

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Agrárias**  
**Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal**

Karla Sabrina Magalhães Andrade Padilha

**IDENTIFICAÇÃO E INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE  
CRESCIMENTO NO CULTIVO DE GRÃO-DE-BICO**

Montes Claros  
2025

Karla Sabrina Magalhães Andrade Padilha

**IDENTIFICAÇÃO E INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE  
CRESCIMENTO NO CULTIVO DE GRÃO-DE-BICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Produção Vegetal da Universidade Federal de Minas  
Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título  
de Doutor em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Rodinei Facco Pegoraro

Coorientadores: Prof. Dr. Eduardo Robson Duarte  
Prof. Dr. Demerson Arruda Sanglard

Montes Claros  
2025

Padilha, Karla Sabrina Magalhães Andrade.

P123i Identificação e inoculação de bactérias promotoras de crescimento no cultivo de  
2025 grão-de-bico [manuscrito]/ Karla Sabrina Magalhães Andrade Padilha. Montes Claros,  
2025.

124 f.: il.

Tese (doutorado) - Área de concentração em Produção Vegetal. Universidade  
Federal de Minas Gerais / Instituto de Ciências Agrárias.

Orientador: Rodinei Facco Pegoraro

Banca examinadora: Leonardo David Tuffi Santos, Henrique Maia Valério, Maria  
Nilfa de Almeida Neta, Sandra Eulália Santos Faria, Cândido Alves da Costa.

Inclui referências: f. 32-42; 57-63; 86-92; 116-122.

1. Raízes (botânica) -- Teses. 2. Nitrogênio -- Fixação -- Teses. 3. Bactérias  
gram-negativas -- Teses. 3. Bactérias nitrificantes -- Teses. 4. Grão-de-bico -- Teses.  
I. Pegoraro, Rodinei Facco. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de  
Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 631.8

## ATA DE DEFESA DE TESE

Aos 10 dias do mês de julho de 2025 às 14:00 horas, sob a Presidência do Professor Rodinei Facco Pegoraro, D. Sc. (Orientador - UFMG/ICA) e com a participação dos Professores Leonardo David Tuffi Santos, D. Sc. (UFMG/ICA), Cândido Alves da Costa, D. Sc. (UFMG/ICA), Henrique Maia Valério, D. Sc. (Unimontes), Sandra Eulália Santos Faria, D. Sc. (IFNMG) e da Pós-Doutoranda Maria Nilfa de Almeida Neta, D. Sc. (UFMG/ICA), reuniu-se, presencialmente, a Banca de tese de **Karla Sabrina Magalhães Andrade Padilha**, aluna do Curso de Doutorado em Produção Vegetal. O resultado da defesa de tese intitulada: "**Identificação e inoculação de bactérias promotoras de crescimento no cultivo de grão-de-bico**" senda a aluna considerada **aprovada**. E, para constar, eu, Professor Rodinei Facco Pegoraro, Presidente da Banca, lavrei a presente ata que depois de lida e aprovada, será assinada por mim e pelos demais membros da Banca examinadora.

OBS.: A aluna somente receberá o título após cumprir as exigências do **ARTIGO 65** do regulamento do Curso de Doutorado em Produção Vegetal, conforme apresentado a seguir:

**Art. 65 Para dar andamento ao processo de efetivação do grau obtido, o candidato deverá, após a aprovação de sua Dissertação ou Tese e da realização das modificações propostas pela banca examinadora, se houver, encaminhar à secretaria do Colegiado do Programa, com a anuência do orientador, 1 (um) exemplar impresso e 1 (um) exemplar eletrônico da dissertação ou tese, no prazo de 60 (sessenta) dias.**

Montes Claros, 10 de julho de 2025.

Documento assinado digitalmente  
**RODINEI FACCO PEGORARO**  
Data: 11/07/2025 08:14:49-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Rodinei Facco Pegoraro  
Orientador

Documento assinado digitalmente  
**CÂNDIDO ALVES DA COSTA**  
Data: 11/07/2025 08:44:43-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Cândido Alves da Costa  
Membro

Documento assinado digitalmente  
**SANDRA EULÁLIA SANTOS FARIA**  
Data: 11/07/2025 15:49:16-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Sandra Eulália Santos Faria  
Membro

Documento assinado digitalmente  
**LEONARDO DAVID TUFFI SANTOS**  
Data: 11/07/2025 08:19:36-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Leonardo David Tuffi Santos  
Membro

Documento assinado digitalmente  
**HENRIQUE MAIA VALÉRIO**  
Data: 11/07/2025 11:21:43-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Henrique Maia Valério  
Membro

Documento assinado digitalmente  
**MARIA NILFA DE ALMEIDA NETA**  
Data: 11/07/2025 11:27:47-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Maria Nilfa de Almeida Neta  
Membro

*À minha mãe, LUCIMAR, e ao meu marido, FÁBIO, pelo apoio, dedicação, incentivo em todos os momentos e projetos da minha jornada, por acreditarem no meu potencial e pelo amor incondicional.*

## AGRADECIMENTOS

A conclusão desta tese representa não apenas o fim de uma importante etapa acadêmica, mas, também, a soma de muitos esforços, apoios e incentivos que recebi ao longo dessa jornada.

Em primeiro lugar, agradeço ao meu orientador, Rodinei Facco Pegoraro, pela orientação segura, pelos ensinamentos valiosos, pela paciência e pela confiança no meu trabalho. Sua dedicação e comprometimento foram fundamentais para o desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço com todo o meu coração à minha família, minha mãe, Lucimar, minha irmã, Karina e meu marido, Fábio, que sempre acreditou em mim e me ofereceu amor, suporte e compreensão incondicionais. Sem vocês, este sonho não teria sido possível.

Aos meus colegas de curso, agradeço pela parceria, pelas trocas de conhecimento e pelo apoio mútuo nos momentos desafiadores. Compartilhar essa trajetória com vocês tornou o caminho mais leve e enriquecedor.

Aos meus amigos, meu sincero agradecimento por estarem ao meu lado, mesmo nos momentos em que a rotina intensa me afastava do convívio. A amizade e o incentivo de vocês foram essenciais para que eu seguisse em frente com ânimo renovado.

Aos integrantes do grupo GENURA, Aline, Lucas, Letícia, Maria Nilfa, Verônica, Samira, Gustavo e Renata, pelo apoio e colaboração na condução dos experimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Instituto de Ciências Agrárias da UFMG (ICA/UFMG), pelo crescimento acadêmico e profissional.

Aos órgãos de fomento FAPEMIG, CNPq e CAPES, pelo suporte financeiro imprescindível para a execução desta pesquisa.

A todos, minha eterna gratidão.

# IDENTIFICAÇÃO E INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO NO CULTIVO DE GRÃO-DE-BICO

## RESUMO

A utilização de bactérias promotoras de crescimento de plantas em conjunto com a adubação orgânica, representa abordagem biotecnológica estratégica para a intensificação sustentável da agricultura, especialmente em leguminosas de importância nutricional e econômica, como o grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.). Diversos estudos têm evidenciado o potencial dessas bactérias, como *Bradyrhizobium*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Klebsiella variicola*, *Mesorhizobium* sp., *Kosakonia radicincitans*, entre outras, na promoção do crescimento vegetal, por meio de mecanismos como fixação biológica de nitrogênio, solubilização de nutrientes, síntese de hormônios e incremento na eficiência do uso de recursos. Neste estudo foram realizados a identificação de microrganismos nativos de solos tropicais, bem como análises individuais dos efeitos de promoção de crescimento dessas, também foram desenvolvidos e testados inoculantes biológicos, em ensaios sob condições controladas e em campo. Em nossos estudos foi identificado pela primeira vez no Brasil, a bactéria do gênero *Mesorhizobium* sp1, nativa de solos tropicais, que foi capaz de formar simbiose com o grão-de-bico gerando nódulos radiculares viáveis e capaz de fixar nitrogênio atmosférico. Os resultados obtidos demonstram que a inoculação e coinoculação com múltiplas cepas bacterianas resultam em efeitos sinérgicos sobre o desempenho fisiológico e agrônômico do grão-de-bico, promovendo aumentos significativos na biomassa, no número e na massa de nódulos, nos teores foliares de clorofila, e no acúmulo de nitrogênio, fósforo e potássio. Além disso, os estudos demonstraram que cultivares de grão-de-bico respondem de modo distinto às combinações com microrganismos, destacando-se a necessidade de abordagens integradas e adaptadas às condições edafoclimáticas regionais, particularmente em ambientes semiáridos.

Palavras-chave: nódulos radiculares; fixação de nitrogênio; *Mesorhizobium* sp.; bactérias associativas ou diazotróficas; *Cicer arietinum*.

# IDENTIFICAÇÃO E INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO NO CULTIVO DE GRÃO-DE-BICO

## ABSTRACT

The use of plant growth-promoting bacteria in combination with organic fertilization represents a strategic biotechnological approach for the sustainable intensification of agriculture, especially in legumes of nutritional and economic importance, such as chickpea (*Cicer arietinum* L.). Several studies have highlighted the potential of these bacteria, including *Bradyrhizobium*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Klebsiella variicola*, *Mesorhizobium* sp., *Kosakonia radicincitans*, among others, in promoting plant growth through mechanisms such as biological nitrogen fixation, nutrient solubilization, phytohormone synthesis, and improved resource use efficiency. In this study, native microorganisms from tropical soils were identified, along with individual analyses of their plant growth-promoting effects. In addition, biological inoculants were developed and tested under both controlled and field conditions. For the first time in Brazil, we identified a bacterium of the genus *Mesorhizobium* sp1, native to tropical soils, which could establish symbiosis with chickpea by forming viable root nodules and fixing atmospheric nitrogen. The results demonstrated that inoculation and co-inoculation with multiple bacterial strains resulted in synergistic effects on the physiological and agronomic performance of chickpea, promoting significant increases in biomass, nodule number and weight, chlorophyll content in leaves, and nitrogen, phosphorus, and potassium accumulation. Furthermore, the studies showed that chickpea cultivars respond differently to combinations with microorganisms, highlighting the need for integrated approaches adapted to regional edaphoclimatic conditions, particularly in semiarid environments.

Keywords: root nodules; nitrogen fixation; *Mesorhizobium* sp.; associative or diazotrophic bacteria; *Cicer arietinum*.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>09</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>11</b>
2.1 Objetivo geral .....	11
2.2 Objetivos específicos .....	11
<b>3. ARTIGOS .....</b>	<b>12</b>
3.1 Capítulo 1 .....	12
3.1.1 Artigo 1: Bactérias promotoras de crescimento e simbioses no Grão-de-bico: Uma Revisão .....	12
3.2 Capítulo 2 .....	43
3.2.1 Artigo 2 - Inoculação e coinoculação com Bactérias Promotoras do Crescimento vegetal em Grão-de-Bico: Aspectos fisiológicos e crescimento vegetal .....	43
3.3 Capítulo 3 .....	64
3.3.1 Artigo 3 - identificação de microrganismos promotores de crescimento e sua relação com componentes da produção de Grão-de-bico em regiões tropicais .....	64
3.4 Capítulo 4 .....	93
3.4.1 Artigo 4 - Avaliação de inoculantes com rizobactérias nativas e sua interação com adubação orgânica na promoção de crescimento do grão-de-bico .....	93
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>123</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O uso de bioinsumos na agricultura têm proporcionado economias significativas, tanto para o produtor quanto para os sistemas de produção como um todo, promovendo aumento de produtividade com menor impacto ambiental. Atualmente, a agricultura enfrenta grandes desafios para manter a produtividade sem comprometer os recursos naturais.

A crescente demanda por alimentos, os impactos das mudanças climáticas e a necessidade de reduzir o uso de insumos químicos e minerais têm impulsionado a busca por práticas mais sustentáveis. Nesse cenário, o uso de inoculantes à base de microrganismos promotores de crescimento, principalmente em conjunto com a adubação orgânica, tem se destacado como alternativa ao uso de insumos convencionais, contribuindo para a economia no uso de fertilizantes e para a saúde dos ecossistemas agrícolas.

Neste contexto, o grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) tem despertado crescente interesse no Brasil, tanto pelo seu potencial produtivo quanto pelo seu valor nutricional, principalmente devido ao alto teor de proteína. Além disso, é uma cultura rústica, com baixa incidência de pragas e doenças, e boa tolerância ao déficit hídrico, o que a torna promissora para cultivo em regiões tropicais e semiáridas, com bons resultados produtivos no cerrado brasileiro. Assim como outras leguminosas, o grão-de-bico tem a capacidade de estabelecer simbioses com bactérias fixadoras de nitrogênio, contribuindo para sistemas de produção sustentáveis. No entanto, por ser uma cultura ainda pouco explorada, especialmente no Brasil, há carência de informações sobre cultivares adaptadas e sua associação ou simbiose com microrganismos mais eficientes na promoção do crescimento e fixação biológica de nitrogênio.

A inoculação e a coinoculação com bactérias benéficas têm se consolidado como práticas eficientes para melhorar o desempenho das culturas e reduzir a dependência de fertilizantes químicos. No entanto, no caso do grão-de-bico, ainda são poucos os estudos voltados à identificação de rizóbios ou outras bactérias associativas que atuem de forma eficaz em ambientes tropicais.

Diante disso, torna-se essencial identificar e caracterizar as bactérias nativas do solo que interagem com o grão-de-bico cultivado em regiões semiáridas brasileiras. Este conhecimento pode contribuir diretamente para o desenvolvimento de inoculantes adaptados à realidade tropical, promovendo cultivos mais eficientes e sustentáveis. Neste trabalho, partimos da hipótese de que microrganismos associados ao grão-de-bico influenciam positivamente no desenvolvimento da cultura. Assim, o objetivo principal deste estudo foi isolar, identificar e

caracterizar microrganismos promotores de crescimento presentes nas raízes de grão-de-bico cultivado no norte do estado de Minas Gerais.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar o efeito de bactérias promotoras de crescimento vegetal sobre a produção e crescimento do grão-de-bico.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Identificar microrganismos nativos associados à raiz de grão-de-bico com potencial para promoção de crescimento de plantas.

Avaliar o efeito da inoculação e coinoculação com bactérias promotoras de crescimento sobre as características fisiológicas e o crescimento de plantas de grão-de-bico;

Avaliar o uso de inoculantes provenientes de rizobactérias nativas de solo tropical em associação a adubação orgânica na promoção de crescimento vegetal de grão-de-bico.

### 3. ARTIGOS

#### 3.1 Capítulo 1 – Revisão de literatura

3.3.1 Artigo 1: *Bactérias promotoras de crescimento e simbiotes no grão-de-bico: uma revisão*

#### RESUMO

As bactérias promotoras de crescimento aumentam a produtividade e a resistência das culturas agrícolas, contribuindo para a estabilidade da produção e reduzindo a utilização de insumos químicos. Neste sentido, as leguminosas do gênero *Cicer* destacam-se como excelente fonte de alimento para o homem, no entanto a sua produtividade global pode ser considerada baixa (1,22 t ha<sup>-1</sup>). A principal razão para esta baixa produtividade pode ser atribuída ao investimento insuficiente em práticas culturais, como a fertilização e a utilização de bioinsumos. Neste contexto, esta revisão de literatura descreve a diversidade, fisiologia, genética e aplicações biotecnológicas de bactérias diazotróficas simbióticas e não simbióticas associadas a plantas do gênero *Cicer*, destacando os avanços e perspectivas futuras. A utilização de bactérias simbióticas, particularmente dos gêneros *Bacillus* e *Rhizobium* no grão-de-bico, aumentam a fixação biológica de nitrogênio e reduz a dependência de fertilizantes químicos. A produtividade da cultura pode ser incrementada com o uso de inoculantes, particularmente quando estes são isolados da rizosfera do próprio grão-de-bico. As áreas com elevado teor de matéria orgânica são um fator importante para que ocorra a fixação biológica ou promoção do crescimento das plantas. A integração da inovação tecnológica e das práticas agrícolas sustentáveis promete transformar a produção desta leguminosa, beneficiando tanto os agricultores como o ambiente.

**Palavras-chave:** bactérias associativas; Espécies de *Cicer*; Fixação biológica de nitrogênio; *Mesorhizobium*.

## GROWTH-PROMOTING BACTERIA AND SYMBIONTS IN CHICKPEA: A REVIEW

### ABSTRACT

Plant growth-promoting bacteria increases the productivity and resilience of agricultural crops, contributing to production stability and reducing the use of chemical inputs. In this regard, legumes of the genus *Cicer* stand out as an excellent source of food for humans; however, their global productivity can be considered low (1.22 t ha<sup>-1</sup>). The main reason for this low productivity can be attributed to insufficient investment in cultural practices such as fertilization and the use of bioinputs. In this context, this literature review describes the diversity, physiology, genetics, and biotechnological applications of symbiotic and non-symbiotic diazotrophic bacteria associated with *Cicer* plants, highlighting advances and future perspectives. The use of symbiotic bacteria, particularly from the genera *Bacillus* and *Rhizobium* in chickpea, enhances biological nitrogen fixation and reduces dependence on chemical fertilizers. Crop productivity can be further improved with the use of inoculants, particularly when they are isolated from the chickpea rhizosphere. Areas with high organic matter content are an important factor for the occurrence of biological nitrogen fixation or plant growth promotion. The integration of technological innovation and sustainable agricultural practices promises to transform the production of this legume, benefiting both farmers and the environment.

