOVA não revelaram diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos quanto ao número de plantas estabelecidas ($p = 0,604$), indicando que, sob as condições experimentais, os distintos manejos não promoveram alterações detectáveis no crescimento inicial das plantas até esse momento. Na avaliação 2 aos 75 DAS, da mesma forma, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos ($p = 0,343$), evidenciando um padrão de resposta consistente entre as duas avaliações temporais.

Os dados sugerem que os tratamentos aplicados não exerceram efeito significativo sobre o estabelecimento inicial de *S. guianensis* nas parcelas experimentais aos 49 e 75 DAS. Este padrão experimental pode indicar que fatores abióticos, especialmente climáticos e de disponibilidade hídrica, exerceram um papel mais determinante que as práticas de manejo testadas (inoculação, adubação mineral e suas interações).

Estudos apontam que o desenvolvimento das plantas podem ser inibidos devido a condições adversas pós semeadura (Miljakovi *et al.*, 2022), levando a baixas taxas de germinação e mau estabelecimento das cultivares (Bouremani *et al.*, 2024), como por exemplo o período que houve interrupção pluviométrica no mês de fevereiro que precedeu a primeira avaliação. Como o solo em estudo é arenoso, sendo de rápida drenagem, esse fator pode dificultar a retenção de nutrientes aplicados, reduzindo o efeito da adubação e inoculação.

A semeadura de *S. guianensis* foi realizada em condições de solo úmido, favorecidas pelo regime pluviométrico típico do início da estação chuvosa. No entanto, ao longo do mês de fevereiro, observou-se uma acentuada redução nas precipitações pluviométricas. Essa irregularidade das chuvas comprometeu o desenvolvimento inicial das plântulas, levando à estagnação do crescimento e ao atraso no estabelecimento do dossel. Com o retorno gradual das chuvas e umedecimento do solo, o crescimento vegetativo foi retomado, permitindo a realização da primeira avaliação da cobertura do dossel em 14 de março de 2025, aos 49 dias após a semeadura.

Representação do desenvolvimento morfológico Stylosanthes guianensis

O desenvolvimento inicial das plântulas foi caracterizado por uma sequência de estágios fenológicos visivelmente definidos, iniciando-se com a emergência das folhas cotiledonares,

seguidas pela emissão dos primeiros folíolos verdadeiros. Nos primeiros dias após o plantio, foi possível acompanhar o crescimento das plantas de forma individualizada e a fase inicial de estabelecimento. Com o avanço do desenvolvimento do *Stylosanthes*, observou-se o início da ramificação lateral com à perda gradual da individualidade visual das plantas, sobretudo em áreas com alta densidade de estabelecimento. A sobreposição dos ramos e a expansão do dossel dificultaram a distinção entre indivíduos, tornando inviável a contagem direta de plantas a campo nas avaliações subsequentes Avaliação 3 (121 dias após o plantio) e Avaliação 4 (152 dias após o plantio).

A transição para a fase reprodutiva foi evidenciada pela emissão dos primeiros botões florais, seguida pelo florescimento efetivo com aproximadamente 116 dias após o plantio. Este marco sinaliza a maturidade fisiológica das plantas e coincide com o encerramento da fase de crescimento vegetativo ativo, iniciando a fase reprodutiva da cultura. As imagens representadas na Figura 8 (a, b e c) não correspondem a uma única planta monitorada de forma contínua, mas representam diferentes indivíduos observados em momentos distintos ao longo do experimento, com o objetivo de ilustrar visualmente os estágios sucessíveis de desenvolvimento e o padrão de ramificação característico da espécie em condições de campo.

Figura 9: Estágios iniciais de desenvolvimento de plântulas *Stylosanthes guianensis* em condições de campo

a) Fase vegetativa com folhas tomentosas, folíolos elípticos a lanceolados com nervuras inconspícuas;



b) Ramificação e transição para fase reprodutiva apresentando inflorescências em espiga, brácteas setosas;



c) Flores de corola amarela com estandarte largo-obovado e estrias vermelho-vináceas.

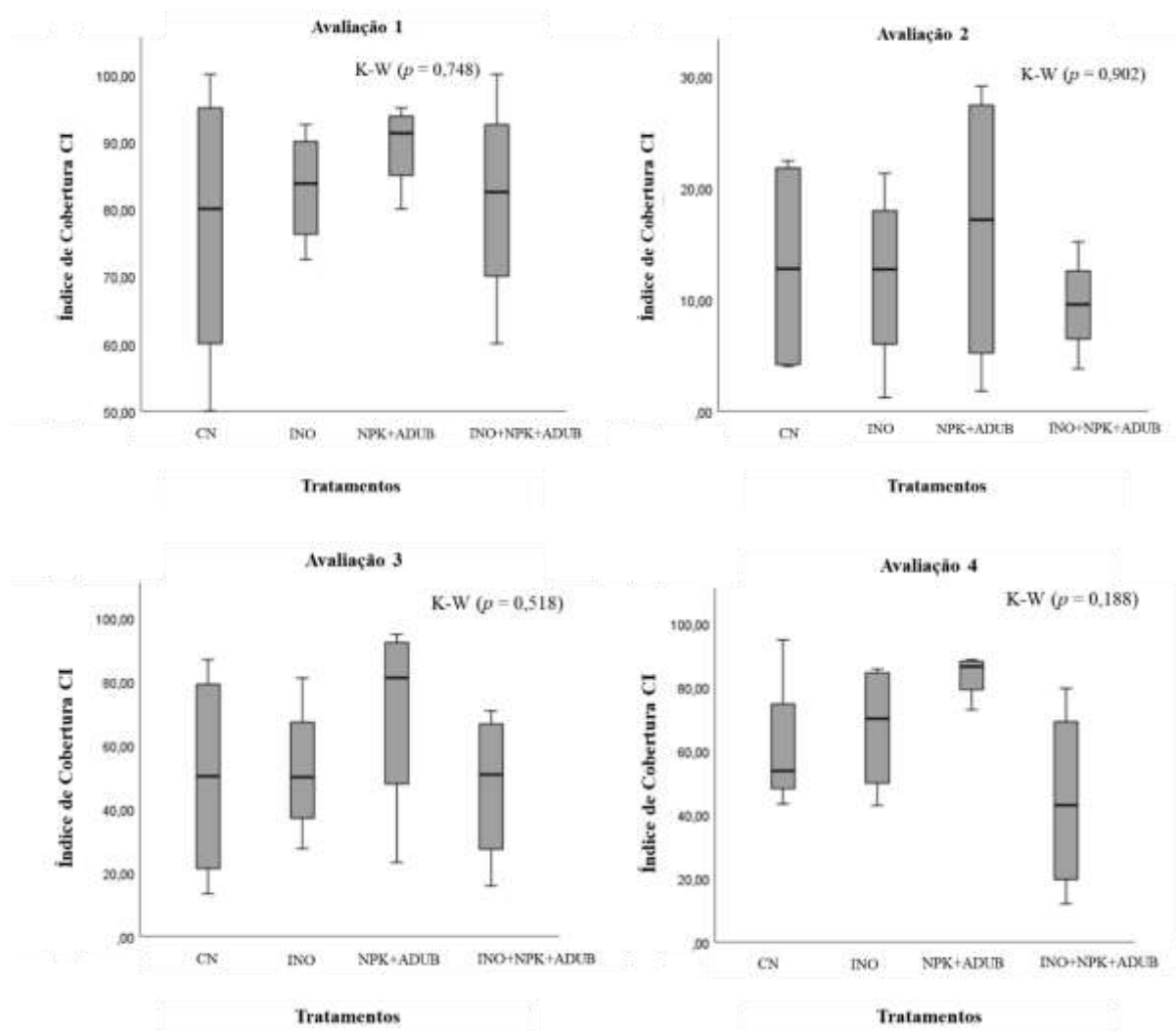


Fonte: Dados obtidos em campo

Análise da cobertura vegetal do dossel Com Invasoras (CI)

A análise do desenvolvimento da cultivar com a vegetação espontânea é um processo importante para compreender a dinâmica do sistema de competição e estabelecimento do *S. guianenses*. Para verificar a significância das variações de cobertura do dossel vegetal entre os tratamentos, foi realizada uma análise descritiva das quatro avaliações no período do experimento e verificação da homocedasticidade das variâncias entre os tratamentos pelo método de Levene. Os resultados demonstraram que nas avaliações 1, 3 e 4 da variável índice de cobertura CI, não houve violação do pressuposto de homogeneidade, com valores de significância ($p > 0,05$) variando entre 0,058 e 0,661. Entretanto, a segunda avaliação apresentou diferenças estatisticamente significativas entre as variâncias dos tratamentos com valores de p variando entre 0,022 e 0,043. Devido a amostra indicar a presença de heterocedasticidade, optou-se por aplicar o teste de Kruskal-Wallis para essa etapa, por se tratar de uma abordagem não paramétrica robusta, adequada para dados com distribuição assimétrica ou variâncias desiguais. As análises de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) estão representadas na figura 8 (Avaliação de 1-4).

Figura 10: Avaliação estatística do índice de cobertura verde do dossel vegetal (CI)



Análise estatística do índice de cobertura vegetal do dossel Com Invasoras (CI) submetido aos seguintes tratamentos: CN: controle negativo; INO: inoculação com *Bradyrhizobium japonicum*; NPK+ADUB: Nitrogênio, Fósforo, Potássio e esterco bovino; INO+NPK+ADUB: *Bradyrhizobium japonicum* associada à adubação NPK e esterco bovino. Os dados são apresentados como diagramas de caixa (*boxplots*). Avaliação 1 (49 dias), Avaliação 2 (75 dias), Avaliação 3 (121 dias) e Avaliação 4 (152 dias).

Após aplicar o teste de Kruskal-Wallis, a primeira avaliação não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ($p = 0,748$). Os valores do índice de cobertura vegetal do dossel com invasoras (CI) apresentaram variações entre os grupos, com destaque para o CN, que exibiu a maior amplitude interquartílica. Embora visualmente o tratamento NPK+ADUB tenha apresentado uma mediana mais elevada e menor dispersão, os resultados não foram estatisticamente diferentes dos demais grupos. Os resultados da segunda avaliação corroboram com os da primeira, com ausência de diferenças significativas entre os

grupos ($p = 0,902$). Observa-se que o tratamento NPK+ADUB apresentou novamente os maiores valores medianos de Canopeo CI, enquanto o tratamento INO+NPK+ADUB obteve os menores. No entanto, a sobreposição dos intervalos interquartis entre os tratamentos reforça a inexistência de diferenças estatisticamente relevantes nesse estágio de desenvolvimento.

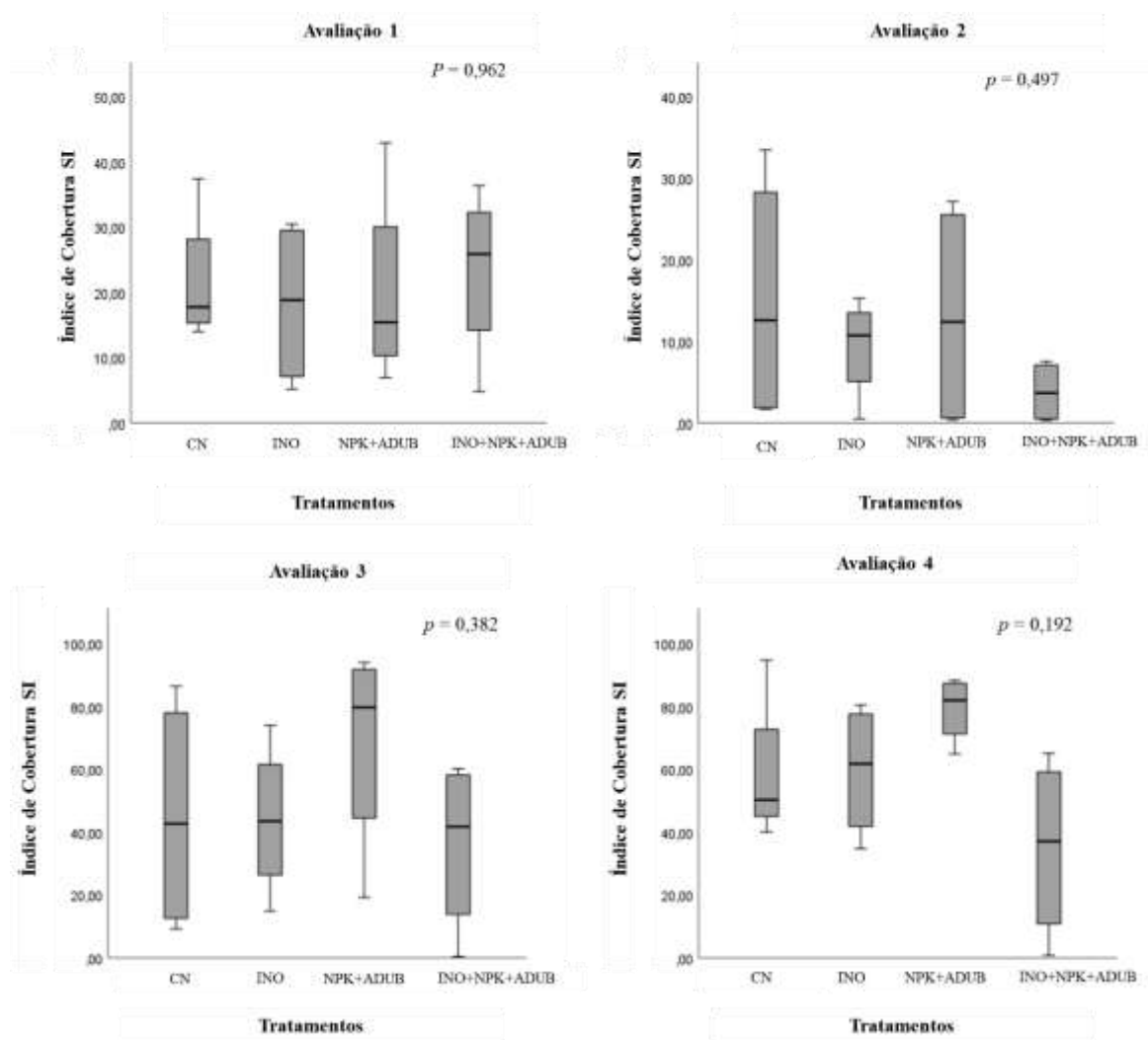
Na terceira avaliação, o valor de p permaneceu acima do limiar de significância ($p = 0,518$). Os dados revelam uma maior concentração de valores elevados no grupo NPK+ADUB, que apresentou mediana superior e menor variabilidade. Por outro lado, os tratamentos CN e INO demonstraram maior dispersão e valores medianos mais baixos. Tais resultados sugerem um aumento da cobertura vegetal com a adubação. Na quarta avaliação, a estatística do teste atingiu um ($p = 0,188$), ainda acima do nível de significância adotado ($p = 0,05$). Os resultados indicam uma diferenciação mais clara entre os tratamentos: NPK+ADUB e INO apresentaram medianas superiores e distribuições mais concentradas, enquanto CN e INO+NPK+ADUB exibiram maior variabilidade e menores medianas. Apesar da ausência de significância estatística, ainda assim observa-se um desempenho agrônômico superior dos tratamentos com adubação química e orgânica.

De forma geral, os resultados obtidos nas quatro avaliações não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos quanto à variável índice de cobertura vegetal do dossel CI. No entanto, os gráficos de *boxplot* revelam padrões consistentes de tendência: tratamentos com adubação química (NPK+ADUB) frequentemente apresentaram maiores medianas e menor variabilidade, o que pode indicar um efeito positivo na cobertura do dossel vegetal.

Análise estatística do índice de cobertura vegetal do dossel Sem Invasoras (SI)

Após a eliminação da vegetação espontânea, o índice de cobertura do dossel (CI) foi reavaliado com o objetivo de mensurar exclusivamente a resposta da cultivar *Stylosanthes guianensis* aos tratamentos. Inicialmente, os dados foram submetidos aos testes de normalidade de Kolmogorov–Smirnov ($p = 0,200$) e Shapiro–Wilk ($p = 0,633$), os quais indicaram aderência à distribuição normal. Contudo, em razão da assimetria observada na segunda avaliação e da heterogeneidade visual das distribuições, optou-se pela aplicação do teste não paramétrico de Kruskal–Wallis, conforme apresentado na figura 9.

Figura 11: Avaliação estatística do índice de cobertura verde do dossel vegetal (SI)



Análise estatística da cobertura vegetal do dossel Sem Invasoras (SI) submetido aos seguintes tratamentos: CN: controle negativo; INO: inoculação com *Bradyrhizobium japonicum*; NPK+ADUB: Nitrogênio, Fósforo, Potássio e esterco bovino; INO+NPK+ADUB: *Bradyrhizobium japonicum* associada à adubação NPK e esterco bovino. Os dados são apresentados como diagramas de caixa (*boxplots*). Avaliação 1 (49 dias), Avaliação 2 (75 dias), Avaliação 3 (121 dias) e Avaliação 4 (152 dias).

O teste de Kruskal-Wallis não indicou diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ($p > 0,05$), em todas as avaliações. Entretanto, visualmente podemos comparar a diferença entre os *boxplots*, na primeira avaliação, os valores obtidos foram homogêneos entre os tratamentos. O CN e INO apresentaram medianas similares, entretanto o CN apresentou a mediana próxima ao primeiro quartil (Q1) indicando assimetria nas amostras, o tratamento NPK+ADUB obteve a menor mediana entre os tratamentos, associada a maior amplitude interquartilica, sugerindo que algumas plantas ainda estavam em desenvolvimento lento. O grupo INO+NPK+ADUB demonstrou uma distribuição mais estável, com valores medianos

intermediários e variabilidade controlada devido a mediana próxima ao terceiro quartil (Q3) indicando que há um melhor desenvolvimento das plantas nesse tratamento.

Na segunda avaliação o grupo CN apresentou grande dispersão, entretanto, a mediana se manteve próxima aos tratamentos INO e NPK+ADUB, o tratamento INO obteve baixa variabilidade, sugerindo um crescimento mais uniforme, mas limitado, possivelmente por deficiência nutricional não suprida apenas pelo inoculante. O NPK+ADUB revelou equilibrada distribuição dos valores dentro do intervalo interquartil (IQR), com essa análise visual, entende-se que o manejo da vegetação espontânea foi eficiente em garantir a uniformidade no desenvolvimento da cultivar. O INO+NPK+ADUB apresentou o menor desempenho, com baixa mediana e pouca variabilidade, o que pode apontar para possível antagonismo entre o inoculante e a adubação mineral neste ponto de desenvolvimento do *Stylosanthes*.

Na terceira avaliação, o tratamento CN manteve a distribuição equilibrada dentro o IQR, apesar de que o tratamento com INO também tenha apresentado um comportamento intermediário, a variabilidade entre as amostras foi menor do que o CN, o NPK+ADUB apresentou a maior média e proximidade ao Q3, indicando que nessa avaliação, para esse tratamento, as plantas obtiveram bom desenvolvimento, o que é esperado, entretanto demonstrou ter sido mais eficaz do que o INO+NPK+ADUB, o qual voltou a demonstrar ampla dispersão e mediana próxima ao Q3, mas ainda inferior ao tratamento com apenas a adubação química e orgânica. Esse resultado sugere que o tratamento NPK+ADUB isolado se mostra superior tanto ao controle quanto às combinações com inoculantes neste ponto do ciclo.

Na quarta avaliação houve uma redução no valor de ($p = 192$), sinalizando uma maior tendência à diferenciação estatística entre os tratamentos, embora ainda não significativa ao nível de 5 %. O tratamento CN apresentou a mediana próxima ao Q1, indicando que há assimetria positiva, e que houve heterogeneidade no desenvolvimento vegetal nessa etapa do ciclo. O tratamento com INO possui a mediana próxima ao centro, representando uma possível distribuição equilibrada, porém o *bloxplot* indica que há alta variabilidade na mensuração da variável entre as plantas. O NPK+ADUB manteve os maiores valores medianos e menor variabilidade, indicando estabilidade na resposta positiva ao adubo químico e orgânico. O tratamento com INO+NPK+ADUB apresentou novamente maior dispersão e menor mediana, sugerindo que a combinação pode não ter gerado sinergismo esperado, ou que fatores externos interferiram na resposta fisiológica.

Ao comparar os tratamentos dentro da avaliação do índice de cobertura vegetal sem espécies invasoras, nota-se que apenas o inoculante não promoveu aumento do dossel vegetal,

o inoculante associado a adubação química e orgânica apresentam baixas medianas. O tratamento que visualmente se destaca na avaliação é o NPK+ADUB, apesar de que na primeira avaliação obteve a menor mediana, nas demais avaliações, principalmente na quarta, demonstrou maior uniformidade entre os tratamentos sob o desenvolvimento do dossel vegetal, essa diferença visual pode ter ocorrido devido a liberação gradativa dos nutrientes da adubação (Wang *et al.*, 2024).

Apesar da escassez de estudos com a cultivar *S. guianenses* associada ao *Bradyrhizobium japonicum*, hipóteses podem ser geradas com base na observação com tendências em outras leguminosas. O estudo de Wei *et al.* (2023), demonstrou uma tendência que sugere efeito positivo da adubação conjunta na promoção da cobertura do dossel, relatando que a associação entre microrganismos (*Rhizobium* sp.) e fertilizantes NPK pode proporcionar melhores parâmetros de nutrição e produtividade em amendoim. Além disso apesar de que as quantidades de fertilizantes orgânicos e químicos foram calculados com base na deficiência nutricional do solo, pode ter ocorrido inibição no tratamento INO+NPK+ADUB, visto que na literatura já foi relatado que o N pode reduzir a eficácia da inoculação em soja inoculada com *B. japonicum* sob exposição prolongada a nitratos, podendo ocasionar efeito inibitório associado ao aumento na resistência à difusão de O₂ no bacteróide, o que pode explicar a menor cobertura observada neste tratamento (Galindo *et al.*, 2022).

Além disso, a ausência de significância estatística pode ser atribuída a diversos fatores, tais como o tamanho amostral relativamente reduzido (n = 16 por grupo), a variabilidade inerente aos dados, e a possível necessidade de um maior intervalo de tempo para que os efeitos dos tratamentos biológicos, como o uso do inoculante se manifestem plenamente. Assim, embora os resultados não tenham alcançado significância estatística, os padrões observados indicam que a adubação química e orgânica promove um efeito benéfico no crescimento do dossel de *Stylosanthes guianensis*, e que o manejo integrado com inoculação deve ser cuidadosamente calibrado para evitar a supressão da simbiose.

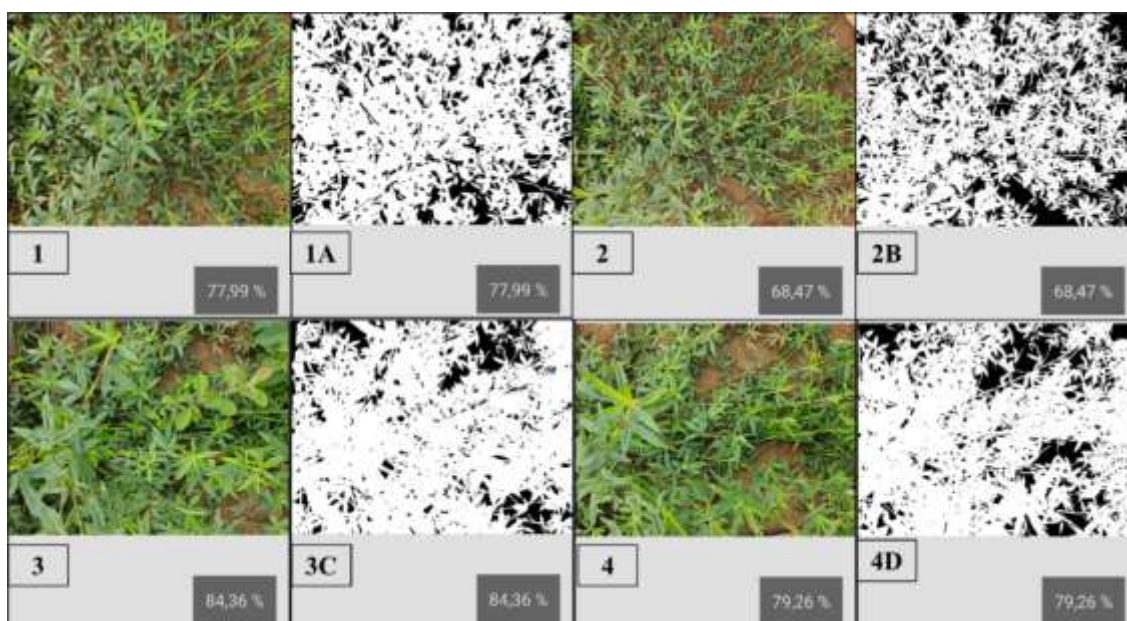
Cobertura vegetal do dossel

A análise das imagens obtidas antes e após a remoção da vegetação espontânea foi realizada nas linhas centrais de cada tratamento por bloco, em uma área de 50 x 50 cm. As representações nos pares de imagens 1 e 3 (Fotos tiradas no aplicativo) 1A e 3A (Fotos processadas no aplicativo), referem-se à condição da vegetação anterior ao manejo,

evidenciando uma cobertura densa e heterogênea, influenciada pela presença da vegetação espontânea. As imagens foram analisadas por meio do aplicativo Canopeo® (%).

Após a intervenção, os pares de imagens 2 e 2B, e 4 e 4D, demonstram alterações na estrutura da vegetação, com destaque para a redução ou redistribuição da cobertura. Esse resultado sugere que a remoção das invasoras teve impacto direto na composição e na densidade da vegetação, alterando os índices de cobertura registrados pelas imagens processadas.

Figura 12: Estimativa de cobertura do dossel vegetal (%)



Fonte: Imagens processadas pelo Canopeo®.

Quantificação do índice relativo dos pigmentos fotossintéticos

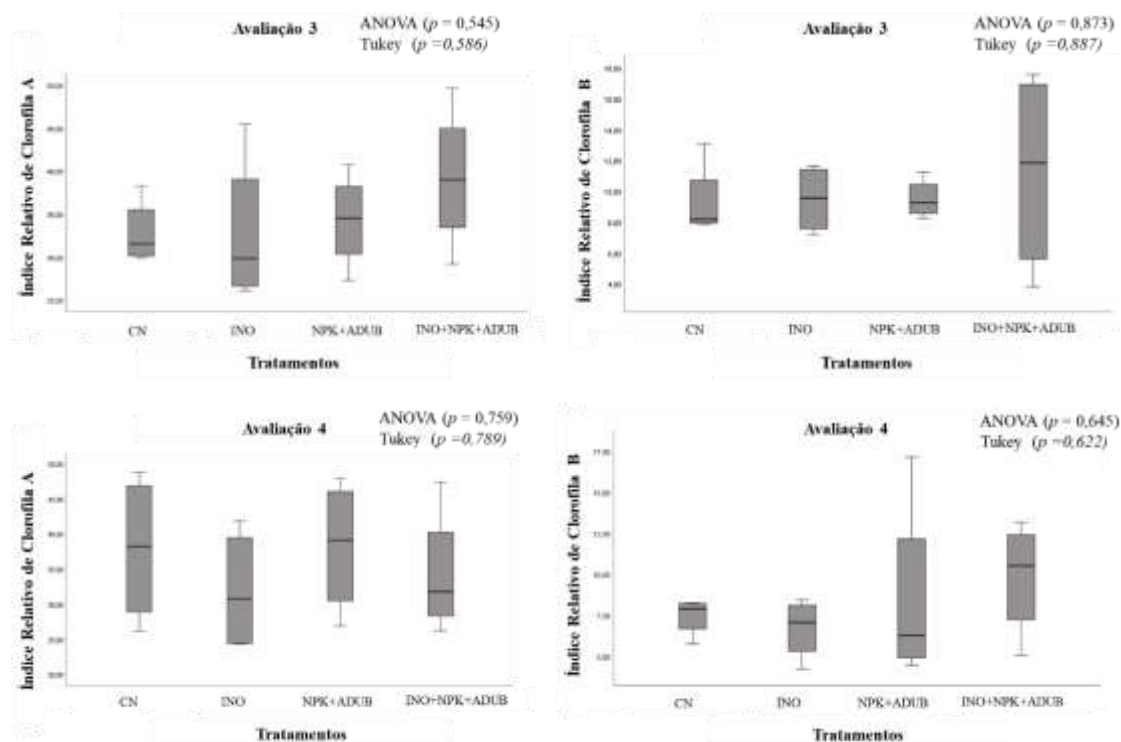
Com o objetivo de avaliar o efeito dos diferentes tratamentos sobre os pigmentos fotossintéticos, foram mensurados os teores de clorofila A (*Chl a*) e clorofila B (*Chl b*). As avaliações 1 e 2 não foram realizadas por esse método devido ao tamanho da área foliar do *Stylosanthes* impossibilitar a leitura no equipamento.

*Avaliações do índice relativo de Clorofila A (*Chl a*) e Clorofila B (*Chl b*)*

Para verificar a significância do índice relativo de Clorofila a/b entre os tratamentos, foi realizada uma análise descritiva das duas avaliações no período do experimento e verificação da homocedasticidade das variâncias entre os tratamentos pelo método de Levene. Após os

dados terem passado pelo teste de homocedasticidade foi aplicado a ANOVA unifatorial e teste de *pos-hoc* de Tukey. Os dados da 3 e 4 avaliações estão representados a seguir no Gráfico 5.

Figura 13: Teor relativo de Chl a e Chl



Índice relativo de clorofila (*Chl a/b*) em plantas submetidas a diferentes tratamentos na Avaliação 3 (121 dias), Avaliação 4 (152 dias). CN: controle negativo; INO: inoculação com *Bradyrhizobium japonicum*; NPK+ADUB: Nitrogênio, Fósforo, Potássio e esterco bovino; INO+NPK+ADUB: *Bradyrhizobium japonicum* associada à adubação NPK e esterco bovino. Os dados são apresentados como diagramas de caixa (*boxplots*).

A análise de variância (ANOVA) indicou ausência de diferenças estatisticamente significativa entre os tratamentos em todas as avaliações. Em conformidade, o teste de comparações múltiplas de Tukey também não apontou distinções significativas entre os pares de tratamentos avaliados. Avaliação 3 índices de clorofila a (ANOVA $p = 0,545$; Tukey $p = 0,586$) índice de clorofila b (ANOVA $p = 0,873$; Tukey $p = 0,887$); avaliação 4 do índice de clorofila a (ANOVA $p = 0,759$; Tukey $p = 0,789$) índice de clorofila b (ANOVA $p = 0,645$; Tukey $p = 0,622$). Esses resultados sugerem que, embora variações visuais tenham sido observadas nos *boxplots*, as diferenças entre as médias dos tratamentos não foram suficientemente consistentes para serem consideradas estatisticamente relevantes ao nível de 5% de probabilidade.