**Keywords:** associative bacteria; espécies de *Cicer* sp.; Biological nitrogen fixation; *Mesorhizobium*.

### INTRODUÇÃO

A agricultura tem enfrentado desafios como as alterações climáticas, o esgotamento dos recursos, a perda de biodiversidade, a escassez de mão-de-obra e o aumento da procura, principalmente para satisfazer as necessidades nutricionais dos países em desenvolvimento (Tariq *et al.*, 2023). Em resposta a estes desafios, tecnologias avançadas, princípios científicos e práticas de gestão têm sido cada vez mais usados para aumentar a produtividade e a eficiência, visando produzir alimentos com o uso sustentável da terra, da água e de outros recursos, minimizando ao mesmo tempo os impactos ambientais (Zhang *et al.*, 2020; Tariq *et al.*, 2023).

A diversidade de rizóbios associados a leguminosas, como o grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.), tem sido estudada, principalmente pelo seu contributo para a maior qualidade nutricional e proteica do alimento (Zhang *et al.*, 2020). A utilização de bioinsumos é uma alternativa viável aos fertilizantes minerais na produção agrícola, devido ao seu baixo custo e reduzida toxicidade ambiental (Riaz *et al.*, 2021; Etesami *et al.*, 2022). Os bioinsumos consistem em bactérias promotoras do crescimento contribuem para o desenvolvimento das plantas e protegem contra doenças, melhorando a produtividade das culturas sem causar poluição (Dal Cortivo *et al.*, 2020; Pardo-Diaz *et al.*, 2021).

### Plantas do gênero *Cicer* sp.

O gênero *Cicer*, pertencente a tribo *Cicerone*, subfamília *Papilionoideae*, família *Fabaceae* possui mais de 100 espécies descritas, incluindo as mais cultivadas (*C. arietinum*), sendo 9 anuais e 35 perenes, que têm seu centro de diversidade no sudoeste da Ásia, com algumas espécies endêmicas em Marrocos e nas Ilhas Canárias (Van Der Maesen *et al.*, 1972; 1987). Fenotipicamente o grão-de-bico é dividido em dois grupos: microsperma (Desi) e macrosperma (Kabuli) (Queiroga *et al.*, 2021). O tipo Desi apresenta flores rosadas com nervuras roxas, sementes pequenas de forma angular e protegidas por um espesso tegumento, de cor escura. O tipo Kabuli (macrosperma) têm flores brancas, sementes de tamanho médio a grandes, tegumento fino, liso ou lobulado, de cor clara (Figura 1). O grão-de-bico é uma planta herbácea anual, ereta ou rasteira, geralmente pode alcançar de 30 a 70 cm de altura e apresenta ramos que se originam na base do caule, próximos ao solo (Palmero *et al.*, 2022).



**Figura 1:** Sementes e Flor de grão-de-bico tipo Desi (A, B). Sementes e Flor de grão-de-bico tipo Kabuli (C, D). Fotos: Da autora, 2024.

Os três principais países exportadores de grão-de-bico são Austrália, Canadá e Índia, com mais de 40% das exportações em 2022 (USDA, 2024). A Índia, em 2022, foi considerada o maior produtor, com 13,4 milhões de toneladas, seguida pela Austrália com 10,6 milhões de toneladas. O grão-de-bico é considerado uma das leguminosas mais importantes na alimentação

humana, por representar fonte de proteína com baixo custo financeiro, principalmente nos países em desenvolvimento (Zhang *et al.*, 2020). A produção mundial pode ser considerada baixa (11,90 milhões de toneladas) em comparação a outras leguminosas cultivadas como a soja (120,70 milhões de toneladas) e o feijão (12,05 milhões de toneladas) de acordo com a FAO (2023). No Brasil para o mesmo ano a produção de grão-de-bico foi de 3,5 milhões de toneladas, sendo que foram consumidas no país cerca de 8 milhões de toneladas para o ano de 2023.

O grão-de-bico pode ser cultivado em regiões semiáridas e em épocas do ano com menor volume de chuvas (Palmero *et al.*, 2022), com grande potencial produtivo e econômico (Ehlers, 2006). Essa cultura apresenta demanda nutricional, principalmente, para nutrientes ligados ao incremento de biomassa de grãos, como o nitrogênio. Assim como outras leguminosas, o grão-de-bico pode associar a bactérias promotoras de crescimento vegetal e fixadoras de nitrogênio atmosférico, facilitando seu cultivo em solos pobres e reduzindo custos com adubação (Conway *et al.*, 2019; Palmero *et al.*, 2022). O desenvolvimento de técnicas sustentáveis, como o uso de bactérias fixadoras de nitrogênio pode complementar a fertilização tradicional de forma renovável e sustentável (Zhang *et al.*, 2020).

### **Microorganismos na agricultura**

Todos os microambientes associados às plantas, especialmente a rizosfera, estão colonizados por microrganismos. A interação planta-microrganismo contribui para o crescimento da planta, aumenta a tolerância ao stress, proporciona resistência a doenças, melhora a disponibilidade e absorção de nutrientes e promove a biodiversidade (Berg *et al.*, 2009). Vários fatores estão envolvidos na interação planta-microrganismo: (A) bactérias promotoras do crescimento das plantas presentes no solo; (B) as raízes das plantas liberam exsudatos orgânicos que atuam como sinais químicos, atraindo microrganismos em direção aos pêlos radiculares e às raízes laterais através da quimiotaxia; e (C) os microrganismos são atraídos para as raízes laterais emergentes e colonizam os espaços intercelulares do parênquima radicular através de fissuras ao redor das raízes (Berg *et al.*, 2009).

As auxinas, o etileno, as citocininas e as giberelinas, desempenham papéis importantes no crescimento das plantas e podem ser sintetizados pela própria planta ou por microrganismos associados. Além disso, algumas bactérias podem alterar o equilíbrio hormonal das plantas (Bais *et al.*, 2006; Pierik *et al.*, 2006; Berg *et al.*, 2009). O etileno, por exemplo, em baixas concentrações, promove o crescimento das plantas, no entanto, em concentrações elevadas, atua

como inibidor do crescimento e é conhecido como hormônio da senescência (Pierik *et al.*, 2006). As bactérias que podem reduzir a concentração de etileno podem ser utilizadas para promover o crescimento das plantas.

As bactérias associadas a plantas podem reduzir a atividade de microrganismos patogênicos, não só através do antagonismo microbiano, mas também através do aumento da resistência a doenças, fenômeno conhecido como Resistência Sistêmica Induzida (RIS) (FAO, 2015). Os mecanismos do RIS incluem: (1) desenvolvimento e crescimento; (2) tolerância fisiológica, quando reduz a expressão dos sintomas; (3) ambiental, quando associado ao antagonismo microbiano na rizosfera; e (4) resistência bioquímica, que fortalece a parede celular induzindo fitoalexinas e respostas de defesa relacionadas com a resistência (FAO, 2015).

O nitrogênio é o elemento requerido em maiores quantidades pelas plantas. Embora o gás nitrogênio ( $N_2$ ) seja abundante na atmosfera terrestre, não pode ser assimilado pelas plantas na sua forma  $N_2$ . No entanto, pode ser adquirido indiretamente após o processo de fixação biológica de nitrogênio, no qual os microrganismos diazotróficos convertem o  $N_2$  em amônia ( $NH_3$ ) e outros compostos, como nitratos e aminoácidos.

O uso excessivo de fertilizantes inorgânicos à base de nitrogênio pode causar problemas ambientais, como o esgotamento da microbiota nativa, a lixiviação de nutrientes e o aumento da salinidade do solo (Pegoraro *et al.*, 2018; Zeng *et al.*, 2019;). Isso justifica a exigência de redução do uso de fertilizantes nitrogenados inorgânicos e a promoção de práticas agrícolas e agroflorestais mais sustentáveis (Lohosha *et al.*, 2023), como a fixação biológica de nitrogênio por microrganismos. Algumas plantas, em solos deficientes em nitrogênio, estabeleceram associações simbióticas com bactérias fixadoras de nitrogênio. Estes microrganismos fixam o nitrogênio através da enzima nitrogenase. A fixação de nitrogênio é considerada o segundo processo mais vital para a vida na Terra, perdendo apenas para a fotossíntese (Rao *et al.*, 2017).

A entrada de nitrogênio através da fixação biológica é de aproximadamente 122 milhões de toneladas por ano, das quais 55 a 60 milhões de toneladas são fixadas pelas culturas agrícolas (Kuypers *et al.*, 2018). A inoculação e coinoculação de bactérias simbióticas de plantas têm vindo a ganhar atenção como uma alternativa sustentável para a produção agrícola devido ao seu baixo custo e menor toxicidade (Riaz *et al.*, 2021; Etesami *et al.*, 2022). Os produtos formulados com bactérias fixadoras de nitrogênio contribuem para melhor desenvolvimento das plantas e melhoram a produtividade (Dal Cortivo *et al.*, 2020; Pardo-Diaz

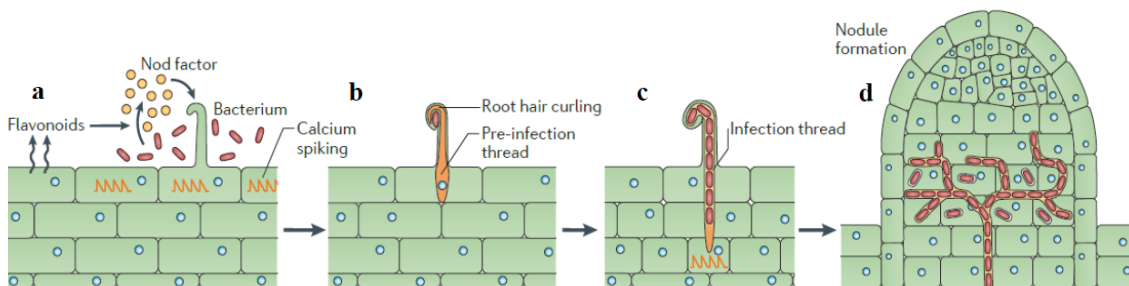
*et al.*, 2021). A inoculação de leguminosas com *Rhizobium* spp., por exemplo, é um caso de sucesso da utilização de bioinsumos na agricultura (Pardo-Diaz *et al.*, 2021).

### Bactérias diazotróficas simbióticas na agricultura

A maioria das bactérias que fixam nitrogênio nos nódulos radiculares das leguminosas são membros da classe  $\alpha$ -proteobactérias e dos gêneros *AlloRhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Microvirga*, *Phyllobacterium* e *Rhizobium* (Etesami *et al.*, 2022). A fixação biológica de nitrogênio refere-se ao processo de transformação de  $N_2$  gasoso pelas bactérias em  $NH_4^+$ .

A fixação biológica do nitrogênio atmosférico em leguminosas é um processo essencial para a fertilidade do solo e para a produção agrícola. Esse processo ocorre quando as plantas liberam compostos denominados flavonoides, que atraem bactérias do gênero *Rhizobium* por meio de exsudatos radiculares (Figura 2). Essas bactérias são específicas para diferentes espécies de leguminosas. Após a colonização das raízes, as bactérias induzem a formação de nódulos, estruturas que servem como locais de fixação (Oliveira *et al.*, 2021).

As células do nódulo são ricas em leghemoglobina, que ajuda a regular o oxigênio, um fator crucial para a atividade das bactérias. Dentro dos nódulos, as bactérias utilizam a enzima nitrogenase para converter o nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) em amônia ( $NH_3$ ). Esse processo utiliza alta demanda energética, requerendo 16 mols de ATP e 8 mols de elétrons para reduzir um mol de  $N_2$  a amônia ( $N_2 + 8e^- + 8H^+ + 16 ATP \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16 ADP + 16 Pi$ ) (Stambulska *et al.*, 2019), geralmente proveniente da respiração celular das bactérias. A amônia produzida é assimilada pelas plantas, sendo convertida em aminoácidos e outros compostos nitrogenados, essenciais para o crescimento e desenvolvimento vegetal.



**Figura 2:** Resumo da infecção de pêlos radiculares de leguminosas por rizóbios. (a) Os flavonoides liberados pela raiz da planta sinalizam para os rizóbios na rizosfera, que por sua vez produzem fatores de nodulação (fatores Nod) reconhecidos pela planta. A percepção do fator Nod ativa a via de sinalização de simbiose, levando ao pico de cálcio, inicialmente nas células epidérmicas, mas posteriormente também nas células corticais que precedem sua colonização. (b) As células do pêlo radicular enrolam e englobam os rizóbios presos à ponta do pelo radicular. Um fio de infecção se forma pela invaginação da membrana celular da planta e os rizóbios presos dentro do pelo.

radicular enrolado então prosseguem pelo fio de infecção em crescimento por divisão celular. (c) O fio de infecção cresce em direção ao nódulo radicular em desenvolvimento. (d) O fio de infecção contendo rizóbios se ramifica dentro do tecido do nódulo, antes que as bactérias sejam liberadas em compartimentos delimitados pela membrana dentro das células do nódulo, onde se diferenciam em seu estado bacteroide fixador de nitrogênio. Imagem de Oldroyd (2013).

O processo de nodulação pode ser dividido em várias etapas (Figura 2). O início da infecção é crucial para a invasão de rizóbios no hospedeiro durante a nodulação. Após o reconhecimento dos fatores Nod liberados pelos rizóbios, os pêlos radiculares da planta hospedeira sofrem ondulação, envolvendo o rizóbios aderidos à superfície dos pelos radiculares (Zipfel *et al.*, 2017). Posteriormente, a parede celular que circunda o rizóbio fechado é localmente degradada, e o pêlo radicular sofre rearranjo, resultando na invaginação da membrana celular e formação de uma estrutura tubular conhecida como fio de infecção. Os rizóbios entram nas células vegetais através de fios de infecção, estendendo-se até a base da raiz e posteriormente penetrando os primórdios do nódulo em desenvolvimento (Zipfel *et al.*, 2017; Feng *et al.*, 2021).

Na relação simbiótica, as leguminosas produzem e liberam compostos flavonoides na rizosfera, especialmente em solos deficientes em nitrogênio, os quais atraem e estimulam as bactérias do gênero *Rhizobium* a produzir oligossacarídeos, conhecidos como fatores Nod, iniciando o processo de sinalização simbiótica com a planta hospedeira (Zipfel *et al.*, 2017). Os fatores Nod são reconhecidos por receptores quinase, que formam complexos homoméricos e heteroméricos na membrana plasmática das células da raiz, desencadeando a sinalização simbiótica. (Charpentier *et al.*, 2016).

A percepção dos fatores Nod pelos receptores quinase transmite o sinal para o interior da célula, induzindo flutuações periódicas na concentração de cálcio (Yuan *et al.*, 2022). Essa flutuação na concentração de cálcio atua como um evento chave para a ativação da via de sinalização simbiótica. Em seguida, a proteína quinase serina/treonina dependente de cálcio e calmodulina é ativada, decodificando os sinais de cálcio e resultando na fosforilação do fator de transcrição (Schiessl *et al.*, 2019), o que ativa o complexo transcricional e a via de sinalização de nodulação. Esse complexo promove a expressão da transcrição chave fator NIN (Nodule Inception), iniciando assim a rede transcricional regulada por NIN (Schiessl *et al.*, 2019; Bu *et al.*, 2020). O NIN é um dos primeiros fatores de transcrição ativados à jusante dos simbióticos comuns nas vias de sinalização (Bu *et al.*, 2020). NIN controla todos os aspectos da nodulação simbiótica em leguminosas: infecção por rizóbio, organogênese de nódulos, transição para fixação de nitrogênio e regulação do número de nódulos em leguminosas e plantas actinorrízicas (Feng *et al.*, 2021).

A quantidade de nódulos formados é variável, podendo ser um nódulo, uma dúzia ou mais de mil nódulos por planta, dependendo da espécie. Em sua grande maioria, os nódulos de leguminosas são infectados por um único rizóbio fundador (Bais *et al.*, 2006; Palmero *et al.*, 2022). A competição pela ocupação de nódulos depende de características genéticas, tanto das bactérias quanto das plantas, bem como das condições ambientais em que elas se encontram (Bais *et al.*, 2006; Pierik *et al.*, 2006). Uma vez dentro dos nódulos, a competição pode ser influenciada pela presença de múltiplas cepas de rizóbios ou até por espécies diferentes que coabitam os mesmos nódulos, ou, alternativamente, por rizóbios que habitam nódulos distintos na mesma planta. Além disso, as bactérias podem permanecer em sua forma livre no solo, fora das células vegetais, ou diferenciar-se em bacteroides fixadores de nitrogênio dentro das células vegetais" (Bais *et al.*, 2006; Pierik *et al.*, 2006).