No primeiro gráfico da avaliação 3, é representado o *boxplot* com a distribuição dos valores de Clorofila A nos diferentes tratamentos aplicados em campo. O Controle negativo (CN) apresentou a menor amplitude interquartil (IQR), indicando baixa dispersão dos dados centrais. No entanto, a mediana posicionada próxima ao primeiro quartil (Q1) revela uma assimetria positiva, com maior concentração de valores próximos ao limite inferior da amostra. Em comparação, o tratamento INO apresenta o prolongamento da caixa indicando alta dispersão dos dados centrais, a mediana também está próxima ao Q1 (25 %), indicando alta variabilidade e distribuição assimétrica. Embora alguns indivíduos tenham apresentado valores elevados de clorofila A, a maioria concentrou-se em valores mais baixos, o que sugere uma resposta heterogênea ao inoculante. Essa variação pode estar relacionada a diferenças na eficiência da simbiose ou à limitações de nutrientes no solo.

O tratamento com NPK+ADUB demonstrou dispersão intermediária e mediana bem centralizada entre os quartis (50 %), evidenciando uma distribuição simétrica, esse resultado indica que a resposta ao fornecimento de nutrientes e produção de Clorofila A foi consistente entre as plantas e dentre os demais tratamentos. A mediana superior à do CN reforça o efeito positivo exercido pela adubação sobre a síntese de pigmentos fotossintéticos. O tratamento INO+NPK+ADUB, que combinou inoculação e adubação química e orgânica, apresentou a maior mediana e os valores máximos mais altos dentre os tratamentos.

O índice de clorofila b, expresso no gráfico 2 da avaliação 3 demonstram visualmente que o CN possui a mediana próxima do primeiro quartil (Q1), sugerindo uma distribuição assimétrica positiva. Esse comportamento indica que a maior parte das amostras apresentou baixos teores de clorofila B, com apenas algumas plantas registrando valores mais elevados, os quais contribuíram para o deslocamento de Q3 e prolongamento da caixa. O tratamento com INO demonstrou uma mediana centralizada entre Q1 e Q3, o que indica uma distribuição simétrica dos dados centrais. A amplitude interquartil, superior à observada no CN, sugere uma maior variabilidade entre os indivíduos, o que pode ser atribuído a diferentes níveis de eficiência na associação simbiótica com *Bradyrhizobium japonicum*. Embora o desempenho médio tenha sido superior ao do controle, a resposta fisiológica não foi homogênea entre as plantas.

No tratamento com NPK+ADUB a mediana também esteve centralizada entre Q1 e Q3, com baixa amplitude interquartil e reduzida variação total. Esses resultados sugerem que o fornecimento de nutrientes promoveu uma resposta fisiológica uniforme, ainda que os níveis de clorofila B tenham se mantido próximos aos demais tratamentos isolados. A ausência de

variabilidade extrema indica consistência na absorção de Clorofila B. Em contrapartida, o tratamento INO+NPK+ADUB indicou variabilidade entre as plantas. Embora parte das amostras tenha apresentado desempenho expressivo na produção de clorofila B, outras mantiveram-se em níveis semelhantes aos demais tratamentos. Em síntese, embora o tratamento combinado (NPK+ADUB) tenha se destacado visualmente quanto à clorofila B, as análises estatísticas indicam ausência de diferenças significativas entre os tratamentos na avaliação considerada.

Os resultados da Avaliação 4, para o índice de clorofila a demonstram que o tratamento CN, mesmo na ausência de intervenções, apresentou mediana elevada e ampla variação entre as amostras. A inoculação isolada (INO) apresentou baixa mediana e a menor dispersão geral entre os tratamentos, o que sugere uma resposta fisiológica homogênea. O tratamento com NPK+ADUB evidenciou mediana elevada e alta dispersão, apresentando simetria quanto a posição da mediana no quartil. A combinação entre INO+NPK+ADUB apresentou uma variação acentuada, com mediana inferior nos tratamentos CN e NPK+ADUB. A proximidade da mediana em relação ao primeiro quartil (Q1) evidencia uma concentração de valores na faixa inferior, o que sugere que nem todas as plantas foram igualmente beneficiadas pela associação entre inoculação e adubação. Esses resultados podem estar relacionados à interferência entre os insumos aplicados, à competição rizosférica e a limitações edáficas.

A análise do índice relativo de Clorofila B na Avaliação 4, evidencia que CN não apresenta uma diferença significativa na variação dos dados. O grupo com INO teve uma redução na mediana, aproximadamente, além de apresentar menor dispersão dos dados. Esse resultado sugere que o inoculante de forma isolado não promove expressividade nos teores de clorofila b. O tratamento que leva NPK+ADUB demonstrou o prolongamento da caixa, indicando que houve maior variabilidade dos dados, essa ampla faixa interquartílica e valores extremos indica respostas heterogêneas as plantas quanto a adubação química associada a adubação orgânica.

O tratamento que associação a inoculação as duas adubações (INO+NPK+ADUB) apresentou maior mediana dentre os grupos, indicando que houve maior uniformidade e estabilidade nas respostas das plantas. Apesar de que a análise estatística tenha apontado que não houve significância. O comportamento do tratamento mais favorável foi INO+NPK+ADUB. Esse padrão pode estar associado a um possível efeito sinérgico entre as inoculações e que isso pode ter melhorado a capacidade fotossintética do *S. guianenses*.

CONCLUSÃO

O presente estudo evidenciou que *S. guianensis* apresenta potencial para cultivo em solos do semiárido, mesmo sob condições edafoclimáticas restritivas. Embora a inoculação com *Bradyrhizobium japonicum* tenha contribuído para o aumento da atividade microbiana, mensurada por UFC, seus efeitos sobre a cobertura vegetal e os teores de clorofila foram menos expressivos quando isolada ou combinada com adubação mineral e orgânica. A adubação NPK associada ao esterco bovino foi o tratamento que apresentou tendência de maior eficácia no estabelecimento da cultura, refletido em maior cobertura do dossel, menor variabilidade entre as amostras e índices relativos dos pigmentos fotossintéticos. A ausência de significância estatística nas variáveis sugere que os efeitos da simbiose podem demandar maior tempo para se manifestar ou estar condicionados a interações mais complexas entre planta devido as condições edafoclimáticas da Chapada do Araripe.

REFERÊNCIAS

- Agritech Center. *Soil Texture Calculator*. Kathmandu: **Agritech Center**, 2024. Disponível em: <https://agritechcenter.com.np/soil-calculator.html>. Acesso em: 16 Abril. 2025.
- Alghamdi, A. G.; Majrashi, M. A.; Ibrahim, H. M. Improving the Physical Properties and Water Retention of Sandy Soils by the Synergistic Utilization of Natural Clay Deposits and Wheat Straw. *Sustainability (Switzerland)*, 2024.
- Amorim, M. R. *et al.* Cowpea nodules host a similar bacterial community regardless of soil properties. *Applied Soil Ecology*, v. 172, n. September 2021, 2022.
- Armendariz, A. L.; Talano, M. A.; Olmos Nicotra, M. F.; Escudero, L.; Bresler, M. L.; Porporatto, C.; Agostini, E. Impact of double inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* E109 and *Azospirillum brasilense* Az39 on soybean plants grown under arsenic stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 138, n. February, p. 26–35, 2019.
- Beyene, B.; Pagano, M. C.; Vaiyapuri R, P.; Assefa Tuji, F. Microbial consortia inoculation of woody legume *Erythrina brucei* increases nodulation and shoot nitrogen and phosphorus under greenhouse conditions. *Biotechnology Reports*, v. 33, 2022.
- Beukes, C. W.; Stepkowski, T.; Venter, S. N.; Cłapa, T.; Phalane, F. L.; Roux, M. M. Le; Steenkamp, E. T. Crotalariaeae and Genisteeae of the South African Great Escarpment are nodulated by novel *Bradyrhizobium* species with unique and diverse symbiotic loci.

- Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 100, p. 206–218, 2016.
- Bouremani, N.; Cherif-Silini, H.; Silini, A.; El, N.; Rabhi, H.; Chenari, A. Osmotolerant plant growth promoting bacteria mitigate adverse effects of drought stress on wheat growth. *Microbiology*, v. 10, n. June, p. 507–541, 2024.
- Buisset, E.; Soust, M.; Scott, P. T. The Isolation of Free-Living Nitrogen-Fixing Bacteria and the Assessment of Their Potential to Enhance Plant Growth in Combination with a Commercial Biostimulant. *Microbiology Research*, v. 16, n.3, 2025.
- Canellas, L. P.; Olivares, F. L.; Canellas, N. O. A.; Jindo, K.; Rosa, R. C. C.; Piccolo, A. Challenge of transition: the history of a case study involving tropical fruits polyculture stimulated by humic acids and plant-growth promoting bacteria. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, v. 9, n. 1, p. 1–18, 2022.
- Chen, W. F.; Wang, E. T.; Ji, Z. J.; Zhang, J. J. Recent development and new insight of diversification and symbiosis specificity of legume rhizobia: mechanism and application. *Journal of Applied Microbiology*, v. 131, n. 2, p. 553–563, 2021.
- Chen, Z.; Song, J.; Li, X.; Arango, J.; Cardoso, J. A.; Rao, I.; Schultze-Kraft, R.; Peters, M.; Mo, X.; Liu, G. Physiological responses and transcriptomic changes reveal the mechanisms underlying adaptation of *Stylosanthes guianensis* to phosphorus deficiency. *BMC Plant Biology*, v. 21, n. 1, p. 1–15, 2021.
- Cho, A.; Joshi, A.; Hur, H. G.; Lee, J. H. Nodulation Experiment by Cross-Inoculation of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Root Nodules of Several Leguminous Plants. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 34, n. 3, p. 570–579, 2024.
- Das, D. R.; Horváth, B.; Kundu, A.; Kaló, P.; Dasgupta, M. Functional conservation of CYCLOPS in crack entry legume *Arachis hypogaea*. *Plant Science*, v. 281, n. September 2018, p. 232–241, 2019.
- Delamuta, J. R. M.; Ribeiro, R. A.; Araújo, J. L. S.; Rouws, L. F. M.; Zilli, J. É.; Parma, M. M.; Melo, I. S.; Hungria, M. *Bradyrhizobium stylosanthis* sp. nov., comprising nitrogen-fixing symbionts isolated from nodules of the tropical forage legume *Stylosanthes* spp. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 66, n. 8, p. 3078–3087, 2016.
- Dong, R.; Zhang, J.; Huan, H.; Bai, C.; Chen, Z.; Liu, G. 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, 2017.

Dong, W.; Song, Y. The significance of flavonoids in the process of biological nitrogen fixation. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 16, p. 1–18, 2020.

El-Sherbeny, T. M. S.; Mousa, A. M.; Zhran, M. A. Response of peanut (*Arachis hypogaea* L.) plant to bio-fertilizer and plant residues in sandy soil. *Environmental Geochemistry and Health*, v. 45, n. 2, p. 253–265, 2023.

Florencio, C.; Bortoletto-Santos, R. C. P. F.; Brondia, M. G.; Velloso, C. C. V.; Klaica, R.; Ribeiro, C.; Farinasa, C. S.; Mattoso, L. H. C. Revisão. *Quim. Nova*, v. 45, n. 9, p. 1133–1145, 2022.

Galindo, F. S. *et al.* Nitrogen recovery from fertilizer and use efficiency response to *Bradyrhizobium* sp. and *Azospirillum brasilense* combined with N rates in cowpea-wheat crop sequence. *Applied Soil Ecology*, v. 157, n. May 2020, 2021.

Galindo, F. S.; Pagliari, P. H.; Cabral, E.; Silva, V. M.; Fernandes, G. C.; Rodrigues, W. L.; Garcia, E.; Oliveira, C.; Lima, B. H. De. and Did Not Change N-Fertilizer Recovery. *Plants*, 2022.

Gissi, D. S.; Torke, B. M.; Simon, M. F.; Tomazello-Filho, M.; Fortuna-Perez, A. P. Morphological analyses support taxonomic updates in Brazilian species of *Stylosanthes* Sw. (Papilionoideae, Leguminosae). *Revista Brasileira de Botanica*, v. 48, n. 1, 2025.

Hakim, S.; Mirza, B. S.; Imran, A.; Zaheer, A.; Yasmin, S.; Mubeen, F.; Mclean, J. E.; Mirza, M. S. Illumina sequencing of 16S rRNA tag shows disparity in rhizobial and non-rhizobial diversity associated with root nodules of mung bean (*Vigna radiata* L.) growing in different habitats in Pakistan. *Microbiological Research*, v. 231, n. October 2019, 2020.

Hassen, A. I.; Bopape, F. L.; Vuuren, A. Van; Gerrano, A. S.; Morey, L. Symbiotic interaction of bambara groundnut (*Vigna subterranea*) landraces with rhizobia spp. from other legume hosts reveals promiscuous nodulation. *South African Journal of Botany*, v. 160, p. 493–503, 2023.

Hernández-Oaxaca, D.; Claro-Mendoza, K. L.; Rogel, M. A.; Rosenblueth, M.; Velasco-Trejo, J. A.; Alarcón-Gutiérrez, E.; García-Pérez, J. A.; Martínez-Romero, J.; James, E. K.; Martínez-Romero, E. Genomic Diversity of *Bradyrhizobium* from the Tree Legumes Inga and Lysiloma (Caesalpinioideae-Mimosoid Clade). *Diversity*, v. 14, n. 7, p. 1–19, 2022.

Huang, J.; Xue, Y.; Liu, P.; Liu, G.; Zhu, S.; Chen, Z. Characterization of phosphate transporter

- genes and the function of SgPT1 involved in phosphate uptake in *Stylosanthes guianensis*. ***Plant Physiology and Biochemistry***, v. 194, n. October 2022, p. 731–741, 2023.
- Jinhui; Wu, Y.; Huang, R.; Xu, R.; Zhang, J.; Liu, Y.; Luo, L.; Liu, G.; Liu, P. Combined Analysis of the Leaf Metabolome, Lipidome, and Candidate Gene Function: Insights into Genotypic Variation in Phosphorus Utilization Efficiency in *Stylosanthes guianensis*. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, 2025.
- Kajić, S.; Živković, L.; Lazerević, B.; Borovec, P.; Novak, A.; Mutaliyeva, B.; Turebayeva, T.; Madybekova, G.; Vinceković, M. Effects of co-inoculation with *Bradyrhizobium* and *Trichoderma harzianum* on soybean nitrogen nutrition and multispectral traits. ***Environmental Technology and Innovation***, v. 39, 2025.
- Lane, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. ***Nucleic acid techniques in bacterial systematic***, [s. l.], p. 115-175., 1991.
- Leite, R. De A.; Martins, L. C.; Ferreira, L. V. Dos S. F.; Barbosa, E. S.; Alves, B. J. R.; Zilli, J. E.; Araújo, A. P.; Jesus, E. Da C. Co-inoculation of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* promotes growth and yield of common beans. ***Applied Soil Ecology***, v. 172, n. March 2021, 2022.
- Li, Y.; Liu, G.; Han, K.; Sun, L.; Gao, K.; Liu, W.; Wang, E. T.; Chen, W. Distribution and biodiversity of rhizobia nodulating *Chamaecrista mimosoides* in the Shandong peninsula of china. ***Systematic and Applied Microbiology***, v. 45, n. 1, 2022.
- Liu, Y.; Kong, D.; Yang, H.; Douchamps, S.; Atieno, M.; Xu, B.; Wang, W.; Liu, G. A Transcriptomic Analysis of Stylo [*Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw.] Provides Novel Insights Into the Basis of Salinity Tolerance. ***Frontiers in Sustainable Food Systems***, v. 6, n. March, p. 1–18, 2022.
- Mao, K.; Franco, M.; Xu, Y.; Chai, H.; Wang, J.; Huang, S.; Wang, Z.; Xun, W.; Liang, Z.; Yu, Z.; Wang, M. Fermentation Parameters, Amino Acids Profile, Biogenic Amines Formation, and Bacterial Community of Ensiled Stylo Treated with Formic Acid or Sugar. ***Animals***, v. 14, n. 16, 2024.
- Malavolta, Eurípedes. ***Avaliação Do Estado Nutricional de Plantas Principios e Aplicações***. 2a Ediçãoed. [S. l.: s. n.], 1977.
- Marques, R. Z.; Rodrigues, L. P.; Kaschuk, G.; Moreira Brito, J. C.; Gomes, M. P. Protecting soybean yields from enrofloxacin toxicity: The role of *Bradyrhizobium japonicum*

- inoculation. *Rhizosphere*, v. 28, n. July, 2023.
- Miao, Y.; Hu, X.; Wang, L.; Schultze-Kraft, R.; Wang, W.; Chen, Z. Characterization of SgALMT genes reveals the function of SgALMT2 in conferring aluminum tolerance in *Stylosanthes guianensis* through the mediation of malate exudation. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 208, n. January, p. 108535, 2024.
- Miljakovi, D.; Marinkovi, J.; Tamindžić, G.; Đorđević, V.; Tintor, B.; Milošević, D.; Ignjatov, M.; Nikolić, Z. Bio-Priming of Soybean with *Bradyrhizobium japonicum* and *Bacillus megaterium* : Strategy to Improve Seed Germination. *Plants*, v. 11, 2022.
- Missbah El Idrissi, M.; Bouhnik, O.; Elfaik, S.; Alami, S.; Lamin, H.; Bedmar, E. J.; Abdelmoumen, H. Characterization of *Bradyrhizobium* spp. Nodulating *Lupinus cosentinii* and *L. luteus* Microsymbionts in Morocco. *Frontiers in Agronomy*, v. 3, n. May, p. 1–12, 2021.
- Moond, V.; Panotra, N.; P., A.; Saikanth, D. R. K.; Singh, G.; Prabhavathi, N.; VERMA, B. Strategies and Technologies in Weed Management: A Comprehensive Review. *Current Journal of Applied Science and Technology*, v. 42, n. 29, p. 20–29, 2023.
- Pitumpe Arachchige, P. S.; Rosso, L. H. M.; Hansel, F. D.; Ramundo, B.; Torres, A. R.; Asebedo, R.; Ciampitti, I. A.; Jagadish, S. V. K. Temporal biological nitrogen fixation pattern in soybean inoculated with *Bradyrhizobium*. *Agrosystems, Geosciences and Environment*, v. 3, n. 1, p. 1–10, 2020.
- Queipo-Ortun, M. I.; Colmenero, J. D. D.; Macias, M.; Bravo, M. J.; Morata, P. Preparation of Bacterial DNA Template by Boiling and Effect of Immunoglobulin G as an Inhibitor in Real-Time PCR for Serum Samples from Patients with Brucellosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 15, n. 2, p. 293–296, 2008.
- Renganathan, P.; Astorga-Eló, M.; Gaysina, L. A.; Omar, E.; Puente, R.; Sainz-Hernández, J. C. Nitrogen Fixation by Diazotrophs: A Sustainable Alternative to Synthetic Fertilizers in Hydroponic Cultivation. *Sustainability*. p. 1–28, 2025.
- Riviezzi, B.; Cagide, C.; Pereira, A.; Herrmann, C.; Lombide, R.; Lage, M.; Sicardi, I.; Lage, P.; Castro-Sowinski, S.; Morel, M. A. Improved nodulation and seed yield of soybean (*Glycine max*) with a new isoflavone-based inoculant of *Bradyrhizobium elkanii*. *Rhizosphere*, v. 15, n. March, 2020.
- Shumilina, J.; Soboleva, A.; Abakumov, E.; Shtark, O. Y.; Zhukov, V. A.; Frolov, A. Signaling

- in Legume Rhizobia Symbiosis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 24, 2023.
- Souza, J. M. De *et al.* Two viruses from *Stylosanthes guianensis* may represent a new genus within Potyviridae. *Virus Research*, v. 293, n. November 2020, 2021.
- Sobral *et al.*, Guia prático para interpretação de resultados de análises de solo, 2015; SiBCS, 2018; Prezotti & Guarçoni, *Guia de interpretação de análise de solo e foliar*, 2013.
- Terra, L. A.; Klepa, M. S.; Nogueira, M. A.; Hungria, M. Pangenome analysis indicates evolutionary origins and genetic diversity: emphasis on the role of nodulation in symbiotic *Bradyrhizobium*. *Frontiers in Plant Science*, v. 16, n. April, p. 1–12, 2025.
- Wang, C. C. *et al.* Over-expression of SgRVE1 from fine-stem stylo (*Stylosanthes guianensis* var. *intermedia*) up-regulates CBF gene expression and enhances cold tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 158, n. 2, p. 1–13, 2024.
- Wang, J.; Qin, H.; Zhang, L.; Tang, Y.; Long, J.; Xu, H.; Zhu, B. Synergistic effects of rhizosphere effect and combined organic and chemical fertilizers application on soil bacterial diversity and community structure in oilseed rape cultivation. *Frontiers in Microbiology*, v. 15, n. March, p. 1–11, 2024.
- Wang, L.; Li, J.; Liu, L.; Dong, R.; Liu, G.; Rao, I. M.; Chen, Z. Phenylalanine ammonia-lyase 2 regulates secondary metabolism and confers manganese tolerance in *Stylosanthes guianensis*. *Plant Physiology*, v. 197, n. 1, p. 1–18, 2025.
- Wei, W. *et al.* Long-term fertilization coupled with rhizobium inoculation promotes soybean yield and alters soil bacterial community composition. *Frontiers in Microbiology*, v. 14, n. May, 2023.

Aspectos Gerais da Produção Científica

Dentre os aspectos gerais da produção científica desse trabalho, o capítulo II reúne publicações do ano de 2019 à 2024 acerca da Fixação Biológica de Nitrogênio em Fabaceae. Neste manuscrito, estão descritos microrganismos do gênero *Bradyrhizobium* que foram isolados, inoculados ou co-inoculados com espécies de leguminosas, além disso estão descritos mecanismos da fixação do nitrogênio, os benefícios, desafios e avanços recentes associados à inoculação.

O capítulo III, consta a manuscrito experimental de inoculação de *Stylosanthes guianenses* com *Bradyrhizobium japonicum*, que teve por objetivo avaliar se a associação influenciaria o estabelecimento da cultivar em Latossolo-Amarelo distrófico da Chapada do Araripe, além disso o trabalho buscou compreender o potencial de tecnologias sustentáveis para a redução de dependência de fertilizantes sintéticos, favorecendo a sustentabilidade agrícola e a regeneração de áreas degradadas.

Os resultados do experimento evidenciaram que, nas condições avaliadas, a inoculação com *Bradyrhizobium japonicum* não apresentou efeitos estatisticamente significativos nos parâmetros de crescimento da cultivar *Stylosanthes guianensis*, tais como densidade populacional, altura de plantas, cobertura verde do dossel e teores foliares de clorofila. Apesar de estudos prévios demonstrarem benefícios do gênero *Bradyrhizobium* em outras leguminosas, os achados deste estudo sugerem que a eficácia da inoculação pode depender da compatibilidade entre genótipo vegetal e microrganismo, das características químicas do solo e das estratégias de manejo adotadas. Fatores como acidez elevada, baixa saturação por bases e baixa fertilidade do solo, aliados a períodos de déficit hídrico e chuvas irregulares durante o estabelecimento da cultura, podem ter limitado a eficiência da simbiose

A análise geral, portanto, sugere que a baixa resposta da cultura ao manejo biológico pode estar relacionada não apenas às condições adversas do solo e clima, mas também a fatores genéticos da cultivar e à interação específica com a estirpe bacteriana utilizada. Assim, a eficácia dos inoculantes continua a representar um desafio no campo, frequentemente dependente da complexidade das interações bióticas e abióticas, o que corrobora a necessidade de novos estudos locais para validação dessa metodologia.

Conclusões Gerais

Os resultados experimentais em campo indicaram que, nas condições edafoclimáticas da Chapada do Araripe, a inoculação com *Bradyrhizobium japonicum* em *Stylosanthes guianensis*, isoladamente ou associada à adubação mineral e orgânica, não resultou em benefícios estatisticamente significativos sobre os parâmetros de crescimento avaliados. Embora a literatura aponte a alta eficiência simbiótica do gênero *Bradyrhizobium*, a expressão desse potencial depende de múltiplos fatores, incluindo a interação entre genótipo da planta, condições ambientais e o manejo agrícola adotado.

Perspectivas De Investigações Futuras

Como continuidade deste estudo, os isolados bacterianos obtidos após o crescimento das colônias e de processos de purificação por meio de repicagens sucessivas em meios de cultivo específicos. As cepas isoladas serão identificadas molecularmente por meio do sequenciamento de DNA utilizando a metodologia de Sanger. As sequências obtidas serão alinhadas e comparadas com o banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), possibilitando a caracterização taxonômica e molecular das espécies microbianas presentes nas amostras, além da avaliação de seu potencial biotecnológico, especialmente para aplicações em bioinoculação e na promoção da fixação biológica de nitrogênio (FBN).

Adicionalmente, a análise do DNA genômico total presente nas amostras de solo será realizada por meio de extração utilizando kits comerciais como o *DNeasy PowerSoil* (Qiagen®). A qualidade e integridade do DNA extraído serão verificadas por meio das razões de absorvância (260/280 e 260/230), mensuração da concentração pelo equipamento *Biotek Cytation™ 5*, bem como por eletroforese em gel de agarose.

Com base nesse material genético, serão conduzidas análises de sequenciamento metagenômico visando investigar a diversidade microbiana total, incluindo bactérias, fungos e arqueas. A amplificação da região V4 do gene 16S rRNA será realizada para análise das comunidades bacterianas e arqueanas, enquanto a região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) será amplificada para caracterização da comunidade fúngica, conforme protocolo descrito por Coelho *et al.* (2019). Os dados gerados serão comparados com bancos de dados de referência, como o NCBI, possibilitando uma compreensão mais ampla da composição e função da microbiota do solo associada aos tratamentos aplicados.

-
- Alghamdi, A. G.; Majrashi, M. A.; Ibrahim, H. M. Improving the Physical Properties and Water Retention of Sandy Soils by the Synergistic Utilization of Natural Clay Deposits and Wheat Straw. *Sustainability (Switzerland)*, v. 16, n.3, 2024.
- Amorim, M. R. *et al.* Cowpea nodules host a similar bacterial community regardless of soil properties. *Applied Soil Ecology*, v. 172, n. 172, 2022.
- Armendariz, A. L.; Talano, M. A.; Olmos Nicotra, M. F.; Escudero, L.; Breser, M. L.; Porporatto, C.; Agostini, E. Impact of double inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* E109 and *Azospirillum brasilense* Az39 on soybean plants grown under arsenic stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 138, p. 26–35, 2019.
- Berza Beyene, B.; Pagano, M. C.; Vaiyapuri R, P.; Assefa Tuji, F. Microbial consortia inoculation of woody legume *Erythrina brucei* increases nodulation and shoot nitrogen and phosphorus under greenhouse conditions. *Biotechnology Reports*, v. 33, 2022.
- Beukes, C. W.; Stepkowski, T.; Venter, S. N.; Cłapa, T.; Phalane, F. L.; Roux, M. M. Le; Steenkamp, E. T. Crotalariaeae and Genisteeae of the South African Great Escarpment are nodulated by novel *Bradyrhizobium* species with unique and diverse symbiotic loci. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 100, p. 206–218, 2016.
- Bouremani, N.; Cherif-Silini, H.; Silini, A.; El, N.; Rabhi, H.; Chenari, A. Osmotolerant plant growth promoting bacteria mitigate adverse effects of drought stress on wheat growth. *Microbiology*, v. 10, n.2, p. 507–541, 2024.
- Buisset, E.; Soust, M.; Scott, P. T. The Isolation of Free-Living Nitrogen-Fixing Bacteria and the Assessment of Their Potential to Enhance Plant Growth in Combination with a Commercial Biostimulant. *Microbial Research*, v. 16, n 3,2025.
- Canellas, L. P.; Olivares, F. L.; Canellas, N. O. A.; Jindo, K.; Rosa, R. C. C.; Piccolo, A. Challenge of transition: the history of a case study involving tropical fruits polyculture stimulated by humic acids and plant-growth promoting bacteria. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, v. 9, n. 1, p. 1–18, 2022.
- Chen, W. F.; Wang, E. T.; Ji, Z. J.; Zhang, J. J. Recent development and new insight of diversification and symbiosis specificity of legume rhizobia: mechanism and application. *Journal of Applied Microbiology*, v. 131, n. 2, p. 553–563, 2021.

- Chen, Z.; Song, J.; Li, X.; Arango, J.; Cardoso, J. A.; Rao, I.; Schultze-Kraft, R.; Peters, M.; Mo, X.; Liu, G. Physiological responses and transcriptomic changes reveal the mechanisms underlying adaptation of *Stylosanthes guianensis* to phosphorus deficiency. ***BMC Plant Biology***, v. 21, n. 1, p. 1–15, 2021.
- Cho, A.; Joshi, A.; Hur, H. G.; Lee, J. H. Nodulation Experiment by Cross-Inoculation of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Root Nodules of Several Leguminous Plants. ***Journal of Microbiology and Biotechnology***, v. 34, n. 3, p. 570–579, 2024.
- Das, D. R.; Horváth, B.; Kundu, A.; Kaló, P.; Dasgupta, M. Functional conservation of CYCLOPS in crack entry legume *Arachis hypogaea*. ***Plant Science***, v. 281, n. September 2018, p. 232–241, 2019.
- Delamuta, J. R. M.; Ribeiro, R. A.; Araújo, J. L. S.; Rouws, L. F. M.; Zilli, J. É.; Parma, M. M.; Melo, I. S.; Hungria, M. *Bradyrhizobium stylosanthis* sp. nov., comprising nitrogen-fixing symbionts isolated from nodules of the tropical forage legume *Stylosanthes* spp. ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology***, v. 66, n. 8, p. 3078–3087, 2016.
- Dong, R.; Zhang, J.; Huan, H.; Bai, C.; Chen, Z.; Liu, G. 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, 2017.
- Dong, W.; Song, Y. The significance of flavonoids in the process of biological nitrogen fixation. ***International Journal of Molecular Sciences***, v. 21, n. 16, p. 1–18, 2020.
- El-Sherbeny, T. M. S.; Mousa, A. M.; Zhran, M. A. Response of peanut (*Arachis hypogaea* L.) plant to bio-fertilizer and plant residues in sandy soil. ***Environmental Geochemistry and Health***, v. 45, n. 2, p. 253–265, 2023.
- Florencio, C.; Bortoletto-Santos, R. C. P. F.; Brondia, M. G.; Velloso, C. C. V.; Klaica, R.; Ribeiro, C.; Farinasa, C. S.; Mattoso, L. H. C. Revisão. ***Quim. Nova***, v. 45, n. 9, p. 1133–1145, 2022.
- Galindo, F. S. *et al.* Nitrogen recovery from fertilizer and use efficiency response to *Bradyrhizobium* sp. and *Azospirillum brasilense* combined with N rates in cowpea-wheat crop sequence. ***Applied Soil Ecology***, v. 157, n. May 2020, 2021.
- Galindo, F. S.; Pagliari, P. H.; Cabral, E.; Silva, V. M.; Fernandes, G. C.; Rodrigues, W. L.; Garcia, E.; Oliveira, C.; Lima, B. H. De. and Did Not Change N-Fertilizer Recovery. ***Plants***,

2022.