A capacidade das bactérias endofíticas de colonizar o interior dos tecidos vegetais confere-lhes a vantagem de evitar a competição presente na rizosfera, permitindo-lhes estabelecer uma relação mais estreita com a planta (Yang *et al.*, 2022). Nesse contexto, os nódulos radiculares são considerados novos órgãos formados por células vegetais infectadas (Lohosha *et al.*, 2023).

### **Bactérias diazotróficas não simbióticas**

As bactérias não simbióticas apresentam vida livre e têm a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico sem relação simbiótica com plantas. *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus* spp., *Burkholderia*, *Klebsiella* e *Pseudomonas aeruginosa* são exemplos de bactérias não simbióticas usadas na agricultura de forma individual ou conjunta, que proporcionam maior absorção de nutrientes, crescimento das plantas, aumento na produtividade (Verna *et al.*, 2020), resistência a patógenos e proteção para as plantas causados pela salinidade do solo (Sagar *et al.*, 2020; Kusale *et al.*, 2021).

As bactérias *Enterobacter asburiae* e *Kosakonia radicincitans* apresentam funções importantes para a agricultura. A primeira é usada no controle biológico de nematoides e ácaros em lavouras, aumento da produtividade, fertilidade do solo, proteção contra diferentes estresses bióticos e sustentabilidade ambiental, e está relacionada a fixação de nitrogênio nas plantas (Verna *et al.*, 2020). A *Kosakonia radicincitans* fixa nitrogênio atmosférico, produz hormônios e solubiliza fosfato de cálcio, promovendo ao crescimento de hortaliças em estufa e condições naturais (Mertschnigg *et al.*, 2020; Costa- Gutierrez *et al.*, 2022; Qessaoui *et al.*, 2022).

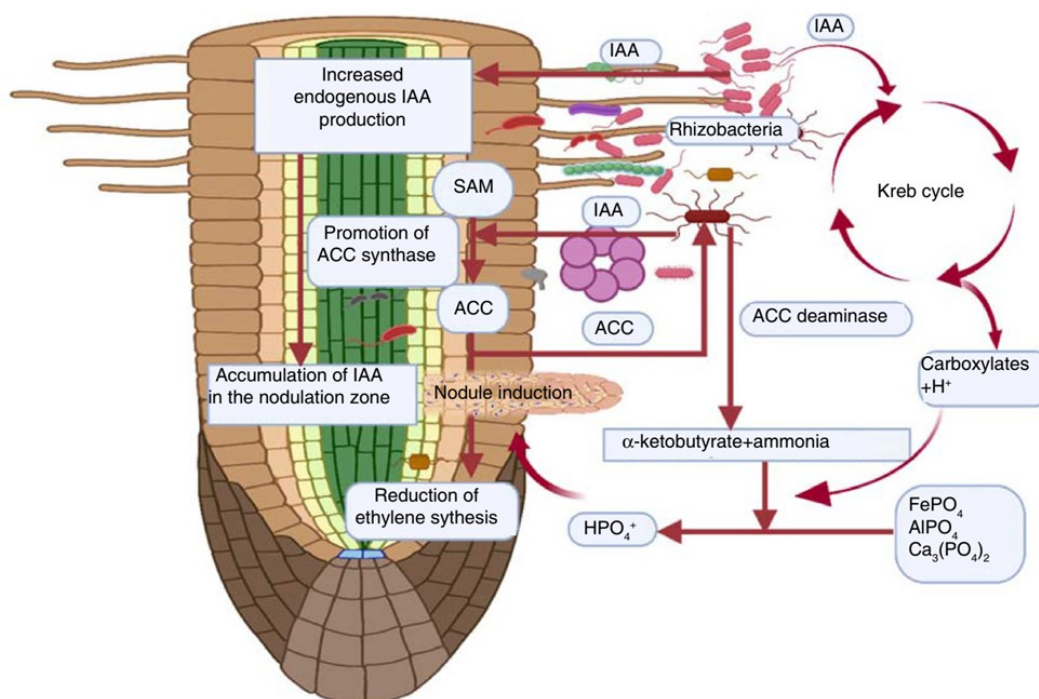
*Pseudomonas monteilii*, são conhecidas por sua capacidade de produção de sideróforos, que inibem o crescimento de patógenos (Keerthana *et al.*, 2022) e podem contribuir na promoção do crescimento de plantas por meio da melhoria da nutrição (Oliveira *et al.*, 2021; Antil *et al.*, 2022; Ibrahim *et al.*, 2021). *Pseudomonas putida* é capaz de solubilizar fosfato inorgânico, além de produzir ácido indolacético e sideróforos, reforçando seu potencial como promotor de crescimento vegetal.

Espécies como *Bacillus subtilis*, *B. mycoides* e *B. cereus*, têm capacidade promotora de crescimento vegetal, assim, já existem produtos comerciais no mercado. Por sua vez, *Bacillus cereus* contribui para o aumento do comprimento da parte aérea/raiz, biomassa fresca/seca e teor de clorofila, estimulação do crescimento de plantas, de plantas como arroz, batata, ervilha, repolho chinês, soja e trigo (López-Bellido *et al.*, 2011; Deng *et al.*, 2020; Kulkova *et al.*, 2023). Bactérias não formadoras de nódulos também podem colonizar os nódulos radiculares, contribuindo para a nodulação e crescimento das plantas. As bactérias presentes em nódulos radiculares em interação com os rizóbios mais comuns são *Agrobacterium*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Mycobacterium*, *Micromonospora*, *PaeniBacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas* (Etesami *et al.*, 2022).

As bactérias promotoras de crescimento vegetal são consideradas essenciais para o crescimento e sobrevivência de plantas leguminosas em ambientes agrícolas sob estresse abiótico, salinidade, seca, toxicidade de metais pesados e desequilíbrio nutricional (Etesami *et al.*, 2022; Shahid *et al.*, 2021). O uso de rizobactérias promotoras de crescimento também é opção de bioinsumo no cultivo de grão-de-bico (Verma *et al.*, 2020). Bactérias do gênero *Bacillus* sp. sintetizam fitormônios como ácido indolacético (AIA) (Balbinot, 2020) (Figura 3), secretam exopolissacarídeos, sideróforos e flavonoides que inibem o movimento de íons tóxicos, propiciam o equilíbrio iônico (Abd-Alla, 2019), promovem a solubilização de fósforo, aumentam a FBN e a produção de grãos.

O (AIA) é um dos principais hormônios vegetais, pertencente ao grupo das auxinas, desempenhando papel crucial na regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas. Este fitormônio é fundamental para processos como a alongação celular, formação de raízes e resposta a estímulos gravitacionais e luminosos (Alemneh *et al.*, 2020). Além disso, o AIA atua na diferenciação celular e na coordenação do desenvolvimento de órgãos, influenciando diretamente a produtividade agrícola. A compreensão dos mecanismos de ação do ácido indolacético e suas interações com outros hormônios vegetais é essencial para o aprimoramento de práticas de manejo e biotecnologia, visando o aumento da eficiência na produção agrícola e a sustentabilidade dos sistemas de cultivo.

Outra bactéria importante é o *Bradyrhizobium japonicum*, que estabelece fixação simbiótica de nitrogênio em soja. Outras espécies, como *Bradyrhizobium elkanii* e *Bradyrhizobium liaoningense* também são capazes de nodular a soja (Htwe *et al.*, 2019). *Bradyrhizobium japonicum* sintetiza ampla gama de carboidratos, incluindo lipopolissacarídeos, polissacarídeos capsulares, exopolissacarídeos, polissacarídeos de nódulos, oligossacarídeos de lipoquitina e glucanos cíclicos (Palmero *et al.*, 2022). Essa bactéria melhora efetivamente a produção, crescimento, nodulação, fixação de nitrogênio, aquisição de nitrogênio, fósforo e potássio (NPK), e rendimento de grãos na soja (Singh *et al.*, 2020).



**Figura 3:** Mecanismos gerais de redução da síntese de etileno e acúmulo de IAA na região de indução do nódulo pela ACC deaminase e IAA produzindo PGPR. ACC, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico; SAM, S-adenosilmetionina, Alemneh *et al.* (2020).

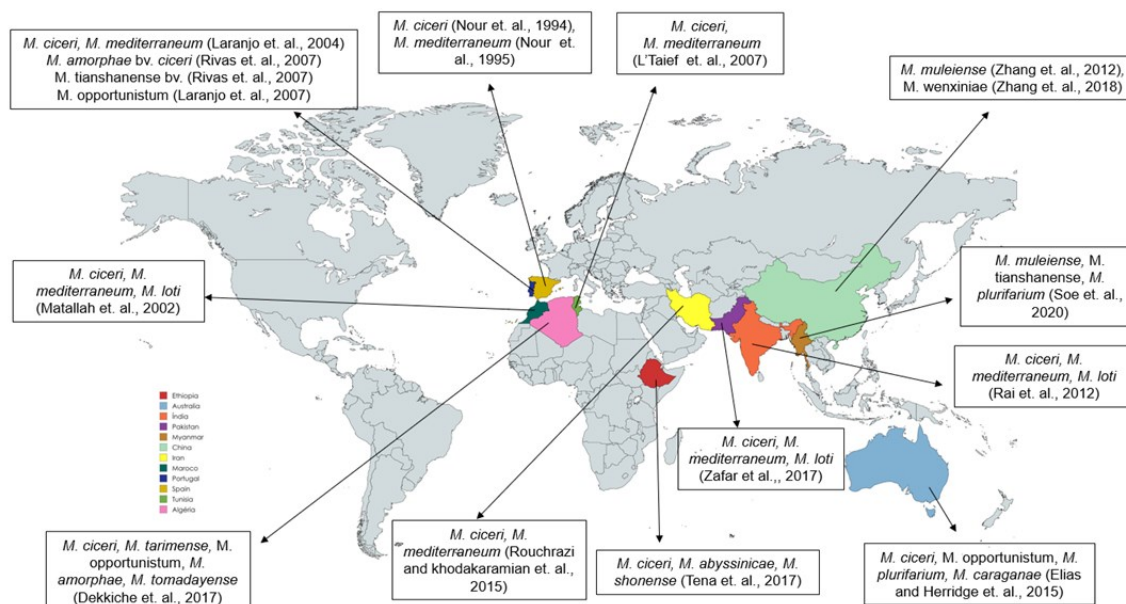
### Associações simbióticas e não simbióticas com o gênero *Cicer arietinum* L.

*Mesorhizobium* é um gênero de bactérias do solo Gram-negativas que formam associações simbióticas com leguminosas, especialmente em regiões tropicais e subtropicais. Essas bactérias induzem a formação de nódulos radiculares onde ocorre a fixação biológica do nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ), convertendo-o em formas assimiláveis pelas plantas, como amônia ( $NH_3$ ), graças à ação coordenada dos genes *nod* (sinalização) e *nif* (nitrogenase). Um estudo recente de da-Silva *et al.*, (2025) demonstrou que a superexpressão de uma proteína tipo

EnvZ em *Mesorhizobium* pode melhorar significativamente sua performance simbiótica, otimizando a nodulação e eficiência da fixação de nitrogênio. Esse avanço reforça o potencial agrônomo das *Mesorhizobium* como agentes bioinsumos, reduzindo a dependência de fertilizantes químicos em sistemas agrícolas sustentáveis.

O grão-de-bico apresenta vasta relação simbiótica com bactérias do solo pelo mundo (Figura 4), com maior diversidade de espécies de *Mesorhizobium* encontradas em países onde a inoculação é frequente e onde a inoculação com a espécie é ausente ou rara (Greenlon *et al.*, 2019). Na Austrália, a maioria das cepas isoladas estava intimamente relacionada a *M. ciceri* devido à inoculação contínua de sementes com inoculante comercial (Zaw *et al.*, 2021).

A ocorrência de *M. loti* em nódulos de grão-de-bico foi relatada na Índia (Rai *et al.*, 2012) e Marrocos (Maatallah *et al.*, 2002), no entanto, a maioria das cepas encontradas nesses países esteve relacionada a *M. ciceri* e *M. mediterraneum*. Em países com pouca incidência de inoculação, como China e Mianmar, observou-se a menor presença de rizóbio específico do grão-de-bico, e raramente simbiotes, como *M. muleiense*, *M. tianshanense* e *M. plurifarum* (Soe *et al.*, 2020). A distribuição dessas espécies de *Mesorhizobium* em solos portugueses estavam associadas a localizações geográficas, pH do solo e, ao histórico de inoculação com cepas do grupo *M. ciceri* (Alexandre *et al.*, 2009).



**Figura 4:** Distribuição de rizóbios nodulares de grão-de-bico no mundo

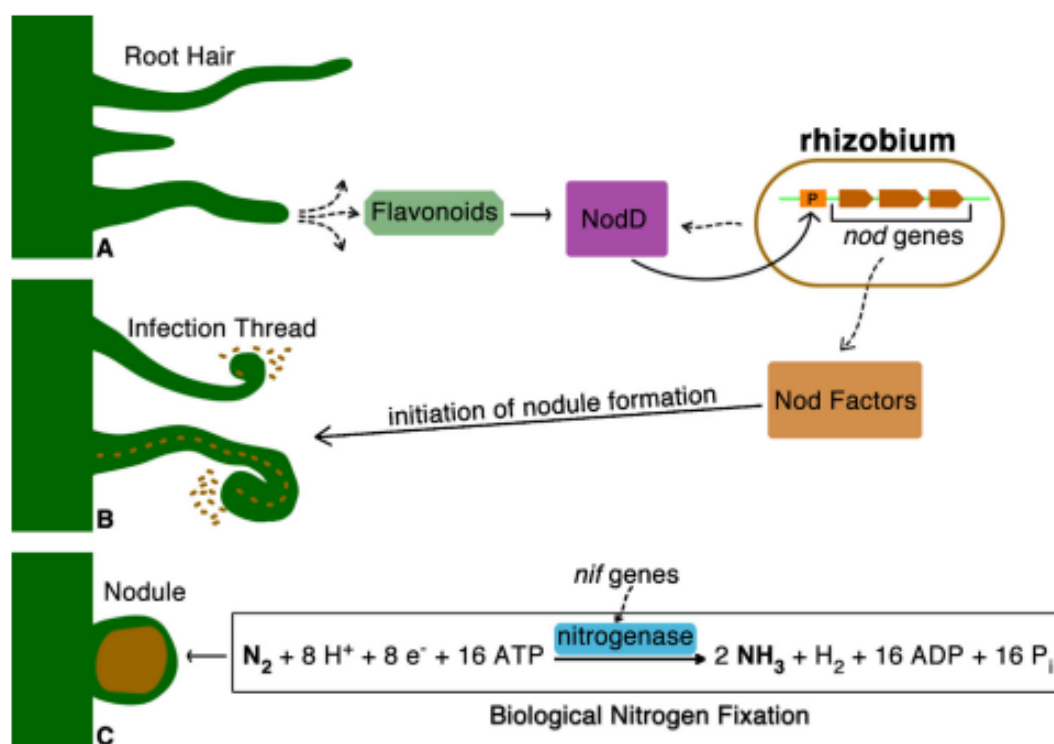
O grão-de-bico pode fixar, em média, 140 kg ha<sup>-1</sup> de N por ciclo de produção, via relação simbiótica com bactérias do gênero *Mesorhizobium*, reduzindo a necessidade do uso de

adubação nitrogenada (Ashraf *et al.*, 2023). Existe grande diversidade de rizóbios associada ao grão-de-bico, contudo até o momento, o *Mesorhizobium ciceri* tem sido descrito em isolados de nódulos radiculares da cultura do grão-de-bico (Llamas *et al.*, 2019). Espécies de *Mesorhizobium* spp. já foram encontrados em diferentes locais do mundo. A distribuição geográfica das espécies de grão-de-bico sugere que o transporte de sementes de uma região de cultivo para outra promove a migração de espécies de rizóbios (Zhang *et al.*, 2020).

*Mesorhizobium ciceri* foi qualificada como ferramenta biológica para melhorar a fisiologia, bioquímica e ação antioxidante de grão-de-bico sob estresse de fungicida (Diouf *et al.*, 2010). O desempenho de diferentes cepas de rizobactérias e aditivos orgânicos no crescimento do grão-de-bico foi avaliado e a *Mesorhizobium ciceri* foi a mais eficaz (Hill *et al.*, 2021), também possuem capacidade em biossintetizar hormônios vegetais, como citocinina, além de possuir alta atividade fixadora de nitrogênio (Guo *et al.*, 2017). A alta concentração de citocininas indica sua função na formação e funcionamento dos nódulos, pois estimulam a proliferação dos tecidos radiculares e, dessa forma, aumentam a produtividade da cultura.

Nos cultivos de grão-de-bico foram identificados vários hospedeiros dos rizóbios, indicando variabilidade de genes e especificidade na nodulação e fixação de N (Laranjo *et al.*, 2014). No gênero *Mesorhizobium*, genes de simbiose nod, nif e fix são essenciais para ocorrência de nodulação e fixação do nitrogênio, e estão localizados na região do elemento integrativo e conjugativo (ICE), material genético móvel (Zaw *et al.*, 2021). Os genes de nodulação (nod) nesse gênero são considerados altamente específico, e todos os rizóbios noduladores de grão-de-bico compartilham sequências nodC altamente semelhantes. Embora os genes de simbiose de *Mesorhizobium* spp. sejam codificados em três cromossomos, podem ser facilmente transferidos dentro ou entre espécies porque são localizados em ICEs. Assim, os genes Nod e Nif são necessários para nodulação e fixação de nitrogênio na cepa *M. ciceri* (Zaw *et al.*, 2021).

Os genes Nod são mais específicos na relação simbiótica com determinada espécie de planta, por produzirem oligossacarídeos, sintetizados e secretados pelos rizóbios em resposta à liberação de flavonóides pelas plantas hospedeiras, o gene NifH está relacionado com a enzima dinitrogenase reductase. (Shcherbakova *et al.*, 2017). O sequenciamento dos genes NifH ou NodC podem ser usados na identificação rápida de rizóbios (Figura 5).



**Figura 5:** Esquema representando o processo de simbiose entre *Rhizobium* e plantas leguminosas para fixação biológica de nitrogênio. (A) As raízes da planta liberam flavonoides no solo, que são reconhecidos pelas bactérias *Rhizobium*, ativando o gene regulador NodD, que induz a expressão dos genes nod e a produção de fatores Nod. (B) Os fatores Nod iniciam a formação do nódulo, induzindo o crescimento do fio de infecção, por onde as bactérias penetram no interior da raiz. (C) No interior dos nódulos radiculares, as bactérias diferenciam-se em bacteroides e expressam os genes nif, que codificam a enzima nitrogenase, responsável pela conversão do nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) em amônia ( $NH_3$ ), utilizando elétrons, prótons e ATP. Esse processo simbiótico permite que a planta assimile o nitrogênio em uma forma utilizável, promovendo o crescimento vegetal mesmo em solos com baixa disponibilidade de nitrogênio (Laranjo *et al.*, 2014).

A simbiose entre grão-de-bico e *M. ciceri* não ocorre isoladamente. Ela faz parte de um ecossistema complexo na rizosfera, onde diversos outros microrganismos interagem com a planta. A coinoculação com cepas eficazes de bactérias nodulantes e não-nodulantes, resulta em mudanças na diversidade microbiana da rizosfera vegetal (Tabela 1). A planta regula a diversidade genética em seu microbioma, aumentando o número de bactérias fixadoras de nitrogênio simbióticas e não-simbióticas, fazendo uma “seleção” de grupos benéficos de microrganismos em sua rizosfera (Zaw *et al.*, 2021; Shcherbakova *et al.*, 2017).

**Tabela 1.** Principais microrganismos simbiotes, solubilizadores e promotores de crescimento no grão-de-bico.

Microrganismo	Principais funções/ Resposta na planta	Referências
<i>Azospirillum brasilense</i>	Promoção do crescimento em condições de estresse hídrico, produção de hormônios, fixação de Nitrogênio.	Verna <i>et al.</i> , (2020).
<i>Azotobacter chroococcum</i>	Fixação de nitrogênio em solo, melhorando a disponibilidade de nutrientes.	Etesami <i>et al.</i> , (2022);
<i>Bacillus cereus</i>	Aumento do comprimento da planta, biomassa e teor de clorofila,	López-Bellido, <i>et al.</i> , (2011); Deng <i>et al.</i> , (2020);

	maior absorção de nutrientes, crescimento das plantas	Balbinot, 2020; Kulkova <i>et al.</i> , (2023).
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Atua como biopesticida, controlando pragas que afetam o grão-de-bico	López-Bellido, <i>et al.</i> , (2011); Deng, <i>et al.</i> , (2020); Kulkova <i>et al.</i> , (2023).
<i>Bacillus subtilis</i>	Produção de hormônios vegetais, antagonismo a patógenos, aumento da resistência a estresses, promove a resistência a patógenos e melhora a saúde do solo.	López-Bellido, <i>et al.</i> , (2011); Shah <i>et al.</i> , (2020); Deng, <i>et al.</i> , (2020); Balbinot, (2020); Kulkova, <i>et al.</i> , (2023)
<i>Enterbater asburiae</i>	Biocontrole de nematoides e ácaros em lavouras, auxilia na fixação de nitrogênio e no aumento da biomassa.	Verna <i>et al.</i> , (2020); Etesami <i>et al.</i> , (2022)
<i>Enterbater bugandensis</i>	Contribui para a nutrição mineral e a promoção do crescimento	Kumar <i>et al.</i> , (2020); Etesami, <i>et al.</i> , (2022)
<i>Klebsiella variicola</i>	Maior absorção de nutrientes, crescimento das plantas, fixação de nitrogênio e potencialização da disponibilidade de nutrientes.	Verna <i>et al.</i> , (2020); Yang, <i>et al.</i> , (2020)
<i>Kosakonia radicincitans</i>	Fixam nitrogênio atmosférico, produzem hormônios vegetais, Melhora a capacidade de absorção de água e nutrientes.	Qessaoui, <i>et al.</i> , (2022); Verna <i>et al.</i> , (2020); Mertschnigg, <i>et al.</i> , (2020); Saranraj, <i>et al.</i> , (2021); Costa- Gutierrez, <i>et al.</i> , (2022)
<i>Mesorhizobium ciceri</i>	Possui alta atividade fixadora de nitrogênio e eficiência simbiótica, aumenta a produção de biomassa seca, rendimento, pigmentos foliares e capacidade de suportar maiores concentrações de fungicidas, secreção de moduladores de crescimento de plantas.	Zhang, <i>et al.</i> , (2020); Shah <i>et al.</i> , (2021); Hill <i>et al.</i> , (2021); Guo <i>et al.</i> , (2017)
<i>Mesorhizobium mediteranio</i>	Possui alta atividade fixadora de nitrogênio e eficiência simbiótica, atua em simbiose com o grão-de-bico, promovendo a nutrição nitrogenada.	Alemneh <i>et al.</i> , (2020);
<i>Pseudomonas monteilii</i>	Inibem o crescimento de patógenos, promove a biodegradação de poluentes e melhora a fertilidade do solo.	Sagar <i>et al.</i> , (2020); Kusale <i>et al.</i> , (2021); Oliveira, <i>et al.</i> , (2021); Ibrahim, <i>et al.</i> , (2021); Antil, <i>et al.</i> , (2022); Keerthana, <i>et al.</i> , (2022);
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Aumento da absorção de nutrientes, promoção do crescimento, produz substâncias que inibem patógenos, promovendo um ambiente favorável. radicular	Sagar <i>et al.</i> , (2020); Kusale <i>et al.</i> , (2021).
<i>Pseudomonas putida</i>	Promove a biodegradação de poluentes e melhora a fertilidade do solo.	Oliveira, <i>et al.</i> , (2021); Ibrahim, <i>et al.</i> , (2021); Antil, <i>et al.</i> , (2022).

<i>Rhizobium radiobacter</i>	Aumento significativo na altura e no peso seco, produção de hormônios vegetais, participa na fixação de nitrogênio e estimula o crescimento radicular.	Etessami, <i>et al.</i> , (2022); Singh, <i>et al.</i> , 2021; Khalifa, <i>et al.</i> , 2022
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Fixação de nitrogênio, melhora da fertilidade do solo, estabelece simbiose com leguminosas, essencial para a fixação de nitrogênio.	Clemente <i>et al.</i> , (2020); Singh <i>et al.</i> , (2021).

### **Efeitos práticos da inoculação de bactérias simbióticas ou não simbióticas em *Cicer arietinum***

Alguns autores relataram efeitos positivos da inoculação isolada de bactérias simbióticas ou em associação com bactérias não simbióticas na nodulação e produção de grão-de-bico. Verma *et al.* (2013), na Índia, estudaram o efeito da inoculação do *Mesorhizobium* sp, associado ou não a bactérias solubilizadoras de fosfato *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus megaterium* e *Azotobacter chroococcum*, na nodulação, crescimento e produtividade do grão-de-bico. Esses autores observaram que a inoculação associada com todos os microrganismos aumentou o número de nódulos em 86%, comparado ao tratamento controle sem inoculação, propiciando maior fixação de N e solubilização de P, sugerindo seu uso prático na forma de bioinsumo.

Na Tunísia, Ben Romdhane (2007), avaliando o efeito de duas estipes de *M. ciceri* (nativa e comercial), observou maior competitividade do *M. ciceri* nativo em comparação ao comercial, propiciando maior nodulação (30 nódulos por plantas) e crescimento da parte aérea das três cultivares. O *Mesorhizobium* também promove redução da presença de nematoides no solo em associação a outras práticas de manejo. De acordo com Rizvi; Mahmood; Ansari (2018) a inoculação de sementes com *M. ciceri*, em associação com resíduos orgânicos (adubação) e aplicação de fungos antagônicos (*Trichoderma harzianum*), causaram a supressão do *Meloidogyne incognita* nas plantas de grão-de-bico, na Índia.

No Irã, Maleki *et al.* (2014) relataram que a inoculação de sementes com *Mesorhizobium* sp. aumentou a absorção de N pelo grão-de-bico, em comparação ao tratamento não inoculado. Segundo os autores, estes resultados foram de grande importância, já que os produtores da região utilizam o fertilizante mineral nitrogenado em excesso nos cultivos. Na Etiópia, Wolde-Meskel *et al.* (2018) observaram que os cultivos de grão-de-bico são conduzidos sem fertilização mineral, apresentando elevada variabilidade na resposta à inoculação das sementes. Os autores avaliaram doses de P (0 e 23 kg ha<sup>-1</sup>) e inoculação com

duas estirpes de *Mesorhizobium* (CP-41 e CP-19) em distintas regiões. Verificaram aumento no rendimento de grãos, quando a dose de P foi associada a inoculação com estirpes, chegando à produtividade de 3,09 t ha<sup>-1</sup>, a absorção de 94,8 kg ha<sup>-1</sup> de N, e a presença de 22 a 48 nódulos por plantas. Esses resultados reforçam a importância da inoculação de sementes com bactérias simbiotes no grão-de-bico para obtenção de produtividades acima de 1,00 t ha<sup>-1</sup>, e aumento da rentabilidade econômica dos cultivos.

Na Europa Central, Neuschwandtner; Wagentristl; Kaul (2015), estudando a viabilidade de aveia, cevada e grão-de-bico em cultivo de sequeiro, verificaram, no grão-de-bico, maior eficiência na utilização do N, rendimento de grãos e teor proteína nos grãos após a inoculação com o *M. ciceri*. As condições edáficas e práticas de manejo interferem na fixação biológica do N<sub>2</sub> nas plantas de grão-de-bico. Para o cultivo de grão-de-bico em áreas com baixa e alta fertilidade do solo, Romanya e Casals (2019) verificaram maior fixação de N<sub>2</sub> em solos com maior fertilidade e a fixação do N foi reduzida quando se usou adubos orgânicos. De acordo com Elias e Herridge (2014) em locais onde a fonte de nitrato (53 kg ha<sup>-1</sup> de N) orgânico era alta houve maior nodulação de raízes e 51% do N absorvido pelo grão-de-bico foi fixado da atmosfera, concluindo que o N derivado do solo e fixado da atmosfera complementaram a nutrição no grão-de-bico. Esses autores também observaram maior eficácia da inoculação, quando o inoculante é turfoso, e desde que a inoculação de sementes e a semeadura sejam realizados num período máximo de 24 horas.

A utilização associada de bactérias simbiotes e não simbiotes tem contribuído para produção de grão-de-bico. De acordo com Abdiev *et al.* (2019) a inoculação de *Rhizobium* e *Azotobacter* em conjunto nas sementes de duas cultivares de grão-de-bico aumentaram a nodulação (79 nódulos por planta), a produção de matéria seca da parte aérea (30%) e o teor de N nas raízes (10%), em comparação ao uso isolado de *Rhizobium* sp. Além disso, houve maior concentração de N, P e K nas folhas e raízes e redução do Na nas plantas quando as sementes foram coinoculadas. Abd-ala *et al.*, (2019) descreveram que o uso combinado de *Rhizobium*, fungos arbusculares e *Stenotrophomonas maltophilia* aumentaram a ação simbiótica em plantas de grão-de-bico, por propiciarem maior nodulação, fixação de N atmosférico e crescimento de plantas em solos salinos.

Contudo, alguns autores como Elias; Herridge (2014), na Austrália, e Wolde-meskel *et al.* (2018), na Etiópia, reportaram que pode haver baixa eficiência na fixação do N<sub>2</sub> nos plantios de grão-de-bico. Isso porque, segundo os autores os rizóbios nativos não se associavam as raízes de grão-de-bico devido à alta competição com estirpes de *Mesorhizobium* spp. e *Rhizobium* spp. introduzidas nos cultivos via inoculação de sementes. Na Austrália, foi

evidenciada a transferência horizontal de um cluster de genes móveis da cepa inoculante CC1192 de *M. ciceri* para uma população de rizóbios nativos australianos. Essa transferência modificou a eficiência da FBN da população nativa e representou contribuição fundamental para o aumento da diversidade genética das populações dos rizóbios locais (Hill *et al.*, 2021; Xavier *et al.*, 2023).

A presença de bactérias promotoras de crescimento em plantas de grão-de-bico contribui de modo diversificado para a produção de grãos, devido a adição de vários fatores de crescimento. Pandey *et al.* (2019); Xavier *et al.* (2023) e Tariq *et al.* (2023) destacaram a importância do estudo de alguns fatores para que as bactérias possam ser consideradas promotoras de crescimento em plantas. Como por exemplo, a atividade de ACC desaminase, produção de IAA, solubilização de fosfato e produção de sideróforos e amônia.

Com isso, bactérias promotoras de crescimento (*Azotobacter chroococcum*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus pumilus*) isoladas da rizosfera de plantas de grão-de-bico foram testadas *in vitro* quanto a sua produção de hormônios, solubilização de fosfato e produção de sideróforos (Pandey *et al.* 2019). Essas bactérias apresentaram potencial de degradação do ACC na faixa de 600 (*Azotobacter chroococcum*) a 1700 nmol (*Bacillus pumilus*) de  $\alpha$ -cetobutirato por mg de proteína celular por hora, exibiram a produção de ácido indol acético entre 20 e 35,34  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . O potencial de solubilização de fosfato variou entre 78 e 87,64 mg P solúvel  $\text{L}^{-1}$  com solubilização máxima exibida pelas cepas *P. aeruginosa* e *B. pumilis*. Todos os isolados promotores de crescimento exibiram sideróforos quelante de Fe e produção de amônia. As bactérias também foram testadas em cultivo com grão-de-bico por 30 dias, com maior área foliar, conteúdo de clorofila e diâmetro de caule para plantas inoculadas com as quatro bactérias, em comparação àquelas que não receberam inoculação (Pandey *et al.* 2019).

Em estudos semelhantes Tariq *et al.* (2023) no Paquistão, isolaram dezenove morfotipos bacterianos isolados dos nódulos de raízes de grão-de-bico e caracterizados *in vitro* para habilidades de promoção do crescimento da planta. Todos os isolados bacterianos foram capazes de produzir ácido indolacético em níveis variados, sendo o mais eficiente com 10,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , solubilizador de fosfato 18,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , além de todos conseguirem crescer em meio de cultura sem N, aumentar a produção de amilase, protease, lipase,  $\beta$ -1, 3-glucanase e solubilização de nutrientes como fosfato, zinco e potássio. Dentre os 19 isolados avaliados, o mais eficiente foi identificado como *Pantoea dispersa*, promovendo um aumento de 38% na produção de grãos de grão-de-bico (12,7 g por planta) e o número de nódulos (162 por planta).

O isolamento de bactérias de nódulos de raízes de grão-de-bico e a avaliação de compostos promotores de crescimento também foi tema de estudo por Mir *et al.* (2021) que identificaram nos nódulos as seguintes bactérias: *Rhizobium* sp., *Rhizobium tropici*, *Rhizobium multihospitium*, *Mesorhizobium* sp., *Burkholderia cepacia* e *Rhizobium pusense*. As linhagens bacterianas produziram IAA, NH<sub>3</sub>, sideróforo, HCN, ACC deaminase e enzimas hidrolíticas, como quitinase. Os autores concluíram o trabalho sugerindo que as bactérias associadas a nódulos de raízes e caules são promissoras para aumentar a nodulação, promoção de crescimento e produção em grão-de-bico.

A *Rhizobium radiobacter* é outra bactéria que já foi testada como bioinoculante resultando em aumento na altura e no peso seco das plantas inoculadas. Essa bactéria também pode produzir ácido indolacético, hormônio responsável pelo crescimento do sistema radicular das plantas (Singh *et al.*, 2021; Khalifa *et al.*, 2022). Hashem; Tabassum; Abd-allah (2019), em revisão bibliográfica, descreveram que espécies de *Bacillus* sp. são capazes de formar esporos de longa duração, tolerantes ao estresse e produzir metabólitos secretores que estimulam o crescimento das plantas e previnem a infecção por patógenos, além de formarem biofilmes nas raízes dos hospedeiros.