- Gissi, D. S.; Torke, B. M.; Simon, M. F.; Tomazello-Filho, M.; Fortuna-Perez, A. P. Morphological analyses support taxonomic updates in Brazilian species of *Stylosanthes* Sw. (Papilionoideae, Leguminosae). *Revista Brasileira de Botanica*, v. 48, n. 1, 2025.
- Hakim, S.; Mirza, B. S.; Imran, A.; Zaheer, A.; Yasmin, S.; Mubeen, F.; Mclean, J. E.; Mirza, M. S. Illumina sequencing of 16S rRNA tag shows disparity in rhizobial and non-rhizobial diversity associated with root nodules of mung bean (*Vigna radiata* L.) growing in different habitats in Pakistan. *Microbiological Research*, v. 231, n. October 2019, 2020.
- Hassen, A. I.; Bopape, F. L.; Vuuren, A. Van; Gerrano, A. S.; Morey, L. Symbiotic interaction of bambara groundnut (*Vigna subterranea*) landraces with rhizobia spp. from other legume hosts reveals promiscuous nodulation. *South African Journal of Botany*, v. 160, p. 493–503, 2023.
- Hernández-Oaxaca, D.; Claro-Mendoza, K. L.; Rogel, M. A.; Rosenblueth, M.; Velasco-Trejo, J. A.; Alarcón-Gutiérrez, E.; García-Pérez, J. A.; Martínez-Romero, J.; James, E. K.; Martínez-Romero, E. Genomic Diversity of *Bradyrhizobium* from the Tree Legumes Inga and Lysiloma (Caesalpinioideae-Mimosoid Clade). *Diversity*, v. 14, n. 7, p. 1–19, 2022.
- Huang, J.; Xue, Y.; Liu, P.; Liu, G.; Zhu, S.; Chen, Z. Characterization of phosphate transporter genes and the function of SgPT1 involved in phosphate uptake in *Stylosanthes guianensis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 194, n. October 2022, p. 731–741, 2023.
- Jinhui; Wu, Y.; Huang, R.; Xu, R.; Zhang, J.; Liu, Y.; Luo, L.; Liu, G.; Liu, P. Combined Analysis of the Leaf Metabolome, Lipidome, and Candidate Gene Function: Insights into Genotypic Variation in Phosphorus Utilization Efficiency in *Stylosanthes guianensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2025.
- Kajić, S.; Živković, L.; Lazarević, B.; Borovec, P.; Novak, A.; Mutaliyeva, B.; Turebayeva, T.; Madybekova, G.; Vinceković, M. Effects of co-inoculation with *Bradyrhizobium* and *Trichoderma harzianum* on soybean nitrogen nutrition and multispectral traits. *Environmental Technology and Innovation*, v. 39, 2025.
- Leite, R. De A.; Martins, L. C.; Ferreira, L. V. Dos S. F.; Barbosa, E. S.; Alves, B. J. R.; Zilli, J. E.; Araújo, A. P.; Jesus, E. Da C. Co-inoculation of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* promotes growth and yield of common beans. *Applied Soil Ecology*, v. 172, n. March 2021, 2022.

- Li, Y.; Liu, G.; Han, K.; Sun, L.; Gao, K.; Liu, W.; Wang, E. T.; Chen, W. Distribution and biodiversity of rhizobia nodulating *Chamaecrista mimosoides* in the Shandong peninsula of china. *Systematic And Applied Microbiology*, V. 45, N. 1, 2022.
- Liu, Y.; Kong, D.; Yang, H.; Douxchamps, S.; Atieno, M.; Xu, B.; Wang, W.; Liu, G. A Transcriptomic Analysis of Stylo [*Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw.] Provides Novel Insights Into the Basis of Salinity Tolerance. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, v. 6, n. March, p. 1–18, 2022.
- Mao, K.; Franco, M.; Xu, Y.; Chai, H.; Wang, J.; Huang, S.; Wang, Z.; Xun, W.; Liang, Z.; Yu, Z.; Wang, M. Fermentation Parameters, Amino Acids Profile, Biogenic Amines Formation, and Bacterial Community of Ensiled Stylo Treated with Formic Acid or Sugar. *Animals*, v. 14, n. 16, 2024.
- Marques, R. Z.; Rodrigues, L. P.; Kaschuk, G.; Moreira Brito, J. C.; Gomes, M. P. Protecting soybean yields from enrofloxacin toxicity: The role of *Bradyrhizobium japonicum* inoculation. *Rhizosphere*, v. 28, n. July, 2023.
- Miao, Y.; Hu, X.; Wang, L.; Schultze-Kraft, R.; Wang, W.; Chen, Z. Characterization of SgALMT genes reveals the function of SgALMT2 in conferring aluminum tolerance in *Stylosanthes guianensis* through the mediation of malate exudation. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 208, n. January, p. 108535, 2024.
- Miljakovi, D.; Marinkovi, J.; Tamindžić, G.; Đorđević, V.; Tintor, B.; Milošević, D.; Ignjatov, M.; Nikolić, Z. Bio-Priming of Soybean with *Bradyrhizobium japonicum* and *Bacillus megaterium* : Strategy to Improve Seed Germination. *Plants*, v. 11, 2022.
- Missbah El Idrissi, M.; Bouhnik, O.; Elfaik, S.; Alami, S.; Lamin, H.; Bedmar, E. J.; Abdelmoumen, H. Characterization of *Bradyrhizobium* spp. Nodulating *Lupinus cosentinii* and *L. luteus* Microsymbionts in Morocco. *Frontiers in Agronomy*, v. 3, n. May, p. 1–12, 2021.
- Moond, V.; Panotra, N.; P., A.; Saikanth, D. R. K.; Singh, G.; Prabhavathi, N.; Verma, B. Strategies and Technologies in Weed Management: A Comprehensive Review. *Current Journal of Applied Science and Technology*, v. 42, n. 29, p. 20–29, 2023.
- Pitumpe Arachchige, P. S.; Rosso, L. H. M.; Hansel, F. D.; Ramundo, B.; Torres, A. R.; Asebedo, R.; Ciampitti, I. A.; Jagadish, S. V. K. Temporal biological nitrogen fixation pattern in soybean inoculated with *Bradyrhizobium*. *Agrosystems, Geosciences and Environment*, v. 3, n. 1, p. 1–10, 2020.

- Queipo-Ortun, M. I.; Colmenero, J. D. D.; Macias, M.; Bravo, M. J.; Morata, P. Preparation of Bacterial DNA Template by Boiling and Effect of Immunoglobulin G as an Inhibitor in Real-Time PCR for Serum Samples from Patients with Brucellosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 15, n. 2, p. 293–296, 2008.
- Renganathan, P.; Astorga-Eló, M.; Gaysina, L. A.; Omar, E.; Puente, R.; Sainz-Hernández, J. C. Nitrogen Fixation by Diazotrophs : A Sustainable Alternative to Synthetic Fertilizers in Hydroponic Cultivation. *Sustainability*, v. 17, p. 1–28, 2025.
- Riviezzi, B.; Cagide, C.; Pereira, A.; Herrmann, C.; Lombide, R.; Lage, M.; Sicardi, I.; Lage, P.; Castro-Sowinski, S.; Morel, M. A. Improved nodulation and seed yield of soybean (*Glycine max*) with a new isoflavone-based inoculant of *Bradyrhizobium elkanii*. *Rhizosphere*, v. 15, n. March, 2020.
- Shumilina, J.; Soboleva, A.; Abakumov, E.; Shtark, O. Y.; Zhukov, V. A.; Frolov, A. Signaling in Legume – Rhizobia Symbiosis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 24, 2023.
- Souza, J. M. De *et al.* Two viruses from *Stylosanthes guianensis* may represent a new genus within Potyviridae. *Virus Research*, v. 293, n. November 2020, 2021.
- Terra, L. A.; Klepa, M. S.; Nogueira, M. A.; Hungria, M. Pangenome analysis indicates evolutionary origins and genetic diversity: emphasis on the role of nodulation in symbiotic *Bradyrhizobium*. *Frontiers in Plant Science*, v. 16, n. April, p. 1–12, 2025.
- Wang, C. C. *et al.* Over-expression of SgRVE1 from fine-stem stylo (*Stylosanthes guianensis* var. *intermedia*) up-regulates CBF gene expression and enhances cold tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 158, n. 2, p. 1–13, 2024.
- Wang, J.; Qin, H.; Zhang, L.; Tang, Y.; Long, J.; Xu, H.; Zhu, B. Synergistic effects of rhizosphere effect and combined organic and chemical fertilizers application on soil bacterial diversity and community structure in oilseed rape cultivation. *Frontiers in Microbiology*, v. 15, n. March, p. 1–11, 2024.
- Wang, L.; Li, J.; Liu, L.; Dong, R.; Liu, G.; Rao, I. M.; Chen, Z. Phenylalanine ammonia-lyase 2 regulates secondary metabolism and confers manganese tolerance in *Stylosanthes guianensis*. *Plant Physiology*, v. 197, n. 1, p. 1–18, 2025.
- Wei, W. *et al.* Long-term fertilization coupled with rhizobium inoculation promotes soybean yield and alters soil bacterial community composition. *Frontiers in Microbiology*, v. 14, n.

May, 2023.

- Udeh, E. L., Ngmenzuma, T. Y., Maseko, S. T., Nyila, M. A., Kanu, S. A., & Mohale, K. C. (2023). Gas exchange and carbon assimilation of *Bambara groundnut* landraces co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* and *Bacillus subtilis* under simulated drought stress. *Scientific African*, 21(February), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2023.e01823>
- Florencio, C.; Bortoletto-Santos, R. C. P. F.; Brondia, M. G.; Velloso, C. C. V.; Klaica, R.; Ribeiro, C.; Farinasa, C. S.; Mattoso, L. H. C. Revisão. *Quim. Nova*, v. 45, n. 9, p. 1133–1145, 2022.
- Kubar, M. S.; Wang, C.; Noor, R. S.; Feng, M.; Yang, W.; Kubar, K. A.; Soomro, K.; Yang, C.; Sun, H.; Mohamed, H.; Mosa, W. F. A. Nitrogen fertilizer application rates and ratios promote the biochemical and physiological attributes of winter wheat. *Frontiers in Plant Science*, v. 13, n. November, p. 1–14, 2022.
- Lu, L.; Zhang, Y.; Li, L.; Yi, N.; Liu, Y.; Qaseem, M. F.; Li, H.; Wu, A. M. Physiological and Transcriptomic Responses to Nitrogen Deficiency in *Neolamarckia cadamba*. *Frontiers in Plant Science*, v. 12, n. November, p. 1–17, 2021.
- Singh, M.; Jha, S.; Pathak, D.; Maisnam, G. Advancing biofertilizers : the evolution from single-strain formulations to synthetic microbial communities (SynCom) for sustainable agriculture. *Jornal of Applied Microbiology*, 2025.
- Wang, Q.; Li, S.; Li, J.; Huang, D. The Utilization and Roles of Nitrogen in Plants. *Forests*, v. 15, n. 7, 2024.

ANEXO 1:

Estimativa das Unidades Formadoras de Colônia - UFC g⁻¹

Para a prospecção bacteriana, a amostragem do solo foi realizada na camada de 0-20 cm de profundidade na região da rizosfera da planta, utilizando trado do tipo holandês previamente esterilizado entre cada coleta para evitar contaminações cruzadas. A coleta de material biológico foi conduzida mediante autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), sob o número 99319-1, concedida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio).

As amostras de solo destinadas ao isolamento e cultivo de microrganismos foram mantidas sob refrigeração a 5 °C e processadas após a coleta, a fim de preservar a viabilidade microbiana. As amostras destinadas à extração de DNA foram acondicionadas em frascos estéreis, mantidas sob refrigeração em campo e posteriormente armazenadas a -20 °C, com o objetivo de preservar a integridade do material genético microbiano até a realização das análises moleculares.

Amostras compostas de solo rizosférico de *Stylosanthes guianensis* foram coletadas na zona central dos sulcos de plantio, adotando critérios para evitar bordaduras e minimizar a variabilidade espacial. As amostras foram acondicionadas em tubos estéreis (Falcon, 50 mL) e transportadas sob refrigeração (5 °C) até o processamento laboratorial. A metodologia utilizada para semeio e isolamento de colônias seguiu a metodologia de Coelho (2025) com adaptações. Para a obtenção da suspensão bacteriana, alíquotas de 1,0 g de solo foram transferidas para tubos Falcon de 15 mL contendo 9,0 mL de solução salina estéril (NaCl 0,9% p/v) e homogeneizadas por agitação em vórtex por 1 minuto, constituindo a diluição 10⁻¹. Em seguida, foram realizadas diluições decimais seriadas (10⁻² e 10⁻³) pela transferência de 100 µL da diluição anterior para 900 µL de solução salina estéril, em microtubos de 2,0 mL, assegurando condições assépticas.

O isolamento bacteriano foi conduzido por semeadura em profundidade (*pour plate*), utilizando-se 100 µL da diluição 10⁻³, em triplicata, para cada meio de cultura. Empregaram-se dois meios: *Tryptic Soy Agar*® (TSA), meio nutriente não seletivo destinado ao crescimento de bactérias heterotróficas cultiváveis, e *Rhizobium Medium*® (HiMedia®, Ref. M408), meio semisseletivo para a recuperação de bactérias do grupo rizobial, especialmente *Bradyrhizobium*

spp. Para controle fúngico, 1.250 µL de nistatina (equivalente a 125.000 UI), foram adicionados aos respectivos meios de cultura. Os meios de cultura permanecerem em temperatura constante de 55° em banho maria até o seu uso. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 28 °C por um período de 24 h para o meio TSA e 120 h para meio *Rizobium*®, sob condições aeróbias estáticas. Ao final do período de incubação, as unidades formadoras de colônias (UFC) foram contabilizadas utilizando-se um contador de colônias digital (X-analyzer).

O isolamento dos nódulos seguiu o protocolo descrito por Dioníseo *et al.* (2016). Para a coleta, foi demarcada uma área circular ao redor das plantas de *Stylosanthes*, correspondente à zona de abrangência do sistema radicular, até a profundidade aproximada de 30 cm. A escavação foi realizada cuidadosamente, a fim de evitar danos às raízes e aos nódulos da leguminosa. As raízes coletadas foram acondicionadas em sacos plásticos tipo Ziplock e transportadas ao laboratório para processamento. No laboratório, os nódulos foram separados manualmente das raízes. Devido ao pequeno tamanho dos nódulos de *Stylosanthes*, estes foram cuidadosamente destacados e acondicionados em microtubos do tipo Eppendorf®. Em seguida, os nódulos foram submetidos à dessecação em câmara de fluxo laminar e posteriormente reidratados com água destilada estéril por 40 minutos.

Após a reidratação, os nódulos foram imersos em solução de etanol a 95% por 10 minutos, com o objetivo de reduzir a tensão superficial e eliminar bolhas presentes nos tecidos. Em seguida, foram transferidos para uma solução de hipoclorito de sódio a 5,0% para a desinfecção superficial. Após esse tratamento, os nódulos foram lavados com água destilada estéril. Após a última lavagem, os nódulos foram macerados com auxílio de bastão de vidro, utilizando a água da última lavagem como meio de suspensão. A partir dessa suspensão, alíquotas de 100 µL foram inoculadas em placas de Petri contendo meio *Rizobium* Medium®, utilizando a técnica de semeadura em profundidade (*pour plate*). As placas foram incubadas a 28 °C por 72 horas.