Mukherjee; Singh; Verma (2020) avaliaram microrganismos endofíticos em sementes de grão-de-bico e isolaram 29 cepas bacterianas (*Enterobacter* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp., *Pantoea* sp. e *Mixta* sp.). Os isolados produziram quantidade significativa de Indol-3-ácido acético (IAA) (*Enterobacter hormaechei* BHUJPCS-15), fosfato solubilizado, K e NH<sub>3</sub> (*Bacillus subtilis* BHUJPCS) e inibiram o crescimento do *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* (*Pseudomonas aeruginosa* BHUJPCS-7) em laboratório. Os autores destacaram o potencial desses microrganismos endofíticos como bioinsumos, por contribuírem para o aumento sustentável do rendimento agrícola e supressão de doenças. A inibição de patógenos, como *Alternaria* sp., *Fusarium oxysporum*, *Pseudomonas aphanidermatum* e *Rhizoctonia solani*, por cepas de *Bacillus* CBS127 e CBS155, também foram descritos por Sivaramaiah; Malak; Sindhu (2007).

Yadav e Verma (2014) sugeriram o uso de rizobactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus megaterium* nos cultivos de grão-de-bico, pois há promoção de crescimento das plantas e absorção de nutrientes, o que resultou em maiores rendimentos de grãos. Em cultivos com outra leguminosa, Turan e Donmez (2010) destacaram o uso de bactérias promotoras de crescimento no feijoeiro, em especial àquelas do gênero *Bacillus* sp., devido a características como síntese de hormônio de crescimento e solubilização de fosfato e aumento da absorção de N, P, K, Ca, Mn, Zn e Fe (Cakmakci, Donmez e Erdogan, 2007). A introdução de

microrganismos solubilizadores de fosfato na solução do solo facilita a transformação de fosfatos insolúveis por meio de vários mecanismos, dentre eles destaca-se a secreção de ácidos orgânicos, a produção de enzimas e a excreção de sideróforos. Contudo, as bactérias usam, principalmente, da liberação de metabólitos, como ácidos orgânicos (ácido glucônico e ácido cítrico) que reduzem o pH da solução e liberam o fosfato na forma solúvel para as plantas (Vasques *et al.*, 2024).

Elkoca, Turan e Donmez (2010) destacaram ainda a facilidade de adaptação das cepas do gênero *Bacillus* sp. às condições edafoclimáticas. Contudo, os autores observaram que quando usado em conjunto as bactérias *Rhizobium*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus megaterium* não houve aumento do rendimento de grãos ( $3.098 \text{ kg ha}^{-1}$ ), esse efeito pode ter ocorrido pela competição/interação entre as espécies nativas na rizosfera por fontes de carbono, fato esse que determina a qualidade do inoculante. Almeida Neta *et al.*, (2024) verificaram que a inoculação com o mix de *Bacillus* spp. em sementes de grão-de-bico aumentou em 26 % a massa seca de folhas, 28 % de ramos, 17 % de raízes, 24 % da parte aérea e na matéria seca total das plantas. Além de incrementos de 59 e 58 % na massa seca e número de nódulos nas raízes. O gênero *Bacillus* sp. é descrito como fixador de N atmosférico, pois possui o gene nifH (Saxena *et al.*, 2020). Esse gênero foi descrito como bactéria predominante na semente de grão-de-bico, transmitidas verticalmente com característica que promovem o crescimento da planta (Laranjeira *et al.*, 2022).

A presença de cepas de *Bacillus* spp. é considerada primordial para a produção de grão-de-bico. Isso porque o *Bacillus* spp. aumenta o crescimento do grão-de-bico, por meio de síntese de AIA, que estimulam o alongamento e divisão celular (Wani e Khan, 2010). Esses autores também observaram a síntese de sideróforos que aumentam a absorção de nutrientes pelas raízes, além do efeito inibitório nos metais tóxicos, como cromo. Mukherjee, Singh e Verma (2020) isolaram 29 cepas de bactérias do gênero *Enterobacter* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp., *Pantoea* sp. e *Mixta* sp. de sementes de grão-de-bico e reinocularam em cultivos subsequentes, destacando a maior promoção de crescimento nas plantas de grão-de-bico reinoculadas com *B. subtilis* pela solubilização de P, K e  $\text{NH}_4^+$  e inibição de *Fusarium* sp. O que sugere sua utilização como bioinoculante nos cultivos de campo com grão-de-bico.

## **Perspectivas Futuras com a inoculação de bactérias em sementes de grão-de-bico**

Diante do exposto, fica evidente que, no interior de nódulos das plantas de grão-de-bico, existem várias e novas cepas de bactérias simbiotes e não simbiotes que podem atuar em conjunto para aumentar a atividade da FBN ou promover o crescimento de plantas. Elas desempenham papéis essenciais na promoção do crescimento e desenvolvimento de plantas hospedeiras por meio de mecanismos como fixação atmosférica de nitrogênio, solubilização de fosfato, potássio e zinco, produção de sideróforos e quelatos, produção de hormônios vegetais que garantem maior tolerância a ambientes com estresse hídrico, baixa disponibilidade de nutrientes e outras condições adversas de produção.

A população bacteriana vai depender, muitas vezes, da área que a cultura está sendo estabelecida, das condições de irrigação, da fertilidade do solo e principalmente da população microbiana nativa, que pode favorecer ou dificultar o processo de simbiose. Sem levar em conta as bactérias presentes no nódulo, mas que não possuem genes de nodulação.

Nesse contexto, tornam-se necessários estudos em cada região para que tenha essa identificação das possíveis bactérias que poderão ser usadas como bioinsumo, com o objetivo de aumentar a rentabilidade e sustentabilidade do cultivo de grão-de-bico. Para isso, é importante a elaboração de estudos voltados para o desenvolvimento e aplicação desses bioinsumos regionais, destacando a utilização de bactérias com características de simbiose, promotoras de crescimento e protetoras contra possíveis patógenos.

## **Conclusões**

As bactérias diazotróficas simbióticas e não simbióticas associadas às plantas do gênero *Cicer* desempenham papéis cruciais na melhoria do crescimento das plantas, na aquisição de nutrientes e na tolerância ao estresse. Bactérias simbióticas como os rizóbios estabelecem associações fixadoras de nitrogênio com as plantas hospedeiras, enquanto os diazotróficos não simbióticos contribuem para a ciclagem e disponibilidade do nitrogênio na rizosfera. Compreender a diversidade, função e interações destas comunidades bacterianas é essencial para otimizar as práticas agrícolas, promover a produção agrícola sustentável e mitigar os desafios ambientais.

## Referências

A. Greenlon, P.L. Chang, Z.M. Damtew, A. Muleta, N. Carrasquilla-Garcia, D. Kim, H.P. Nguyen, V. Suryawanshi, C.P. Krieg, S.K. Yadav, J.S. Patel, A. Mukherjee, S. Udupa, I. Benjelloun, I. Thami-Alami, M. Yasin, B. Patil, S. Singh, B.K. Sarma, E.J.B. von Wettberg, A. Kahraman, B. Bukun, F. Assefa, K. Tesfaye, A. Fikre, D.R. Cook, Global-level population genomics reveals differential effects of geography and phylogeny on horizontal gene transfer in soil bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116 (30) 15200-15209, <https://doi.org/10.1073/pnas.1900056116> (2019).

Abd-Alla, M. H.; Nafady, N. A.; Bashandy, S. R.; Hassan, A. A. (2019) Mitigation of effect of salt stress on the nodulation, nitrogen fixation and growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.) by triple microbial inoculation. *Rhizosphere*, 10, 100148. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2019.100148>

Abdiev, A., Khaitov, B., Toderich, K., & Park, K. W. (2019). Growth, nutrient uptake and yield parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.) enhanced by *Rhizobium* and *Azotobacter* inoculations in saline soil. *Journal of Plant Nutrition*, 42, 2703-2714. <https://doi.org/10.1080/01904167.2019.1655038>

Alemneh1, A. A., Y. Zhou, M.H. Ryder., & M. D. Denton (2020) Mechanisms in plant growth-promoting rhizobacteria that enhance legume–rhizobial symbioses. *Journal of Applied Microbiology*, 129, 1133—1156. doi: 10.1111/jam.14754.

Alexandre, A., Brigido, C., Laranjo, M., Rodrigues, S., & Oliveira, S. (2009). Survey of chickpea rhizobia diversity in Portugal reveals the predominance of species distinct from *Mesorhizobium ciceri* and *Mesorhizobium mediterraneum*. *Microbial. Ecology*, 58, 930–941. doi: 10.1007/s00248-009-9536-6

Almeida Neta, M. N. A., Pegoraro, R. F., Sampaio, R. A., Costa, C. A., D. A.; Fernandes, L. A., & Ferreira, J. M. (2020). Does inoculation with *Rhizobium tropici* and nitrogen fertilization increase chickpea production? *Ciência e Agrotecnologia*, 44: e016520, 2020. <https://doi.org/10.1590/1413-7054202044016520>

Almeida Neta, M. N., Almeida, E. S. D., Costa, C. A. D., Nunes, J. A. D. R., Fernandes, L. A., & Pegoraro, R. F (2021). Inoculation of *Bacillus* spp. and nitrogen levels increase chickpea production. *Ciência e Agrotecnologia*, 2021, 45, 015421. <https://doi.org/10.1590/1413-7054202145015421>

Almeida Neta, M. N., Pegoraro, R. F., Duarte, E. R., Soares, V. A. S. F., Nunes, J. A. dos R., Sampaio, R. A., & Fernandes, L. A. (2024). Inoculation with *Bacillus* spp. combined

with nitrogen fertilization increases growth and uptake of macronutrients in chickpea. *Contribuciones a las ciencias sociales*, 17, 7055–7078. <https://doi.org/10.55905/revconv.17n.1-426>

Antil, S., Kumar, R., Pathak, D.V., Kumar, A., Panwar, A., & Kumari, A. (2022) Plant Growth-Promoting Rhizobacteria—*Bacillus cereus* KMT-5 and *B. Megaterium* KMT-8 Effectively Suppressed *Meloidogyne Javanica* Infection. *Applied Soil Ecology* 174, 104419. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2022.104419>

Ashraf, N., Ahmad, F., & Lu, Y. (2023) Synergy between Microalgae and Microbiome in Polluted Waters. *Trends Microbiol*, 31, 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.06.004>

Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., & Vivanco, J. M. (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Revist Plant Biology* 57, 234–266. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159. <https://doi.org/10.36783/18069657rbc20200043>

Balbinot, W. G., Rodrigues, S., & Botelho, G. R. (2020) Isolates of *Bacillus* sp. from garlic: effect on corn development and plant growth-promoting mechanisms. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 44:e0200043. DOI: 10.36783/18069657rbc20200043

Ben Romdhane, S.; Tajini, F.; Trabelsi, M.; Aouani, M. E.; Mhamdi, R. (2007) Competition for nodule formation between introduced strains of *Mesorhizobium ciceri* and the native populations of rhizobia nodulating chickpea (*Cicer arietinum*) in Tunisia. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 1195-1201. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9325-z>

Berg, G. (2009) Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84, 11–18. DOI 10.1007/s00253-009-2092-7

Bu, F., Rutten, L., Roswanjaya, Y. P., Kulikova, O., Rodriguez-Franco, M., & Ott, T., Bisseling, T. Zeijl, A. V., Geurts, R. (2020). Mutant analysis in the nonlegume *Parasponia andersonii* identifies NIN and NF-YA1 transcription factors as a core genetic network in nitrogen-fixing nodule symbioses. *New Phytologist*. 226, 541–554. doi: 10.1111/nph.16386

Cakmakci, R., Donmez, M. F., & Erdogan, U. (2007) The effect of plant growth promoting rhizobacteria on barley seedling growth, nutrient uptake, some soil properties, and bacterial counts. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 31, 189–199. Doi: 10.3906/tar-0701-8

Charpentier, M., Sun, J., Vaz Martins, T., Radhakrishnan, G. V., Findlay, K., Soumpourou, E. Thouin, J., Véry, A., Morris, R. Oldroyd, G. E. D. (2016). Nuclear-localized cyclic nucleotide-gated channels mediate symbiotic calcium oscillations. *Science*, 352, 1102–1105. doi: 10.1126/ science.aae 0109

Conway, G. Vernon Ruttan, and Ismail Serageldin. *The Doubly Green Revolution: Food for All in the Twenty-First Century*. Cornell University Press, 1997. <http://www.jstor.org/stable/10.7591/j.ctvtv9340>. DOI:10.1080/00139150009604857

Costa- Gutierrez, S. B., Conrado, A., Espinosa- Urgel, M., & Cristóbal, R. E. (2022). *Pseudomonas putida* and its close relatives: mixing and mastering the perfect tune for plants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106, 3351–3367. doi: 10.1007/s00253-022-11881-7.

Dal Cortivo, C., Ferrari, M., Visioli, G., Lauro, M., Fornasier, F., Barion, G., Panozzo, A., & Vamerli, T. (2020) Effects of seed-applied biofertilizers on rhizosphere biodiversity and growth of common wheat (*Triticum aestivum* L.) in the field. 2020. *Frontiers Plant Science*, 11, 72. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00072>

Deng, Z.-S., Kong, Z.-Y., Zhang, B.-C., & Zhao, L.-F. (2020). Insights into non-symbiotic plant growth promotion bacteria associated with nodules of *Sphaerophysasalsula* growing in northwestern China. *Archives of Microbiology*, 202, 399–409. doi: 10.1007/s00203-019-01752-7

Diouf, D., Fall, D., Chaintreuil, C., Ba, A. T., Dreyfus, B., Neyra, M., Ndoye & L. Moulin (2010). Phylogenetic analyses of symbiotic genes and characterization of functional traits of *Mesorhizobium* spp. strains associated with the promiscuous species *Acacia seyal* Del, *Journal of Applied Microbiology*, 108, 818–830. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04500.x

Elias, N. V.; Herridge, D. F (2014) Crop-available water and agronomic management, rather than nitrogen supply, primarily determines grain yield of commercial chickpea in northern New South Wales. *Crop and Pasture Science*, 65, 442-452. DOI:10.1071/CP13397

Elkoca, E., Kantar, F., & Sahin, F. (2010) Influence of nitrogen fixing and phosphorus solubilizing bacteria on the nodulation, plant growth, and yield of chickpea. *Journal of Plant Nutrition*, 31, 157-171. <https://doi.org/10.1080/01904160701742097>

Etesami, H. (2022) Root nodules of legumes: A suitable ecological niche for isolating nonrhizobial bacteria with biotechnological potential in agriculture. *Current Research in Biotechnology*, 4, 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2022.01.003>

FAO, 2024. FAOSTAT statistical database. Crops and livestock products. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> (accessed 11.27.24)

Feng, J., Lee, T., Schiessl, K., & Oldroyd, G. E. D. (2021). Processing of Nodule Inception controls the transition to nitrogen fixation in root nodules. *Science*, 374, 629–632. doi: 10.1126/science.abg2804. Doi: 10.1126/science.abg2804

Guo, H., Glaeser, S. P., Alabid, I., Imani, J., Haghghi, H., Kämpfer, P., & Kogel, K. H. (2017) The abundance of endofungal bacterium *Rhizobium radiobacter* (syn. *Agrobacterium tumefaciens*) increases in its fungal host *Piriformospora indica* during the tripartite Sebacinalean symbiosis with higher plants. *Frontiers Microbiology*, 13, 629. doi: 10.3389/fmicb.2017.00629.

Hill Y.; Colombi E.; Bonello E.; Haskett T.; Ramsay J, O’Hara G.; Terpolilli J. 2021. Evolution of Diverse Effective N<sub>2</sub>-Fixing Microsymbionts of *Cicer arietinum* following Horizontal Transfer of the *Mesorhizobium ciceri* CC1192 Symbiosis Integrative and Conjugative Element. *Applied Environmental Microbiology*. Vol. 87, N 5. 187:e02558-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.02558-20>

Htwe, A. Z.; Moh, S. M.; Moe, K.; Yamakawa, T. (2019) Biofertiliser production for agronomic application and evaluation of its symbiotic effectiveness in soybeans. *Agronomy*, 9, 162. <https://doi.org/10.3390/agronomy9040162>.

Ibrahim, M.S.; Ikhajiagbe, B. (2021) The Growth Response of Rice (*Oryza sativa* L. Var. FARO 44) in vitro after Inoculation with Bacterial Isolates from a Typical Ferruginous Ultisol. *Bulletin of the National Research Centre*, 45, 70. <https://doi.org/10.1186/s42269-021-00528-8>

Keerthana, U.; Prabhukarthikeyan, S. R., Baite, M.; S., Yadav, M. K.; Kumar, R. N., Kumar, A. M.; A. Muthu Kumar, S; Raghu, S. Aravindan, P.C. Rath (2022). Fluorescent Pseudomonads: a multifaceted biocontrol agent for sustainable agriculture in New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering, eds H. Singh and A. Vaishnav (New York, NY: Elseiver, 2022, Pages 83-92), 83–92. doi: 10.1016/B978-0-323-85163-3.00015-6.

Khalifa A. Y. Z.; Aldayel M. F. Isolation and characterization of *Klebsiella oxytoca* from the rhizosphere of *Lotus corniculatus* and its biostimulating features. *Brazilian Journal Biology*. 2022 Sep 30; 82p: e266395. doi: 10.1590/1519-6984.266395. PMID: 36197368.

Kulkova, I.; Dobrzyński, J.; Kowalczyk, P.; Belz’ ecki, G.; Kramkowski, K. (2023) Plant Growth Promotion Using *Bacillus cereus*. *Internacional Journal of Molecular. Science*. 24, 9759. doi: 10.3390/ijms24119759.

Kumar, H.; Ishtiyag, S.; Favas, P. J.; Varun, M.; Paul, M. S. (2023) Effect of metal resistant PGPB on the metal uptake, antioxidative defense, physiology, and growth of *Atriplex*

*lentiformis* (Torr.) S. Wats. in soil contaminated with cadmium and nickel. *Journal of Plant Growth Regulation*, 42, 3868-3887. <https://doi.org/10.1007/s00344-022-10853-5>

Kumar, P.; Pahal, V.; Gupta, A.; Vadhan, R.; Chandra, H.; Dubey, R.C. (2020) Effect of Silver Nanoparticles and *Bacillus cereus* LPR2 on the Growth of *Zea Mays*. *Scientific Reports*, 10, 20409, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77460-w>

Kusale, S. P.; Attar, Y. C.; Sayyed, R. Z.; El Enshasy, H.; Hanapi, S. Z.; Ilyas, N.; Elgorban, A.M.; Bahkali, A. H.; Marraiki, N. (2021) Inoculation of *Klebsiella variicola* Alleviated Salt Stress and Improved Growth and Nutrients in Wheat and Maize. *Agronomy*, 11, 927. <https://doi.org/10.3390/agronomy11050927>.

Kuypers, M. M. M.; Marchant, H. K.; Kartal, B. The microbial nitrogen-cycling network. *Nature Reviews Microbiology*, 16, 263–276. Doi: 10.1038/nrmicro.2018.9.

Laranjeira, S. S.; Alves, I. G.; Marques, G. (2022) Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Seeds as a Reservoir of Endophytic Plant Growth-Promoting Bacteria. *Current Microbiology*, 79, 277. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-02942-1>.

Laranjo, M.; Alexandre, A.; Oliveira, S. (2014) Legume growth-promoting rhizobia: an overview on the *Mesorhizobium* genus. *Microbiological research*, 169, 2-17. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.012>.

Llamas, A.; Leon-Miranda, E.; Tejada-Jimenez, M. (2023) Microalgal and Nitrogen-Fixing Bacterial Consortia: From Interaction to Biotechnological Potential. *Plants*, 12, 2476. <https://doi.org/10.3390/plants12132476>

Lohosha, O.V.; VorobeiYu. O.; Leonova, N.O. (2023) Symbiotic Efficiency and Cytokinin Activity of New *Mesorhizobium ciceri* Strains. *Microbiological journal*, 1, 3-11. DOI:10.15407/microbiolj85.01.003.

López-Bellido, R. J.; López-Bellido, L.; Benítez-Vega, J.; Muñoz Romero, V.; López-Bellido, F. J.; Redondo, R. (2011) Chickpea and faba bean nitrogen fixation in a Mediterranean rainfed vertisol: effect of the tillage system. *European Journal of Agronomy*, 34, 222–230. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2011.01.005>

Maatallah, J.; Berraho, E. B.; Munoz, S.; Sanjuan, J.; Lluch, C. (2002). Phenotypic and molecular characterization of chickpea rhizobia isolated from different areas of Morocco. *Journal of Applied Microbiology* 93, 531–540. doi: 10.1046/j.1365-2672.2002.01718.x.

Maleki, A.; Pournajaf, M.; Naseri, R.; Rashnavadi, R.; Heydari, M.M. (2014). The effect of supplemental irrigation, nitrogen levels and inoculation with *Rhizobium* bacteria on

seed quality of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under rainfed conditions. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 3, 902-909.

Mertschnigg, T.; Patz, S.; Becker, M.; Feierl, G.; Ruppel, S.; Bunk, B.; Spröer, Overmann, J.; Zarfel, G. (2020). First Report of *Kosakonia radicincitans* Bacteraemia from Europe (Austria) - Identification and Whole-Genome Sequencing of Strain DSM 107547. Scientific Reports, 10, 1948. doi: 10.1038/s41598-020-58689-x. PMID: 32029766; PMCID: PMC7005327.

Mir, M. I.; Kumar, B. K.; Gopalakrishnan, S.; Vadlamudi, S.; Hameeda, B. (2021). Characterization of rhizobia isolated from leguminous plants and their impact on the growth of ICCV 2 variety of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Heliyon, 7, 11. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08321>

Mukherjee, A.; Singh, B.; Verma, J. P. (2020) Aproveitamento de endófitos de sementes de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) para melhorar os atributos de crescimento das plantas e biocontrole contra *Fusarium* sp. Microbiological Research, 126469.

Neugschwandtner, R. W.; Wagentristl, H.; Kaul, H. P. (2015) Nitrogen yield and nitrogen use of chickpea compared to pea, barley and oat in Central Europe. International Journal of Plant Production, 9, 291-304. Doi: 10.22069/ijpp.2015.2049

Oldroyd, G. E. D. (2023) Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. Nature Reviews, Microbiology, pag. 11. Doi: 10.1038/nrmicro2990

Oliveira, D. A.; Ferreira, S. C.; Carrera, D. L. R.; Serrão, C. P.; Callegari, D. M.; Barros, N. L. F.; Coelho, F. M.; Souza, C. R. B. (2021). Characterization of *Pseudomonas* bacteria of *Piper tuberculatum* regarding the production of potentially bio-stimulating compounds for plant growth. Acta Amazonica, 51, 10-19. <https://doi.org/10.1590/1809-4392202002311>.

Palmero, F.; Fernandez, J. A.; Garcia, F. O.; Haro, R. J.; Prasad, P. V.; Salvagiotti, F.; Ciampitti, I. A. (2022) A quantitative review into the contributions of biological nitrogen fixation to agricultural systems by grain legumes. European Journal of Agronomy, 136, 126514. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2022.126514>

Pandey, S.; Gupta, S.; Ramawat, N. (2019). Unravelling the potential of microbes isolated from rhizospheric soil of chickpea (*Cicer arietinum*) as plant growth promoter. 3 Biotech, 9, 277. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1809-2>

Pardo-Diaz, S.; Romero-Perdomo, F.; Mendoza-Labrador, J.; Delgadillo-Duran, D.; Castro-Rincon, E.; Silva, A. M.; Rojas-Tapias, D. F.; Cardoso, E. J.; Estrada-Bonilla, G. A.

(2021) Endophytic PGPB improves Plant Growth and Quality and modulates the Bacterial Community of an Intercropping System. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 715270. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.715270>

Pegoraro, R. F.; Almeida Neta, M. N.; Costa, C. A.; Sampaio, R. A.; Fernandes, L. A.; Rodrigues, M. N. (2018) Chickpea production and soil chemical attributes after phosphorus and molybdenum fertilization. *Ciência e Agrotecnologia*, 42, 474-483. <https://doi.org/10.1590/1413-70542018425011618>

Pierik, R.; Tholen, D.; Poorter, H.; Visser, E. J. W.; Voesenek, L. A. C. J. (2006) The Janus factor of ethylene: growth inhibition and stimulation. *Trends in Plant Science*, 11, 176–183. doi: 10.1016/j.tplants.2006.02.006.

Qessaoui, R., Zanzan, M.; Ajerrar, A.; Lahmyed, H., Boumair, A.; Tahzima, R.; Bouharroud, R. (2022). Pseudomonas isolates as potential biofungicides of green mold (*Penicillium digitatum*) on orange fruit. *International Journal of Fruit Science*. 22, 142–150. <https://doi.org/10.1080/15538362.2021.2018671>

Queiroga, V. P. (2021) Grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.): Tecnologias de plantio e utilização. 1ed. / Organizadores, Queiroga, V. de P.; Girão, E. J.; Albuquerque, E. M. B. – Campina Grande: AREPB, 199 p.

Rai, R.; Dash, P. K.; Mohapatra, T.; Singh, A. (2012). Phenotypic and molecular characterization of indigenous rhizobia nodulating chickpea in India. *Indian Journal of Experimental Biology*, 50, 340–350.

Rao, D. L. N.; Balachandar, D. (2017) Nitrogen inputs from Biological Nitrogen Fixation in Indian Agriculture. In *The Indian Nitrogen Assessment. Sources of Reactive Nitrogen, Environmental and Climate Effects, Management Options, and Policies*; Abrol, Y.P., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 117–132 p. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811836-8.00008-2>.

Riaz, U.; Murtaza, G.; Qadir, A. A.; Rafi, F.; Qazi, M. A.; Javid, S.; Tauseef, M.; Shakir, M. (2021) Biofertilizers a viable tool for future organic agriculture. *Microbiota and biofertilizers*, Springer, Singapore, 329–340p. DOI:10.1007/978-3-030-61010-4\_16.

Rizvi, R.; Mahmood, I.; Ansari, S. (2018) Interaction between plant symbionts, bio-organic waste and antagonistic fungi in the management of *Meloidogyne incognita* infecting chickpea. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 17, 424-434. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2016.10.002>

Romanyà, J.; Casals, P. Biological Nitrogen Fixation Response to Soil Fertility Is Species-Dependent in Annual Legumes. *J Soil Sci Plant Nutr.* 20, 546–556 (2020). <https://doi.org/10.1007/s42729-019-00144-6>

Sagar, A.; Riyazuddin, R.; Shukla, P.K.; Ramteke, P.W.; Sayyed, R. Z. (2020) Heavy metal stress tolerance in *Enterobacter* sp. PR14 is mediated by plasmid. *Indian Journal Experimental Biology*, 58, 115–121. Doi: 10.3390/microorganisms11112708

Saranraj, P.; Sivasakthivelan, A. R. M.; Al-Tawaha, A.; Sudha, A. R. Al-Tawaha, S. N.; Sirajuddin.; Hastang (2021) Diversity and evolution of *Bradyrhizobium* communities relating to Soybean cultivation: A review. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*, 012208 doi:10.1088/1755-1315/788/1/012208

Saxena, A. K.; Kumar, M.; Chakdar, H.; Anuroopa, N.; Bagyaraj, D. J. (2020) *Bacillus* species in the soil as a natural resource for plant health and nutrition. *Journal of Applied Microbiology*, 128, 1583-1594. <https://doi.org/10.1111/jam.14506>.

Schiessl K.; Lilley J. L. S.; Lee T.; Tamvakis I.; Kohlen W.; Bailey P. C.; Thomas A.; Luptak J.; Ramakrishnan K.; Carpenter M. D.; Mysore K. S.; Wen J.; Ahnert S.; Grieneisen V. A.; Oldroyd G. E. D. NODULE INCEPTION Recruits the Lateral Root Developmental Program for Symbiotic Nodule Organogenesis in *Medicago truncatula*. *Current Biology*. 2019 Nov 4;29(21):3657-3668.e5. doi: 10.1016/j.cub.2019.09.005. Epub 2019 Sep 19. PMID: 31543454; PMCID: PMC6839406.

Shah, F.; Wu, W. (2019) Soil and Crop Management Strategies to Ensure Higher Crop Productivity within Sustainable Environments. *Sustainability*, 11, 1485. <https://doi.org/10.3390/su11051485>.

Shahid, M.; Khan, M. S.; Syed, A.; Marraiki, N.; Elgorban, A. M. (2021) *Mesorhizobium ciceri* as biological tool for improving physiological, biochemical and antioxidant state of *Cicer arietinum* (L.) under fungicide stress. *Scientific Reports*. 6, 9655. doi: 10.1038/s41598-021-89103-9. PMID: 33958646; PMCID: PMC8102606.

Shcherbakova, E. N.; Shcherbakov, A.V., Andronov, E. E. Combined pre-seed treatment with microbial inoculants and Mo nanoparticles changes composition of root exudates and rhizosphere microbiome structure of chickpea (*Cicer arietinum* L.) plants. *Symbiosis* 73, 57–69 (2017). <https://doi.org/10.1007/s13199-016-0472-1>

Shen, L.; Feng, J. (2024) NIN—at the heart of Nitrogen-fixing Nodule symbiosis. *Frontiers in Plant Science*. 14, 1284720. doi: 10.3389/fpls.2023.1284720.

Singh, N. P.; Patel, A. K.; Banjare, X.; Ashish, K.; Pandey. (2020) *Rhizobium Radiobacter*: A Unique Maize Endophyte with High Level of Stress Tolerance and Multiple Plant Growth Promoting Properties. *Plant Archives*, 20, 2483-2488.

Singh, P.; Singh, R. K.; Li, H. B.; Guo, D. J.; Sharma, A.; Lakshmanan, P.; Malviya, M. K.; Song, X. P.; Solanki, M. K.; Verma, K. K.; Yang, L. T.; Li, Y. R. (2021) Diazotrophic Bacteria *Pantoea dispersa* and *Enterobacter asburiae* Promote Sugarcane Growth by Inducing Nitrogen Uptake and Defense-Related Gene Expression. *Frontiers of Microbiology*, 11, 600417. doi: 10.3389/fmicb.2020.600417

Sivaramaiah, N.; Malik, D. K.; Sindhu, S. S. (2007) Improvement in symbiotic efficiency of chickpea (*Cicer arietinum*) by coinoculation of *Bacillus* strains with *Mesorhizobium* sp. Cicer. *Indian Journal of Microbiology*, 47, 51-56. DOI:10.1007/s12088-007-0010-1

Soe, K. M.; Htwe, A. Z.; Moe, K.; Tomomi, A.; Yamakawa, T. (2020) Diversity and effectivity of indigenous *Mesorhizobium* strains for chickpea (*Cicer arietinum* L.) in Myanmar. *Agronomy*, 10, 287. <https://doi.org/10.3390/agronomy10020287>

Stambulska, U. Y.; Bayliak, M. M. (2019). Legume-*Rhizobium* symbiosis: secondary metabolites, free radical processes, and effects of heavy metals, in *Co Evolution of Secondary Metabolites*. Eds. J.-M. Merillon and K. G. Ramawat (Cham: Springer International Publishing), 1–32p. Doi:10.1007/978-3-319-76887-8\_43-1

Tariq, M.; Hasnain, N.; Rasul, I.; Asad, M. A.; Javed, A.; Rashid, K.; Shafique, J.; Iram, W.; Hameed, A.; Zafar, M. (2023) Reconnoitering the capabilities of nodule *endophytic Pantoea dispersa* for improved nodulation and grain yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, doi: 10.1007/s11274-023-03525-

United States Department of Agriculture (USDA). United States Department of Health and Human Services. 1995. <https://www.usda.gov/>

Van Der Maesen, L. J. G. (1972) *Cicer* L., a monograph of the genus, with special reference to the chickpea (*Cicer arietinum* L.), its ecology and distribution. *Mendeligen Landbouwhoghe school Wageningen, Holanda*, 341p. <https://doi.org/10.18174/195431>

Van Der Maesen, L. J. G. (1987) Origin, history and taxonomy of chickpea. En: Saxena, M. C.; Singh, K. B. (Eds.). *The Chickpea*. CAB international, Wallingford, UK. 11-34p.

Vasques, N. C.; Nogueira, M. A.; Hungria, M. (2024). Increasing Application of Multifunctional *Bacillus* for Biocontrol of Pests and Diseases and Plant Growth Promotion: Lessons from Brazil. *Agronomy*, pag. 14. <https://doi.org/10.3390/agronomy14081654>

Verma, G.; Kumar, A., Sing, R.; Babu, S. (2020). Impact of Fertility Levels and Biofertilizers on Root Architecture, Yield and Nutrient Uptake of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Crop. *International Journal Current Microbiology Aplicativo Science*, 9, 2018-2024. DOI:10.20546/ijcmas.2020.902.230

Verma, J. P.; Yadav, J.; Tiwari, K. N.; Kumar, A. (2013) Effect of indigenous *Mesorhizobium* spp. and plant growth promoting rhizobacteria on yields and nutrients uptake of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under sustainable agriculture. *Ecological Engineering*, 51, 282-286. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2012.12.022>

Wani, P. A.; Khan, M. S. (2010) *Bacillus* species enhance growth parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in chromium stressed soils. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 3262-3267. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.08.035>

Wolde-Meskel E.; van Heerwaarden J.; Abdulkadir B.; Kassa S.; Aliyi I.; Degefu T.; Wakweya K.; Kanampiu F.; Giller KE. (2018) Additive yield response of chickpea (*Cicer arietinum* L.) to *Rhizobium* inoculation and phosphorus fertilizer across small holder farms in Ethiopia. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 261, 144-152. Doi: 10.1016/j.agee.2018.01.035

Xavier, G. R.; Jesus, E. D. C.; Dias, A.; Coelho, M. R. R.; Molina, Y. C.; Rumjanek, N. G. (2023) Contribution of biofertilizers to pulse crops: From single-strain inoculants to new technologies based on microbiomes strategies. *Plants*, 12, 954. <https://doi.org/10.3390/plants12040954>

Yadav, J.; Verma, J. P. (2014) Effect of seed inoculation with indigenous *Rhizobium* and plant growth promoting rhizobacteria on nutrients uptake and yields of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *European journal of soil biology*, 63, 70-77. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2014.05.001>

Yang, J.; Lan, L.; Jin, Y.; Yu, N.; Wang, D.; Wang E. (2022). Mechanisms underlying legume–*Rhizobium* symbioses. *International Journal of Molecular Sciences*, 64, 244–267. <https://doi.org/10.1111/jipb.13207>.