Após o período de incubação, procedeu-se à contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) no equipamento X-analyzer. Em seguida, colônias representativas foram repicadas das placas-mãe para novas placas contendo o mesmo meio de cultivo, utilizando a técnica de estrias por esgotamento, e incubadas novamente a 28 °C por 72 horas. Para o controle do crescimento fúngico, foi adicionada nistatina ao meio de cultivo, na proporção de 1.250 µL, correspondente a 125.000 UI.

Isolamento e armazenamento

Para o isolamento de bactérias a partir das amostras de solo, foi utilizada a técnica de esgotamento por estrias sucessivas em meios seletivos e não seletivos, foram obtidos 48 isolados bacterianos em meio TSA (*Tryptic Soy Agar*) e 65 isolados em meio *Rhizobium* Medium®, a partir dos nódulos cultivados em meio *Rhizobium* Medium® obtiveram-se 47 amostras isoladas. Com base nas características morfoculturais como forma, elevação, margem, coloração e opacidade. As colônias selecionadas foram repicadas em placas de Petri contendo TSA e *Rhizobium* Medium®, utilizando a técnica de estrias cruzadas, para obter cultivos axênicos. As placas foram incubadas a 28 °C por 24 horas (TSA), 72 e 120 horas (*Rhizobium* Medium®), em condições aeróbias.

As colônias purificadas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 6 mL de meio líquido BHI (*Brain Heart Infusion*) e incubadas a 28 °C sob agitação orbital a 120 rpm, até atingirem a fase exponencial de crescimento, fase ideal para posterior extração de DNA genômico. Para a preservação das culturas puras, foi preparada uma solução crioprotetora composta por 1.600 µL da suspensão bacteriana e 400 µL de glicerol estéril a 10% (v/v). Cada isolado foi preservado em triplicata, totalizando 2 mL por unidade, acondicionados em criotubos estéreis e armazenados a -20 °C até sua utilização em análises moleculares, como a extração de DNA.

A avaliação do potencial diazotrófico dos isolados foi realizada por meio do cultivo em meios semissólidos com ausência de nitrogênio LGI (*Lacto-Gluconate Infusion medium*) e NFB (*Nitrogen-Free Bromothymol blue medium*), cuja objetivo metodológico baseia-se na seleção fisiológica de microrganismos capazes de utilizar o nitrogênio atmosférico (N₂) como única fonte de nitrogênio assimilável. Na ausência de fontes combinadas de N no meio de cultura, o crescimento bacteriano depende exclusivamente da atividade do complexo enzimático nitrogenase, responsável pela redução biológica do N₂ a amônia. As culturas puras que indicaram ser possíveis fixadores de nitrogênio apresentaram um halo na parte superior dos respectivos meios semissólidos. Os dados de isolamento das culturas cultivadas em meio TSA e Rizóbio Medium estão representadas no Anexo 4.

Extração, Purificação e Quantificação de DNA

Após as culturas puras terem sido isoladas e avaliadas quanto ao seu potencial diazotrófico, foi realizada a extração do DNA. A obtenção do DNA genômico foi realizada por

lise térmica. (Queipo-ortun *et al.*, 2008). Culturas bacterianas puras, previamente armazenadas, foram descongeladas a 4 °C e submetidas à centrifugação a 15.000 × g por 10 min para concentração celular. Após descarte do sobrenadante, o sedimento celular foi lavado com 500 µL de água deionizada, seguido de nova centrifugação a 15.000 × g por 5 min. O pellet final foi ressuspenso em 100 µL de água ultrapura estéril e homogeneizado em agitador tipo vórtex.

A ruptura celular foi realizada por choque térmico, com incubação das amostras em banho-maria a 100 °C por 10 min, seguida de resfriamento imediato em gelo por temperatura aproximada de 10 min, visando à desnaturação de proteínas e liberação do material genômico. A separação entre o DNA solúvel e os detritos celulares foi realizada por centrifugação a 15.000 × g por 2 min, sendo o sobrenadante, contendo o DNA genômico bruto, cuidadosamente transferido para microtubos estéreis e armazenado a -20 °C até o uso. A quantificação e avaliação da integridade e pureza do DNA foram conduzidas por leitura espectrofotométrica utilizando o leitor multimodal de microplacas Agilent BioTek Cytation™ 5, com aquisição e análise dos dados pelo software Gen5™. Foram determinadas a concentração de DNA (ng µL⁻¹) e as razões de absorvância 260/280, utilizada para inferência da contaminação por proteínas (valores ideais ~1,8 para DNA e ~2,0 para RNA), e 260/230, utilizada como indicador complementar de pureza de ácidos nucleicos, com valores esperados entre 2,0 e 2,2.

Amplificação de DNA por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O protocolo para extração do DNA genômico seguiu conforme Lane (1991). O DNA genômico obtido foi submetido à amplificação do gene ribossomal 16S rRNA por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional, empregando os primers universais 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R, os quais amplificam aproximadamente 1.500 pb da região conservada do gene 16S rRNA. As reações foram conduzidas em termociclador MyCycler™ (Bio-Rad), sob condições controladas de ciclagem térmica para desnaturação do DNA molde, hibridização dos primers e extensão enzimática. Cada reação de PCR foi realizada em volume final de 25 µL, contendo 12,5 µL de PCR Master Mix 2×, 2,5 µL de cada primer (27F e 1492R), 100 ng de DNA, e água ultrapura livre de nucleases em volume 7,5 µL.

O protocolo de amplificação consistiu em uma desnaturação inicial a 94 °C por 3 min, seguida de 26 ciclos compostos por desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 53 °C por 2 min e extensão a 72 °C por 2 min, com acréscimo progressivo de 15 s por ciclo, visando compensar o aumento do comprimento dos fragmentos sintetizados. Ao final dos ciclos, foi

realizada uma extensão final a 72 °C por 10 min, assegurando a completa extensão dos amplicons.

Eletroforese em gel de agarose

A análise pós-PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose, visando à separação e visualização dos produtos amplificados. Os amplicons foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 0,9% (m/v), preparado em tampão TAE 1× e corado com GelRed™. Para o preparo das amostras, 5 µL do produto de PCR foram misturados a 1 µL de tampão de carregamento (*loading dye* 6×). A corrida em eletroforese foi conduzida no sistema blueGel™, sob condições padronizadas de voltagem, e a visualização dos fragmentos de DNA foi realizada em transiluminador de LED azul (*Loccus Biotecnologia*®).

Figura 14: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação

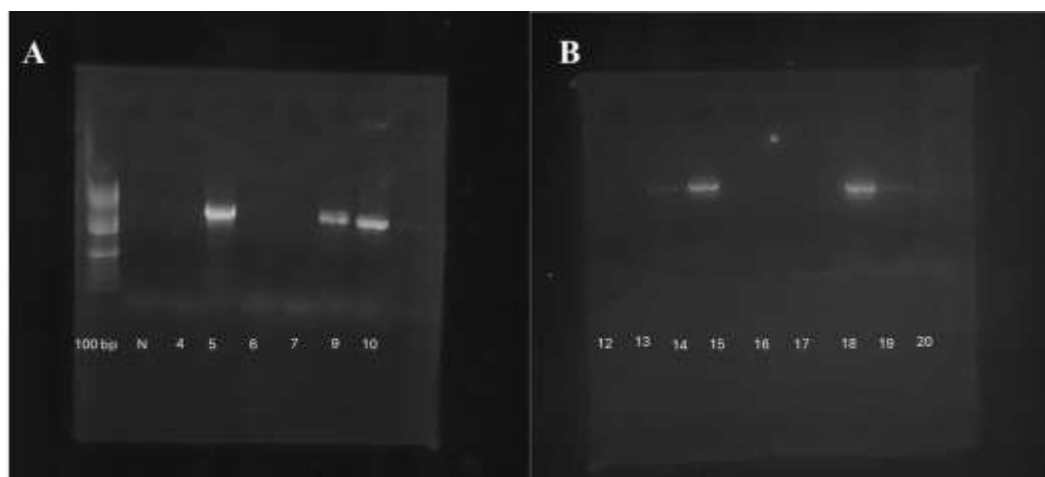


Imagem A, poço 1: marcador de peso molecular de alta resolução (DNA ladder de 100 pb) diluído 1:1; Poço 2: controle negativo da reação (ausência de DNA molde); Poços 4 a 10 (amostras + o corante *loading dye*): produtos de PCR obtidos a partir do DNA genômico dos Isolados. Imagem B, poço 1 à 9, nas amostras 12 a 20, produtos de PCR obtidos a partir do DNA genômico. As respectivas figuras evidenciam a integridade do DNA.

Purificação dos produtos de PCR

A purificação dos produtos amplificados foi realizada conforme o protocolo estabelecido pelo Laboratório de Fisiologia de Microrganismos (LABFIS) da Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG), utilizando o método de precipitação salina com etanol. Para

esse procedimento, 25 μL do produto de PCR foram submetidos à precipitação pela adição de 30 μL de solução de NaCl 3 mol L^{-1} e 750 μL de etanol absoluto previamente resfriado, seguida de incubação a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 16 h, visando à completa precipitação do DNA.

Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a $10.000 \times g$ por 15 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, com posterior descarte do sobrenadante. O pellet de DNA foi submetido a uma etapa de lavagem com etanol 70% gelado, seguida de nova centrifugação a $10.000 \times g$ por 7 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, para remoção de sais residuais. O sobrenadante foi cuidadosamente removido, e as amostras foram mantidas sob fluxo laminar por aproximadamente 10 min, permitindo a completa evaporação do etanol residual.

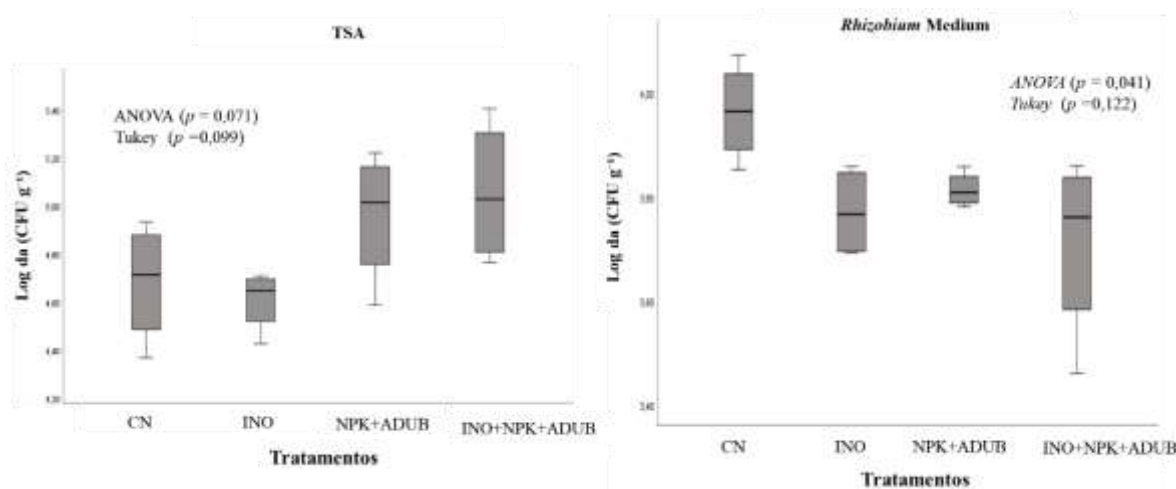
O DNA purificado foi ressuspenso em 30 a 50 μL de água ultrapura estéril livre de nucleases, seguido de quantificação dos produtos purificados em leitor multimodal Agilent BioTek Cytation™ 5. As amostras foram então armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até as análises subsequentes.

Resultados preliminares:

Estimativa das Unidades Formadoras de Colônia - UFC g⁻¹

A contagem de Unidades Formadoras de Colônia por grama de solo (UFC g⁻¹) permitiu estimar a densidade populacional de bactérias cultiváveis, fornecendo informações sobre a atividade microbiana local e o potencial simbiótico do ambiente analisado. As amostras de solo do meio TSA passaram por correção de umidade, enquanto a análise do meio *Rizobium* Médio, as amostras foram tratadas estatisticamente em Log₁₀. Os resultados estão expressos no gráfico 6.

Figura 15: Unidades formadoras de Colônia (UFC g⁻¹)



Contagem de Unidades Formadoras de Colônia em TSA e *Rizobium* Medium. Tratamentos: CN: controle negativo; INO: inoculação com *Bradyrhizobium japonicum*; NPK+ADUB: Nitrogênio, Fósforo, Potássio e esterco bovino; INO+NPK+ADUB: *Bradyrhizobium japonicum* associada à adubação NPK e esterco bovino.

Os dados de contagem de UFC para o meio TSA atenderam aos pressupostos de normalidade, conforme indicado pelos testes de Kolmogorov-Smirnov ($p = 0,200$) e Shapiro-Wilk ($p = 0,804$), não havendo evidências de desvio da distribuição normal. Isso valida o uso de testes paramétricos para análise comparativa entre os grupos, como a ANOVA. O teste de Levene indicou homogeneidade das variâncias entre os grupos, com valores de ($p > 0,24$).

A ANOVA indicou tendência à significância estatística entre os tratamentos ($p = 0,071$), entretanto, o teste de comparações múltiplas de Tukey apontou diferenças estatisticamente significativas entre grupos específicos ($p = 0,099$), apontando que tratamentos contendo adubação mineral e orgânica (NPK+ADUB e INO+NPK+ADUB) apresentaram valores medianos mais elevados e em relação ao tratamento apenas inoculado (INO), e também

superiores ao controle (CN), ainda que estas diferenças não tenham atingido significância estatística robusta. Visualmente, o boxplot do TSA sugere maior variabilidade nos tratamentos com adubação, o que pode refletir maior heterogeneidade microbiana associada à adição de nutrientes e matéria orgânica.

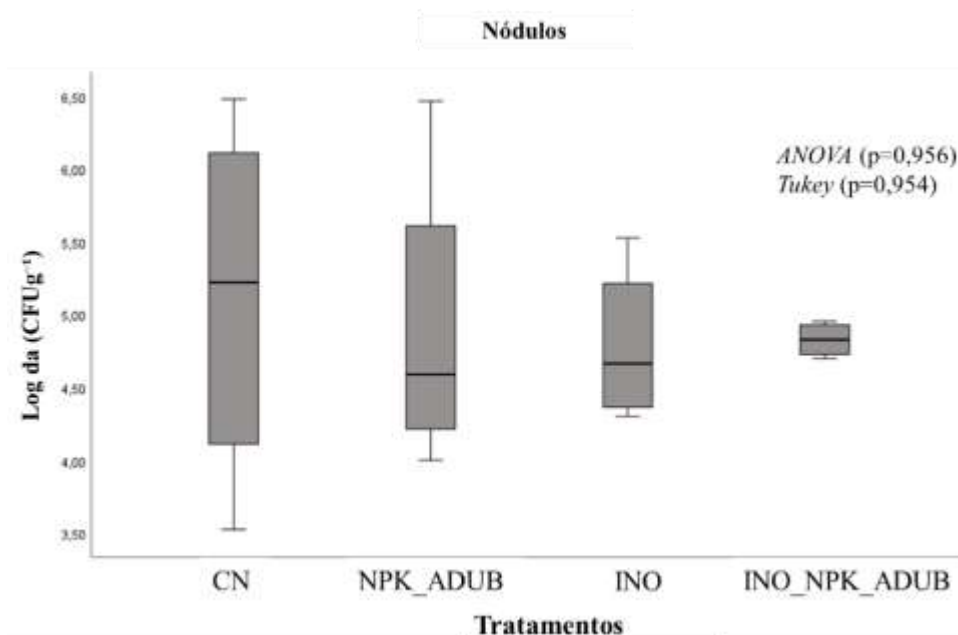
O tratamento com NPK + ADUB apresentou a maior mediana, de aproximadamente 5,18 log UFC g⁻¹ úmido, seguido pelo tratamento controle (CN), com mediana de cerca de 5,00 log UFC g⁻¹. O tratamento combinado INO + NPK + ADUB apresentou mediana de 5,08 log UFC g⁻¹ e amplitude interquartil relativamente alta, indicando variabilidade nas respostas. Já o tratamento com inoculação (INO) isolada apresentou a menor mediana, de 4,88 log UFC g⁻¹ úmido.