Yang, J.; Zhou, J.; Zhou, H. J.; Wang, M. M.; Liu, M. M.; Ke, Y. Z.; Li, P. F.; Li, J. N.; Du, H. (2020). Global Survey and Expressions of the Phosphate Transporter Gene Families in *Brassica napus* and Their Roles in Phosphorus Response. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 1752. <https://doi.org/10.3390/ijms21051752>

Yuan, P.; Luo, F.; Gleason, C.; Poovaiah, B. W. (2022). Calcium/calmodulin mediated microbial symbiotic interactions in plants. *Frontiers Plant Science*, pag. 13. doi: 10.3389/fpls.2022.984909

Zaw, M.; Judith R.; Rathjen, Y. Z.; Maarten, H.; Ryder, M. D.; Denton. (2021) Symbiotic effectiveness, ecological adaptation and phylogenetic diversity of chickpea rhizobia isolated from a large-scale Australian soil collection. *Plant Soil*, 469, 49–71 <https://doi.org/10.1007/s11104-021-05119-0>

Zhang, J.; Chen, W.; Shang, Y.; Guo, C.; Peng, S.; Chen, W. (2020) Biogeographic distribution of chickpea rhizobia in the world. *Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture*, Chapter 19 outline, 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818469-1.00020-1>

Zheng, M.; Zhou, Z.; Luo, Y.; Zhao, P.; Mo, J. (2019). Global pattern and controls of biological nitrogen fixation under nutrient enrichment: A meta-analysis. *Global Change Biology*, 25, 3018–3030. doi: 10.1111/gcb.14705.

Zipfel, C., & Oldroyd, G. E. (2017). Plant signalling in symbiosis and immunity. *Nature*, 543, 328–336. doi: 10.1038/nature22009.

## 3.2 Capítulo 2

### 3.2.1 Artigo 2 - Inoculação e coinoculação com bactérias promotoras do crescimento vegetal em grão-de-bico: aspectos fisiológicos e crescimento vegetal

#### RESUMO

A inoculação de plantas com bactérias promotoras de crescimento e fixadoras de nitrogênio é considerada uma alternativa eficaz para reduzir o uso de fertilizantes nitrogenados e promover o crescimento das plantas. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da inoculação e coinoculação com bactérias promotoras de crescimento nas características fisiológicas e no crescimento de plantas de grão-de-bico. Foi utilizado o delineamento em blocos casualizados com quatro repetições e oito tratamentos: inoculação com *Bradyrhizobium japonicum* (Brad), inoculação com mistura de *Bacillus megaterium* e *Bacillus subtilis* (Bac), *Azospirillum brasilense* (Azos), inoculação com mistura de *Bradyrhizobium* + *Bacillus* (Brad/Bac), *Bradyrhizobium* + coinoculação com *Azospirillum* (Brad/Azos), mistura de *Bacillus* + coinoculação com *Azospirillum* (Bac/Azos), mistura de *Bradyrhizobium* + *Bacillus* + coinoculação com *Azospirillum* (Brad/Bac/Azos) e uma testemunha não inoculada (NI), utilizando a cultivar de grão-de-bico BRS Cristalino. No pleno florescimento, foram avaliadas as características fisiológicas e as plantas foram coletadas para avaliar a massa seca e o acúmulo de nitrogênio na parte aérea, raízes, nódulos e total. Os tratamentos de inoculação/coinoculação não afetaram significativamente parâmetros fisiológicos, como concentração interna de carbono, taxa fotossintética e eficiência do uso da água em plantas de grão-de-bico. No entanto, o tratamento *Brad/Bac/Azos* aumentou a massa seca da parte aérea em 62,2%, a massa seca total em 62,6% e o teor de clorofila A em 17,9%. Inoculações com múltiplas cepas bacterianas promoveram maior desenvolvimento das plantas em comparação àquelas realizadas com cepa única. O uso combinado de *Bradyrhizobium*, *Bacillus* e *Azospirillum*, de acordo com nosso estudo foi a melhor combinação para promover o crescimento do grão-de-bico.

**Palavras-chave:** *Azospirillum*, *Cicer arietinum*, fixação biológica de nitrogênio, *Bacillus*

#### Abstract

The inoculation of plants with growth-promoting and nitrogen-fixing bacteria is considered an

effective alternative to reduce the use of nitrogen fertilizers and promote plant growth. This study aimed to evaluate the effect of inoculation and co-inoculation with growth-promoting bacteria on the physiological traits and growth of chickpea plants. A randomized block design was used with four replications and eight treatments: inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* (Brad), inoculation with a mixture of *Bacillus megaterium* and *Bacillus subtilis* (Bac), *Azospirillum brasilense* (Azos), inoculation with a mixture of *Bradyrhizobium* + *Bacillus* (Brad/Bac), *Bradyrhizobium* + co-inoculation with *Azospirillum* (Brad/Azos), mixture of *Bacillus* + co-inoculation with *Azospirillum* (Bac/Azos), mixture of *Bradyrhizobium* + *Bacillus* + co-inoculation with *Azospirillum* (Brad/Bac/Azos), and a non-inoculated control (NI), using the chickpea cultivar BRS Cristalino. At full flowering, physiological traits were evaluated, and plants were collected to assess dry mass and nitrogen accumulation in the shoots, roots, nodules, and total plant biomass. The inoculation/co-inoculation treatments did not significantly affect physiological parameters such as internal carbon concentration, photosynthetic rate, and water use efficiency in chickpea plants. However, the Brad/Bac/Azos treatment increased shoot dry mass by 62.2%, total dry mass by 62.6%, and chlorophyll A content by 17.9%. Inoculations with multiple bacterial strains promoted greater plant development compared to those with a single strain. According to our study, the combined use of *Bradyrhizobium*, *Bacillus*, and *Azospirillum* was the best combination to promote chickpea growth.

**Keywords:** *Azospirillum*, *Cicer arietinum*, biological nitrogen fixation, *Bacillus*

## INTRODUÇÃO

O uso de bioinsumos na agricultura é considerado uma alternativa viável para reduzir o consumo de fertilizantes minerais e aumentar a sustentabilidade dos sistemas agrícolas [1; 2]. Nesse contexto, certas bactérias possuem a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico (fixação biológica de nitrogênio - FBN) em simbiose com leguminosas, oferecendo uma alternativa eficaz para reduzir a necessidade de fertilizantes nitrogenados. A amônia produzida pela FBN promove o crescimento e a produtividade das plantas, ao mesmo tempo em que atenua os impactos ambientais e aumenta os níveis de nitrogênio e carbono orgânico do solo [3; 4].

Como outras leguminosas, o grão-de-bico (*Cicer arietinum*) pode formar associações ou relações simbióticas com bactérias promotoras do crescimento e fixadoras de nitrogênio [5]. No entanto, essa simbiose é tipicamente específica do gênero *Mesorhizobium*, que foi documentado em países asiáticos como Etiópia e Índia [6]. As plantas de grão-de-bico podem

acumular entre 80 a 120 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio em sua biomassa aérea por meio de associações com bactérias [7;6;8].

Outros gêneros de bactérias e fungos também são reconhecidos como rizobactérias promotoras do crescimento de plantas, capazes de solubilizar nutrientes como fósforo, auxiliando no crescimento das plantas e fornecendo proteção contra patógenos e estresses abióticos (9;10). Entre elas estão *Pseudomonas* sp. e *Erwinia* sp., que foram isoladas de raízes de grão-de-bico [11;12] e são consideradas promotoras de crescimento vegetal [13]. Essas bactérias promovem acúmulo de biomassa, solubilização de fósforo, produção de hormônios vegetais e rendimento de grãos [14;15].

*Azospirillum* e *Bradyrhizobium* também são bactérias promotoras do crescimento de plantas amplamente utilizadas em formulações comerciais de bioinsumos [13;15]. Essas bactérias melhoram a fertilidade do solo, ao fixar nitrogênio, solubilizar nutrientes e estimular a atividade microbiana benéfica e estimulam o acúmulo de biomassa, a solubilização de fósforo, a produção de hormônios vegetais e o rendimento de grãos, ao mesmo tempo em que aumentam a resistência a patógenos e estresses abióticos [9;11;13;15].

*Bradyrhizobium japonicum* estabelece simbiose com a soja, fixadora de nitrogênio. Outras espécies, como *Bradyrhizobium elkanii* e *Bradyrhizobium liaoningense*, também são capazes de nodular a soja [16]. A *Bradyrhizobium japonicum* sintetiza uma ampla gama de carboidratos, incluindo lipopolissacarídeos, polissacarídeos capsulares, exopolissacarídeos, polissacarídeos nodulares, lipocitooligossacarídeos e glucanos cíclicos [3]. Essa bactéria aumenta efetivamente a produção, o crescimento, a nodulação, a fixação de nitrogênio, a aquisição de nutrientes (N, P, K) e o rendimento de grãos da soja [6].

Um estudo conduzido em uma região tropical relatou que a inoculação com *Bacillus* sp. aumentou a biomassa seca total, o número de nódulos e o acúmulo de potássio (K) e cálcio (Ca) em plantas de grão-de-bico [17]. O gênero *Bacillus* sp. possui capacidade natural de solubilizar fosfato [18] e produz ácido indol-3-acético (AIA) e ureídeos [10], que aumentam a nodulação em leguminosas quando associados a rizóbios. Essa associação promove o crescimento radicular e a absorção de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K) e enxofre (S) [19]. A presença de populações de rizóbios compatíveis é essencial para a fixação biológica eficiente de nitrogênio. A fixação simbiótica de N<sub>2</sub> no grão-de-bico depende da distribuição e abundância de bactérias no solo entre as safras e da nodulação competitiva [20].

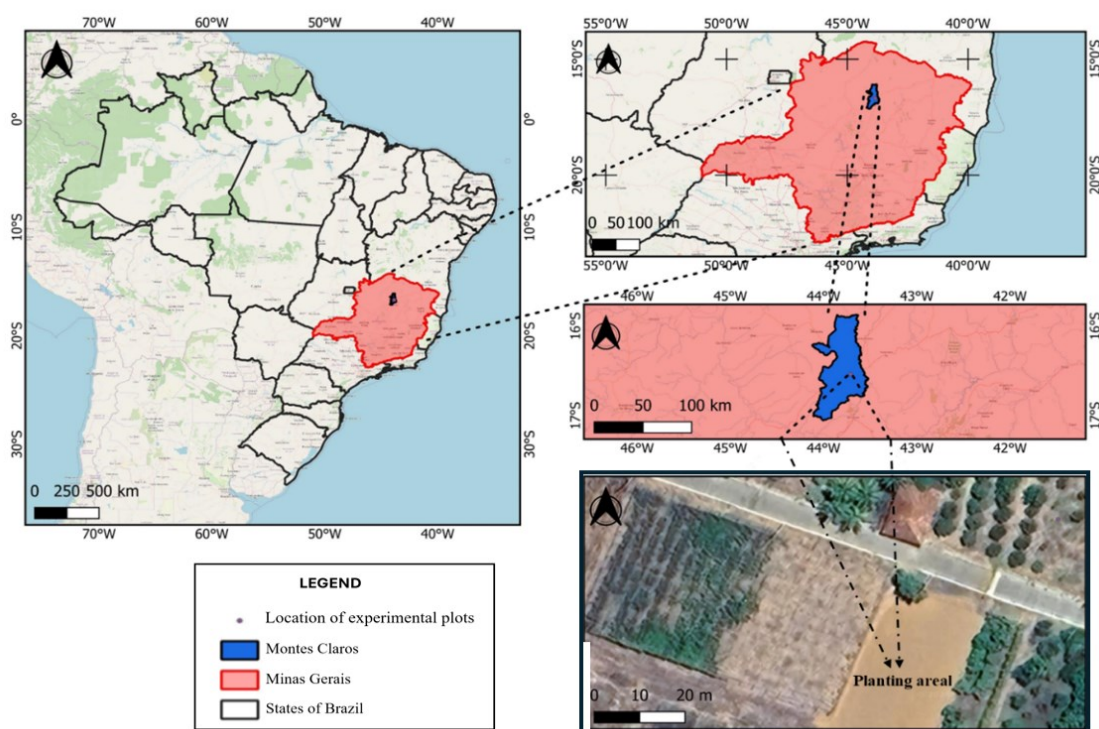
Bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio coinoculadas com bactérias promotoras de crescimento podem afetar positivamente o crescimento de plantas de interesse, o que é pouco documentado na literatura para culturas de grão-de-bico, em regiões tropicais especialmente

para linhagens microbiológicas de países tropicais. Nesse contexto, a hipótese é que a inoculação e a coinoculação com bactérias simbióticas e promotoras do crescimento vegetal aumentam o crescimento e o potencial produtivo do grão-de-bico. O objetivo deste estudo foi avaliar o crescimento e a resposta fisiológica do grão-de-bico inoculado e coinoculado com bactérias fixadoras de nitrogênio e promotoras do crescimento vegetal em região tropical.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Área de estudo e condições experimentais*

Este estudo foi conduzido em condições de campo, em área experimental da Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias, campus Montes Claros – MG, a uma altitude média de 650 metros e coordenadas geográficas  $16^{\circ}40'57,5''\text{S}$ ,  $43^{\circ}50'21,4''\text{W}$  (Figura 1). O clima da região é classificado como Aw, caracterizado por invernos secos e verões chuvosos [21]. O solo foi classificado como um Cambissolo Háplico de textura média [22].



**Figura 1.** Localização geográfica da área de estudo. Mapa mostrando a localização do Brasil, da região de Montes Claros (MG) e da área experimental da Universidade Federal de Minas Gerais – Instituto de Ciências Agrárias, campus de Montes Claros.

Antes da semeadura, amostras simples de solo foram coletadas e combinadas em uma amostra composta da camada de solo de 0–20 cm para caracterização física e química. Os seguintes

parâmetros do solo foram obtidos: pH (H<sub>2</sub> O): 5,8; P disponível (Mehlich 1, mg dm<sup>-3</sup>): 33,4 mg dm<sup>-3</sup>; P remanescente: 35,5 mg L<sup>-1</sup>; K (mg dm<sup>-3</sup>): 446,1 mg dm<sup>-3</sup>; Ca<sup>2+</sup> : 6,86 mmol dm<sup>-3</sup>; Mg<sup>2+</sup> : 1,40(cmlc dm<sup>-3</sup>); Al<sup>3+</sup> (cmolc dm<sup>-3</sup>): 0,00 ; acidez potencial (H<sup>+</sup> + Al<sup>3+</sup> ): 0,83 mmol dm<sup>-3</sup>; soma de bases (SB): 9,40 mmol dm<sup>-3</sup>; CTC efetiva (t): 9,40 mmol dm<sup>-3</sup>; saturação por alumínio (m): 0,0%; CTC em pH 7,0 (T): 10,23 mmol dm<sup>-3</sup>; saturação por bases (V): 91,93%; matéria orgânica: 2,34dag kg<sup>-1</sup>; areia grossa: 14,40dag kg<sup>-1</sup>; areia fina: 15,60dag kg<sup>-1</sup>; silte: 42,00 dag kg<sup>-1</sup>; argila: 28,00 dag kg<sup>-1</sup>.

A cultivar utilizada foi a BRS Cristalino, grão-de-bico do tipo ‘kabuli’. A semeadura foi realizada manualmente, com a distribuição de três sementes a cada 0,10 m em sulcos. Quinze dias após a emergência das plântulas, foi realizado o desbaste para o estabelecimento de dez plantas por metro linear, totalizando uma densidade final de plantas de 200.000 plantas ha<sup>-1</sup>. A adubação de base foi aplicada no sulco de plantio antes da semeadura, consistindo em 20 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio (N), fosforo (P) e potássio (K<sub>2</sub> O), utilizando ureia, super simples e cloreto de potássio, respectivamente. O grão-de-bico foi cultivado sob irrigação por microaspersão, com intervalo de irrigação de quatro dias [23]. O controle de plantas daninhas foi realizado por meio de capina com enxada, não sendo realizada nenhuma aplicação de agrotóxicos durante o cultivo.

#### *Tratamentos e Delineamento Experimental*

O experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados, com oito tratamentos mais uma testemunha (não inoculada) 8 +1, em quatro repetições. Os tratamentos experimentais foram: inoculação com *Bradyrhizobium japonicum* (*Brad*); inoculação com uma mistura de *Bacillus megaterium* e *Bacillus subtilis* (*Bac*); aplicação foliar de *Azospirillum brasilense* (*Azos*); inoculação das sementes com *Bradyrhizobium japonicum* + aplicação foliar de *Azospirillum brasilense* (*Bra/Azos*); inoculação das sementes com *Bacillus megaterium* + *Bacillus subtilis* + aplicação foliar de *Azospirillum brasilense* (*Bac/Azos*); inoculação das sementes com a mistura *Bacillus* + *Bradyrhizobium japonicum* + aplicação foliar de *Azospirillum brasilense* (*Brad/Bac/Azos*); e uma testemunha não inoculada (NI).