O meio *Rhizobium* Medium®, a ANOVA indicou diferenças estatisticamente significativas na densidade populacional de bactérias do gênero *Rhizobium* entre os tratamentos ($p = 0,041$), apontando variações na densidade populacional entre os tratamentos. Contudo, o teste de Tukey não detectou diferenças significativas nas comparações ($p = 0,122$), sugerindo que a significância da ANOVA pode estar associada a uma variação mais ampla no conjunto total dos grupos. Nessa contagem, o tratamento CN apresentou a maior mediana, de aproximadamente 3,96 log UFC g⁻¹ solo seco, enquanto o tratamento INO apresentou mediana de 3,76 log UFC g⁻¹. O tratamento NPK + ADUB manteve mediana similar, de 3,80 log UFC g⁻¹, e o tratamento combinado INO + NPK + ADUB apresentou a menor mediana, de 3,76 log UFC g⁻¹, mas com a maior amplitude entre os grupos, sugerindo alta variabilidade na resposta microbiana sob esta condição.

A comparação entre os dois meios de cultivo evidencia respostas distintas da microbiota do solo. O meio TSA, de caráter não seletivo, foi mais sensível para detectar tendências associadas à comunidade bacteriana total, especialmente nos tratamentos com adubação, que apresentaram maiores valores de UFC. Em contraste, o *Rhizobium* Medium®, seletivo para rizóbios, revelou um padrão menos consistente entre os tratamentos, com maior destaque para o controle, que apresentou maior mediana e menor variabilidade.

Esses resultados são coerentes com a função de cada meio de cultivo: o TSA reflete a atividade global da microbiota cultivável, enquanto o *Rhizobium* Medium® é mais específico para bactérias simbióticas. Assim, os dados sugerem que a adubação orgânica e minerais favoreceram principalmente a microbiota geral do solo, enquanto o efeito sobre as populações específicas de rizóbios foi menos evidente e mais variável entre os tratamentos.

Figura 16: Unidades formadoras de Colônia (UFC g⁻¹) dos nódulos



Contagem de Unidades Formadoras de Colônia de Nódulos de *Stylosanthes guianensis* em *Rizobium* Medium. Tratamentos: CN: controle negativo; INO: inoculação com *Bradyrhizobium japonicum*; NPK+ADUB: Nitrogênio, Fósforo, Potássio e esterco bovino; INO+NPK+ADUB: *Bradyrhizobium japonicum* associada à adubação NPK e esterco bovino.

A distribuição dos dados de abundância nos nódulos entre os tratamentos (CN, NPK+ADBO, INO e INO+NPK+ADBO) foi inicialmente avaliada quanto à normalidade pelos testes de Kolmogorov–Smirnov e Shapiro–Wilk, os quais indicaram adequação dos dados aos pressupostos paramétricos ($p > 0,05$). Dessa forma, procedeu-se à análise de variância unifatorial (ANOVA), complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, e, como abordagem não paramétrica, pelo teste de Kruskal–Wallis.

A ANOVA revelou ausência de diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ($p = 0,956$), indicando que as variações observadas nos valores médios de \log NOD não podem ser atribuídas de forma consistente aos efeitos dos diferentes manejos (controle, adubação, inoculação e combinação adubação + inoculação). O teste de Tukey corroborou esse resultado ($p = 0,954$), não identificando pares de tratamentos com diferenças significativas. De forma complementar, o teste de Kruskal–Wallis, aplicado por não assumir normalidade, também não detectou diferenças estatísticas entre os grupos ($p = 0,908$),

Do ponto de vista descritivo, observa-se maior variabilidade no tratamento controle (CN), com ampla dispersão dos valores e mediana mais elevada, sugerindo heterogeneidade da

microbiota nativa. O tratamento com adubação (NPK+ADBO) apresentou também elevada amplitude, enquanto os tratamentos com inoculante (INO) e, especialmente, a combinação inoculante + adubação (INO+NPK+ADBO) exibiram menor variabilidade, indicando maior uniformidade da comunidade microbiana. Entretanto, essas diferenças são apenas tendências e não atingiram significância estatística.

Em conjunto, os resultados indicam que, nas condições edafoclimáticas e no período avaliado, nem a inoculação com *Bradyrhizobium japonicum* nem a adubação mineral e orgânica, isoladas ou combinadas, promoveram alterações significativas na densidade de microrganismos associados aos nódulos.

Isolados NFB e LGI

A realização de testes em diferentes meios de cultivo, como NFB e LGI, é fundamental para a validação dos isolados obtidos inicialmente em meio seletivo *Rhizobium*, pois permite confirmar o potencial diazotrófico desses microrganismos e reduzir a possibilidade de falsos positivos. Visto que uma bactéria capaz de fixar nitrogênio atmosférico seria, capaz de modificar um meio pobre em nitrogênio, criando condições que posteriormente possibilitam a sucessão de outros microrganismos não fixadores, além disso, esse teste possibilita uma etapa de confirmação fisiológica, evidenciando a capacidade metabólica de utilização do N₂ atmosférico, o resultado está descrito na Tabela 7.

Tabela 7: Confirmação de possíveis diazotróficas

Amostras isoladas	Origem do isolamento	LGI	NFB
Isolado 4	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 5	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 6	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 7	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 9	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 10	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 11	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 12	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 13	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 14	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 15	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 16	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 17	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 18	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 19	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 20	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 21	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 22	Meio Rhizobium	+	+

Isolado 23	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 14	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 25	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 26	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 27	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 28	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 29	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 30	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 32	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 33	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 34	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 36	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 39	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 40	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 41	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 42	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 43	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 44	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 45	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 47	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 49	Meio Rhizobium	+	+

Isolado 50	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 51	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 52	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 53	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 54	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 55	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 57	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 58	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 59	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 60	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 61	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 62	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 63	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 64	Meio Rhizobium	+	+
Isolado 65	Meio Rhizobium	+	+

Em estudos recentes, isolados provenientes de solos e rizosfera cresceram em meios semissólidos livres de nitrogênio como NFB e LGI e foram subsequentemente caracterizados por formação de película ou halo típico no meio semissólido, um critério visual clássico de atividade diazotrófica funcional. Nesses meios semissólidos, a comprovação da atividade diazotrófica é indicada pela formação de um halo ou película característica de crescimento subsuperficial, resultante da atividade da nitrogenase, o complexo enzimático responsável pela redução de N₂ em amônia (Buisset, Soust e Scott, 2025).

Esse tipo de validação em diferentes sistemas de cultivo fortalece a interpretação de que os isolados possuem, de fato, potencial fixador de nitrogênio, constituindo importância do ponto de vista da bioprospecção de potenciais microrganismos fixadores, com isso, os microrganismos confirmados funcionalmente podem ser selecionados para aplicações biotecnológicas, tais como inoculantes microbianos para agricultura sustentável, aumento da eficiência do uso de nitrogênio no solo e redução do uso de fertilizantes industriais nitrogenados (Renganathan *et al.*, 2025).

Conclusão preliminar:

Os resultados de unidades formadoras de colônia (UFC) indicaram ausência de diferença estatisticamente significativa para o meio TSA. Em contraste, no meio Rizobium, observou-se diferença significativa na densidade de bactérias cultiváveis no solo.

ANEXO 2:

SISBIO

Autorização para atividades com finalidades científicas e Registro voluntário para a coleta de material botânico, fúngico e microbiológico:



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Registro voluntário para a coleta de material botânico, fúngico e microbiológico

Número: 97662-1	Data da Emissão: 15/01/2025 14:37:44	Validade*: 15/01/2026
De acordo com o artigo 22 da Portaria ICMBio nº 748/2022, a coleta e transporte de material botânico, fúngico e microbiológico, exceto vegetais hidróbios e espécies que constem em listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção, dispensa autorização do Sisbio; sendo facultativa, exceto em unidade de conservação ou em caverna, a obtenção de registro voluntário para a coleta de material botânico, fúngico e microbiológico, não classificado como oficialmente ameaçado.		
Dados do titular		
Nome: JANERSON JOSE COELHO	CPF: 073.800.284-48	

Observações e ressalvas

1	Todos os membros da equipe de pesquisa devem estar cientes das recomendações e boas práticas a serem seguidas neste momento de emergência zoonosária no Brasil devido a gripe aviária. Informe-se na página do CEMAVE na Internet: https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/centros-de-pesquisa/cemave/destaques/gripe-aviaria/gripe-aviaria-1 .
2	Esse documento não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; II) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; III) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; IV) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; V) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
3	Este documento não é válido para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e c) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna.
4	O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
5	Este documento não dispensa o cumprimento da Lei nº 13.123/2015, que dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade.
6	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia (Decreto nº 98.830, de 15/01/190).
7	Caso seja identificada a ocorrência de espécie exótica dentro ou no entorno de UNIDADE DE CONSERVAÇÃO FEDERAL, além de descrever no relatório de atividades, o pesquisador deve informar à equipe gestora com maior brevidade possível.
8	Este documento não abrange a coleta de vegetais hidróbios, tendo em vista que o Decreto-Lei nº 221/1967 e o Art. 36 da Lei nº 9.605/1998 estabelecem a necessidade de obtenção de autorização para coleta de vegetais hidróbios para fins científicos.

Atividades

#	Atividade	Grupo de Atividade
1	Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico	Fora de UC Federal

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	Reino	Fungi
2	Reino	Archaea
3	Reino	Bacteria

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº Portaria ICMBio nº 748/2022. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0976620120250115

Página 1/1



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 99319-1	Data da Emissão: 03/06/2025 16:03:01	Validade*: 03/06/2026
De acordo com o art. 31 da Portaria ICMBio nº 748/2022, esta autorização possui vigência equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto e validade de um ano, devendo ser revalidada anualmente, através da apresentação do relatório anual de atividades, no prazo de até 30 dias após o aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: JANERSON JOSE COELHO	CPF: 073.800.284-48
Título do Projeto: Bioprospecção de microrganismos do solo da Chapada do Araripe	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI URCA	CNPJ: 06.740.864/0001-26

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico	Plantae	-
2	Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico	Fungi	-
3	Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico	Archaea	-
4	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Archaea	-
5	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Archaea	-
6	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Bacteria	-
7	Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico	Bacteria	-
8	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Bacteria	-

A quantidade prevista só é obrigatória para atividades do tipo "Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ". Essa quantidade abrange uma porção territorial mínima, que pode ser uma Unidade de Conservação Federal ou um Município.

A quantidade significa: por espécie X localidade X ano.

Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Fungos)	Outras amostras biológicas(Amostra de solo para isolamento, cultivo e metagenômica.)
2	Amostras biológicas (Microorganismos)	Outras amostras biológicas(Amostra de solo para isolamento, cultivo e metagenômica.)
3	Amostras biológicas (Plantas)	Semente, Seiva, Rizoma, Ramos, Raízes, Perfilho/rebento, Óleos/Resinas/Látex, Madeira, Frutos/estróbilos, Folhas, Flor, Caule, Casca

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI URCA	Laboratório

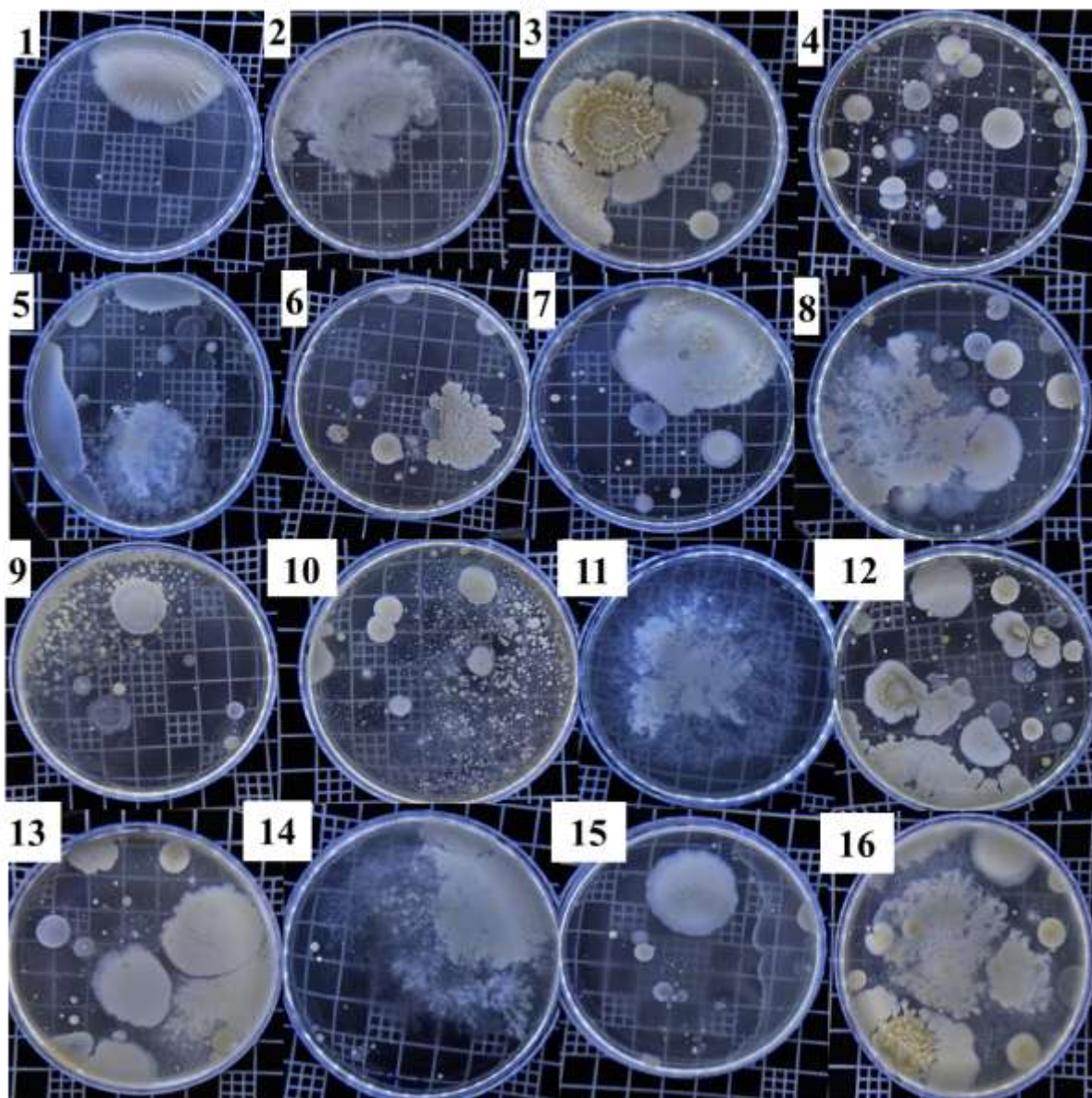
Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº Portaria ICMBio nº 748/2022. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0993190120250603

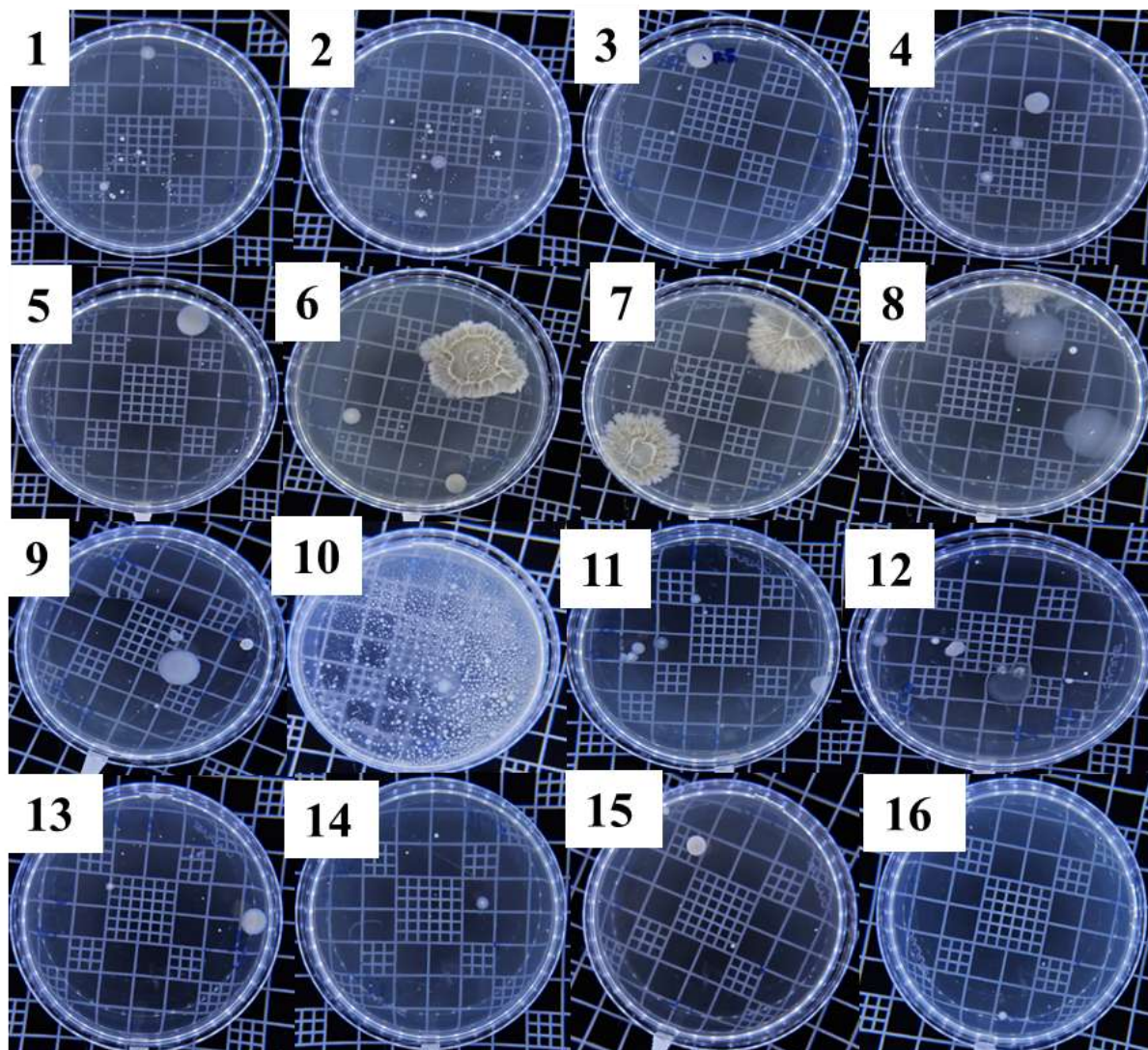
Página 3/4

ANEXO 3: Semeio de Placas

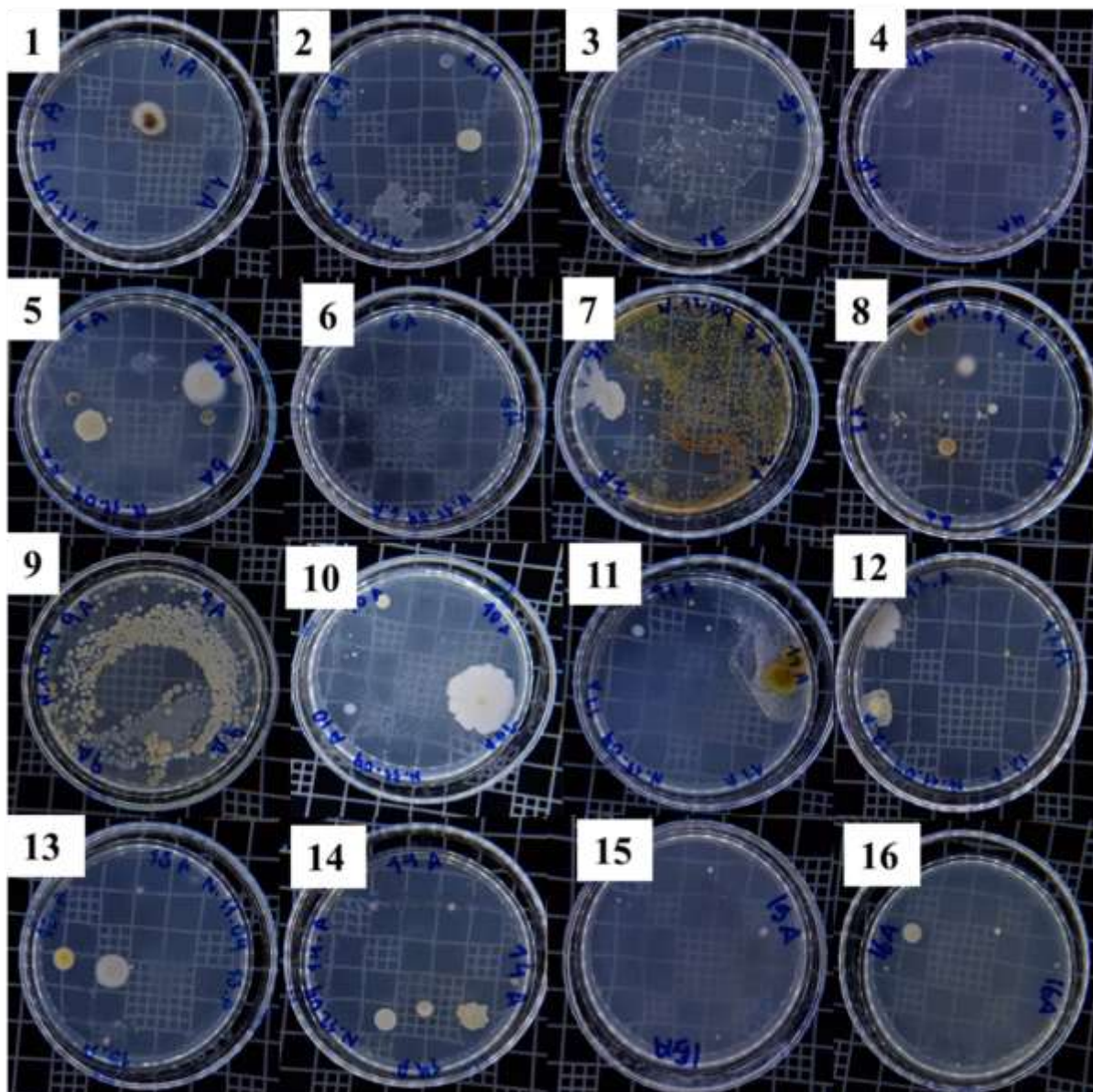
Amostras de solo cultivado em meio TSA



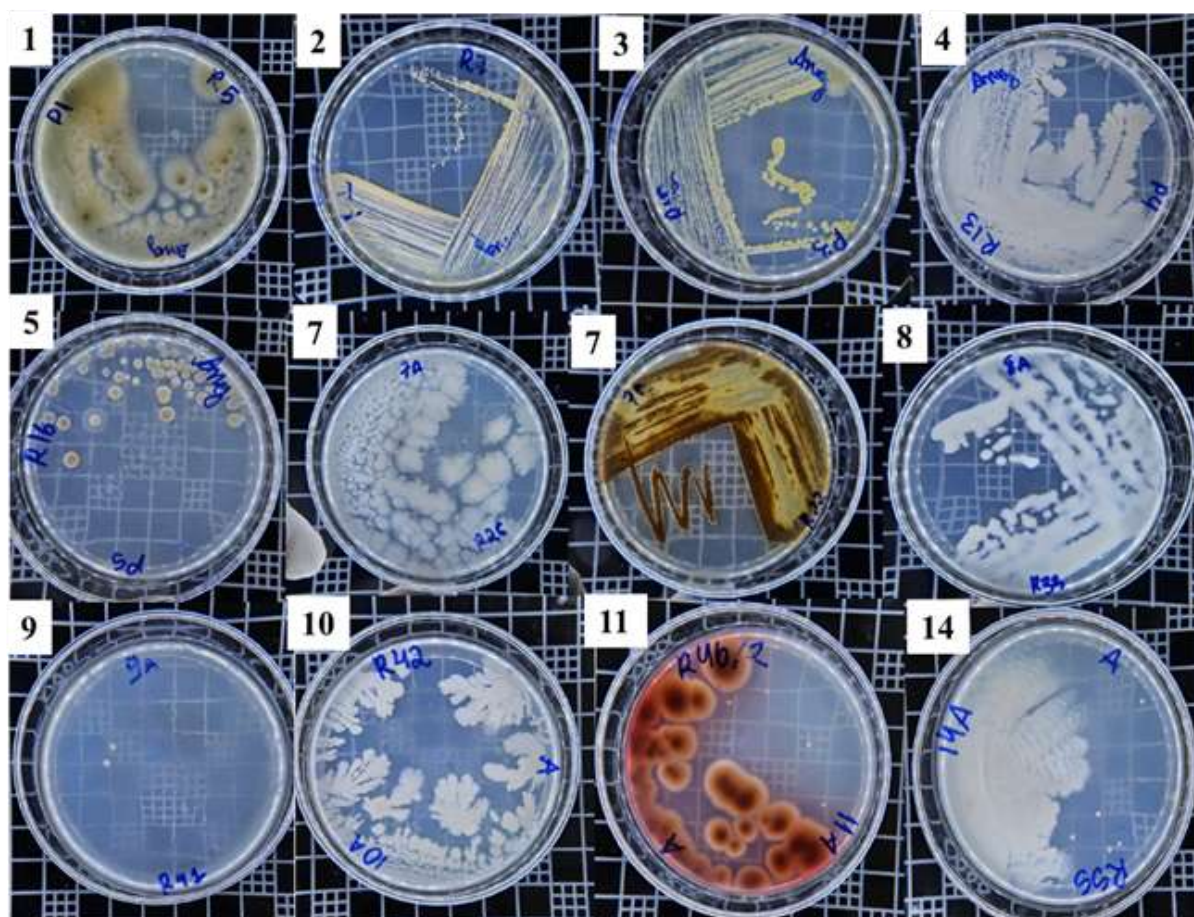
Amostras de solo cultivadas em *Rizobium* Medium®



Semeio de bactérias isoladas de nódulos cultivados em meio *Rizobium* Medium®

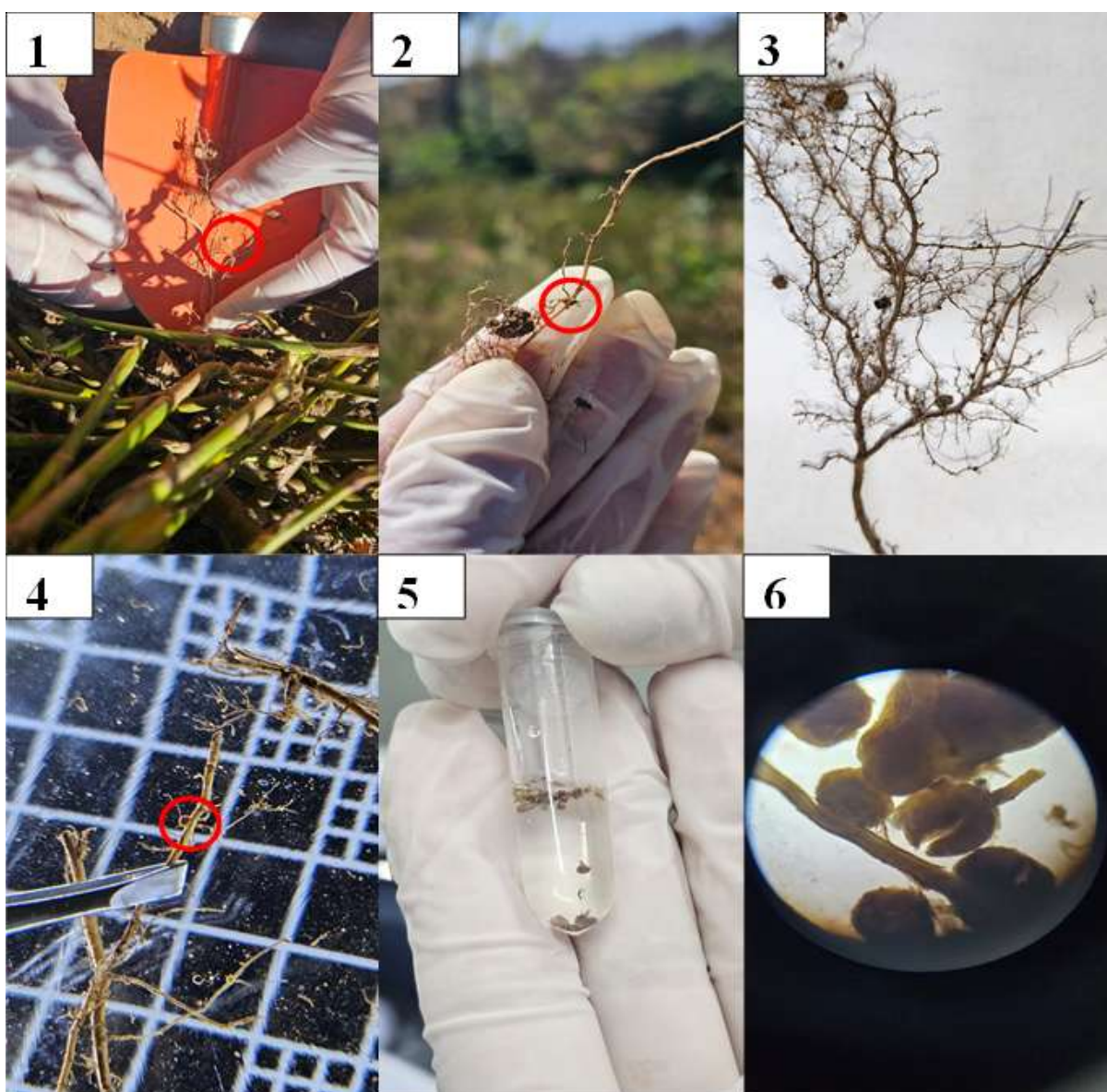


Repicagem de bactérias isoladas de nódulos cultivados em meio *Rizobium* Medium®



ANEXO 4: Triagem do material biológico.

Coleta de sistemas radiculares de *Stylosanthes guianensis* apresentando nodulação (1); identificação e seleção de nódulos *in situ* no campo (2); transporte das raízes ao laboratório para triagem dos nódulos e remoção do solo aderido (3); separação manual dos nódulos das raízes (4); nódulos acondicionados em microtubos estéreis e submetidos a sucessivas etapas de lavagem (5); registro fotográfico dos nódulos por microscopia óptica, utilizando objetiva de 40× (6).



ANEXO 5: Confirmação em Meio NFB e LGI para possíveis diazotróficas

Todas as cepas isoladas neste estudo apresentam o padrão de formação de halo representado nas imagens a seguir. Meio NFB (1); Meio LGI (2).