A inoculação das sementes com estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079 e 5080), na concentração de 5 × 10<sup>9</sup> UFC g<sup>-1</sup> (unidades formadoras de colônias), foi realizada utilizando 100 gramas de inoculante sólido à base de turfa (marca Atmo®) por 50 kg de sementes. A inoculação de *Azospirillum brasilense* foi realizada via foliar aos 15 dias após a emergência (DAE), utilizando-se a dosagem de 1,5 mL do produto comercial (5x10<sup>8</sup> UFC/mL).

Para a inoculação, com a mistura de *Bacillus* (*Bacillus megaterium* e *Bacillus subtilis*) foi aplicada às sementes antes da semeadura, utilizando-se a dosagem de 1,5 mL do produto na concentração de  $1 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>.

#### *Avaliações Fisiológicas*

As avaliações fisiológicas foram realizadas no terço médio de folhas totalmente expandidas. As medições foram efetuadas aos 40 e 70 dias após a emergência (DAE), entre 8h e 10h, sob céu claro, a fim de garantir condições ambientais homogêneas. Em cada unidade experimental, foram avaliadas a planta central.

As medições foram realizadas utilizando analisador de gases infravermelho -IRGA (modelo LCA-4, AnalyticalDevelopment Co. Ltd., Hoddesdon, Reino Unido). Foram avaliados os seguintes parâmetros: Carbono interno - CI ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ), taxa fotossintética - A ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), condutância estomática - Gs ( $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), taxa de transpiração - E ( $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). No mesmo período de avaliação, foram realizadas medições de fluorescência da clorofila utilizando fluorômetro (Y(II)) (modelo PSK, OPTI-SCIENCES, Hudson, EUA). As seguintes variáveis foram determinadas: taxa de transporte de elétrons (ETR) e Amáxima eficiência quântica do fotossistema II - (Y). É necessário informar as condições durante avaliação fisiológica. Foi usada luz artificial; luz natural, horário de avaliação.

Os índices de clorofila para clorofila A (CA), clorofila B (CB) e clorofila total (CT) também foram avaliados durante a fase de floração, utilizando clorofilômetro (modelo SPAD-502, Falker, Porto Alegre, Brazil). As medições foram realizadas em 20 folíolos por parcela, localizados no terço superior da planta.

#### *Caracterização dos Componentes de Crescimento e Determinação de Nitrogênio*

Na fase de floração (70 DAE), dez plantas por parcela foram coletadas e levadas ao laboratório para separação da parte aérea e raízes e contagem do número de nódulos (NumN) por planta. Após a separação dos componentes, estes foram secos em estufa de circulação forçada de ar a 65 °C até atingirem peso constante, a fim de obter a massa seca dos seguintes componentes: massa seca da parte aérea (MSPA); massa seca das raízes (MSR); massa seca total (MST); razão entre a raiz e a parte aérea (RPA); e massa seca dos nódulos. Após a secagem, as amostras foram moídas em moinho Wiley com peneira de 2 mm e homogeneizadas

para a determinação do teor de nitrogênio ( $\text{dag kg}^{-1}$ ) nas raízes (NR), parte aérea (NPA) e nódulos pelo método de Kjeldahl [24].

### *Análises Estatísticas*

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de agrupamento de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ). Os dados também foram submetidos à análise multivariada para identificar correlações canônicas entre os tratamentos de inoculação. A análise estatística foi realizada utilizando o software estatístico RStudio (R CORE TEAM, 2019)

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) foram observadas entre os tratamentos de inoculação e coinoculação para massa seca da raiz (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca total (MST), relação raiz-parte aérea (RPA), teor de nitrogênio da parte aérea (NPA), número de nódulos (NN) e massa fresca do nódulo (MFN) (Tabela 1). No entanto, não houve efeito significativo ( $p \geq 0,05$ ) foram encontrados para os teores nitrogênio da raiz (NR) e nitrogênio do nódulo (NN) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Características de crescimento das plantas de grão-de-bico, incluindo massa seca da raiz (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca total (MST), relação raiz-parte aérea (RPA), teor de nitrogênio nas raízes (NR), nitrogênio na parte aérea (NPA), nitrogênio nos nódulos (NN), número de nódulos (NumN), massa fresca de nódulos por planta (MFN), área de nódulos por planta (AN), após a aplicação dos seguintes tratamentos: inoculação com *Bradyrhizobium japonicum* (Brad), *Bacillus mix* (Bac), *Azospirillum brasilense* (Azos), *Bradyrhizobium japonicum* + *Bacillus mix* (Brad/Bac), *Bradyrhizobium japonicum* + *Azospirillum brasilense* (Brad/Azos), *Bacillus mix* + *Azospirillum brasilense* (Bac/Azos) e a mistura de *Bradyrhizobium japonicum* + *Bacillus mix* + *Azospirillum brasilense* (Brad/Bac/Azos), sem inoculação (NI).

Treatment	MSR*	MSPA*	MST*	RPA*	NR <sup>ns</sup>	NPA*	NN <sup>ns</sup>	NumN*	MFN*	AN <sup>ns</sup>
	-----g per plant-----				-----g kg <sup>-1</sup> -----			g por pl		cm <sup>2</sup>
NI	1.57b	15.87c	17.44c	0.10b	12.75	17.88b	23.34	23.77b	4.95b	20.62
Brad	2.18b	16.43c	18.60c	0.14a	13.13	16.02b	28.45	63.47a	6.23b	26.66
Bac	1.50b	25.68b	27.18b	0.06b	13.35	17.49b	22.29	53.20a	5.30b	25.31
Azos	1.72b	20.23c	21.96c	0.08b	14.64	20.40a	22.36	71.23a	9.50a	38.28
Brad/Bac	3.28a	24.40b	27.68b	0.13a	12.05	20.78a	20.34	59.93a	7.58a	27.58
Brad/Azos	2.73a	34.30a	37.03a	0.08b	13.36	22.03a	25.92	61.70a	8.86a	30.49
Bac/Azos	2.06b	31.79a	33.84a	0.06b	12.39	24.68a	20.45	59.80a	7.47a	25.38
Brad/Bac/Azos	2.91a	34.49a	37.40a	0.08b	16.55	24.86a	17.19	49.03a	4.88b	25.50
Mean	2.24	25.40	27.64	0.10	13.53	20.52	22.54	55.27	06.85	27.48
CV (%)	26.08	17.72	16.98	36.70	16.70	13.75	17.73	27.95	32.35	28.09

p-valor	0.03	0.01	0.01	0.03	0.17	0.01	0.06	0.01	0.04	0.14
---------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

(\* , ns) \*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ). ns – não significativo ( $p \geq 0,05$ ). CV (%): Coeficiente de variação em porcentagem. Valor de p: médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de médias ao nível de significância de 5%.

Os tratamentos de coinoculação - *Bradyrhizobium japonicum* + *Azospirillum brasilense* (Brad/Azos), *Bacillus* + *Azospirillum* (Bac/Azos) e a mistura tripla *Bradyrhizobium* + *Bacillus* + *Azospirillum* (Brad/Bac/Azos) - aumentaram a massa seca total das plantas de grão-de-bico em 77,26%, 64,24% e 62,22%, respectivamente, em comparação com o controle não inoculado (Tabela 1). Uma tendência semelhante foi observada para massa seca total, embora os tratamentos com *Azospirillum* ou *Bradyrhizobium* isoladamente não tenham diferido estatisticamente do controle não inoculado. Isso sugere que os efeitos sinérgicos das combinações bacterianas são positivos para o acúmulo de biomassa, visto que inoculações isoladas não proporcionaram benefícios significativos [35].

Para a massa seca de raiz, a coinoculação com *Bradyrhizobium* + *Bacillus*, *Bradyrhizobium* + *Azospirillum* e *Bradyrhizobium* + *Bacillus* + *Azospirillum* aumentou a massa seca de raízes em 52%, 46% e 42%, respectivamente, em comparação com o controle (Tabela 1). Esses resultados destacam o papel dessas bactérias no aumento da biomassa radicular, o que melhora a exploração do solo e o acesso aos recursos, como água e nutrientes. Estudos anteriores [17], relataram aumento da massa seca de folhas, caules, raízes e biomassa total da planta em grão-de-bico irrigado (norte de Minas Gerais, Brasil) quando inoculado com *Bacillus spp.* A presença de *Bacillus* no grão-de-bico promove a produção de fitormônios, que regulam processos fisiológicos e morfológicos, incluindo alongamento radicular, crescimento de caule e folhas e divisão celular [10, 17, 29].

A coinoculação com *Bradyrhizobium* + *Bacillus* e a inoculação apenas com *Bradyrhizobium japonicum* resultaram em maior relação raiz-parte aérea (RPA) em comparação aos demais tratamentos (Tabela 1). Isso ocorre porque esses dois tratamentos apresentaram maior massa seca de raiz e, conseqüentemente, maior RPA, indicando que um sistema radicular bem desenvolvido, melhora as condições de campo.

Em relação ao teor de nitrogênio na parte aérea (NPA), coinoculações e inoculação com *Azospirillum* proporcionaram maior acúmulo de nitrogênio (Tabela 1). Esses resultados sugerem que, quando em associação, as bactérias conseguem absorver nitrogênio em maiores quantidades e, posteriormente, convertê-lo em compostos nitrogenados para a planta, o que favorece seu crescimento. Bactérias do gênero *Bradyrhizobium* são descritas como sintetizadoras de uma ampla gama de carboidratos, incluindo lipopolissacarídeos, polissacarídeos capsulares, exopolissacarídeos, polissacarídeos nodulares,

lipocitoooligosacarídeos e glucanas cíclicas. Além disso, elas aumentam efetivamente a produção geral da planta, o crescimento, a nodulação, a fixação de nitrogênio e a aquisição de nitrogênio, fósforo e potássio (NPK), bem como a produtividade de grãos na soja, como já é conhecido no Cerrado brasileiro [37].

O uso de bactérias baseadas em rizóbios competitivos e eficientes na fixação de nitrogênio atmosférico, combinados com bactérias solubilizadoras de fósforo, pode oferecer uma alternativa viável e vantajosa aos fertilizantes químicos de N e P para uma agricultura sustentável e ecologicamente correta [37]. Os mesmos autores, observaram um aumento na massa seca da parte aérea do grão-de-bico, atribuindo-o à maior proliferação radicular induzida pelo uso de rizóbios, bactérias solubilizadoras de fósforo, ou ambos, o que promove a absorção de nutrientes e água pelas raízes do grão-de-bico.

Em relação à nodulação das plantas de grão-de-bico, observou-se que as inoculações e coinoculações resultaram em maior número de nódulos (NumN) em comparação ao tratamento não inoculado, apesar de nódulos também terem sido observados nas plantas não inoculadas (Tabela 1). Portanto, pode-se inferir que, apesar de as sementes não terem sido inoculadas com *Mesorhizobium* sp., gênero específico conhecido por seu papel na nodulação do grão-de-bico [38], a nodulação ainda ocorreu com o uso de bactérias promotoras de crescimento e fixadoras de nitrogênio.

A massa fresca de nódulos apresentou maiores pesos com a inoculação de *Azospirillum* e com a coinoculação de *Bradyrhizobium* + *Bacillus*, *Bradyrhizobium* + *Azospirillum* e *Bacillus* + *Azospirillum*, indicando a capacidade dessas bactérias de formar nódulos nas raízes do grão-de-bico, com maior massa de nódulos (Tabela 1). Filipini et al., 2021 [43], destacaram que a aplicação de *Azospirillum* brasileiro aumentou a simbiose com *Rhizobium* sp. no grão-de-bico, resultando em maior fixação biológica de nitrogênio e melhor crescimento da planta.

Embora não diferindo no número de nódulos (Tabela 1), a observação de uma maior massa fresca de nódulos atribuída a bactérias promotoras de crescimento ou fixadoras de nitrogênio difere do que alguns autores observaram na Austrália, por exemplo, [26;20]. Naquele país, a nodulação do grão-de-bico só foi possível com a transferência ambiental de uma cepa de *Mesorhizobium* (ICEMcSym1192) capaz de nodular raízes de grão-de-bico, apesar da descrição de outras cepas capazes de fixar N<sub>2</sub> atmosférico em associação com grão-de-bico [30]. Os efeitos positivos em sementes de grão-de-bico após a inoculação com *Bacillus*, já foram observados em estudos anteriores [39]. Os autores justificaram os resultados do aumento do crescimento das plantas de duas maneiras: diretamente por meio da produção de fitormônios, como ácido indolacético (AIA) e sideróforos (disponibilizando Fe para o crescimento), ou

indiretamente por meio da produção de enzimas líticas, compostos antibióticos e compostos voláteis, como cianeto de hidrogênio (HCN) e quitinase, e o controle de patógenos transmitidos pelo solo.

Diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) foram observadas entre os tratamentos de inoculação e coinoculação para as características fisiológicas como clorofila A, clorofila total, taxa de transpiração (E), condutância estomática (Gs) e taxa fotossintética (A) (Figura 2). As demais características fisiológicas não apresentaram diferenças significativas entre as inoculações e coinoculações ( $p \geq 0,05$ ).

Para a clorofila A e a clorofila total, observou-se que a coinoculação com as três bactérias (*Bradyrhizobium*, *Bacillus* e *Azospirillum*) resultou no maior índice de clorofila, diferindo dos demais tratamentos de inoculação (Figura 2). Esses três gêneros de bactérias provavelmente facilitaram uma maior aquisição de compostos nitrogenados por meio da colonização na rizosfera da planta, que foram então convertidos em clorofila, mantendo assim a atividade fotossintética da planta [40].

O teor de clorofila está relacionado ao teor de nitrogênio nas plantas, portanto, a menor eficiência no uso nutricional causada por fatores como inoculantes, fertilização nitrogenada e competição entre plantas influencia diretamente na produção e propriedades da clorofila [52]. Além disso, o aumento no teor de clorofila pode estar ligado ao maior desenvolvimento da planta, um aglomerado de membranas (tilacoides), dispostas em pilha, contendo clorofila e localizadas nos cloroplastos, sendo todos esses compostos de origem proteica, ou seja, o alto teor de nitrogênio confirma a importância da fixação biológica do nitrogênio em variáveis ligadas à clorofila como clorofila a clorofila b e clorofila total avaliadas no presente estudo [51].

O teor de clorofila total aumenta com a disponibilidade no solo, a concentração de nitrogênio na planta e sua capacidade de absorver esse elemento. O clorofilômetro indica o teor de clorofila nas plantas por meio de um índice que discrimina a clorofila a da clorofila b. Segundo alguns autores [50], leituras do clorofilômetro em capim-marandu inferiores a 26 indicam deficiência de nitrogênio, e não há estudos relacionados à deficiência de nitrogênio em grão-de-bico.

A inoculação de *B.japonicum*, *Bradyrhizobium* + *Bacillus*, *Bacillus* + *Azospirillum* e *Bradyrhizobium* + *Bacillus* + *Azospirillum* ocasionou maiores taxas transpiratórias no grão-de-bico em comparação aos demais tratamentos (Figura 2). A presença de microrganismos como *Bradyrhizobium*, *Azospirillum* e outros microrganismos que promovem o crescimento vegetal aumenta a capacidade da planta de absorver nitrogênio, o que afeta diretamente características

relacionadas à fotossíntese, como taxa de transpiração, taxa fotossintética e condutância estomática [41].

Plantas de grão-de-bico inoculadas com *B.japonicum* isoladamente apresentaram maior condutância estomática (Figura 2). O maior efeito da presença de *Bradyrhizobium japonicum* isoladamente pode estar relacionado ao aumento da capacidade de absorção de nitrogênio do grão-de-bico e à maior capacidade de produzir proteínas responsáveis pela formação do aparato fotossintético, o que promove aumento da taxa fotossintética e maior abertura dos estômatos em condições ideais de umidade e luminosidade. A condutância é proporcional ao número e tamanho dos estômatos e ao diâmetro da abertura estomática, características que dependem de outros fatores endógenos e ambientais [41].

O declínio da transpiração está associado ao fechamento dos estômatos, e variações na abertura estomática causam alterações no potencial hídrico por atuarem sobre a taxa de transpiração [42]. Assim, o funcionamento dos estômatos constitui um comprometimento fisiológico quando abertos, permitindo a assimilação de dióxido de carbono. Ao se fecharem, eles conservam água e reduzem o risco de desidratação [43]. Assim, a planta tende a fechar os estômatos quando os níveis de luz estão abaixo da radiação fotossinteticamente ativa, ou para evitar o estresse hídrico. Todos esses parâmetros estão atrelados a uma relação custo/benefício, visto que a taxa de transpiração também é um mecanismo de redução do gradiente entre a temperatura da folha e do ar. Os processos de transpiração e captura de CO<sub>2</sub> ocorrem apenas quando os estômatos estão abertos [44].

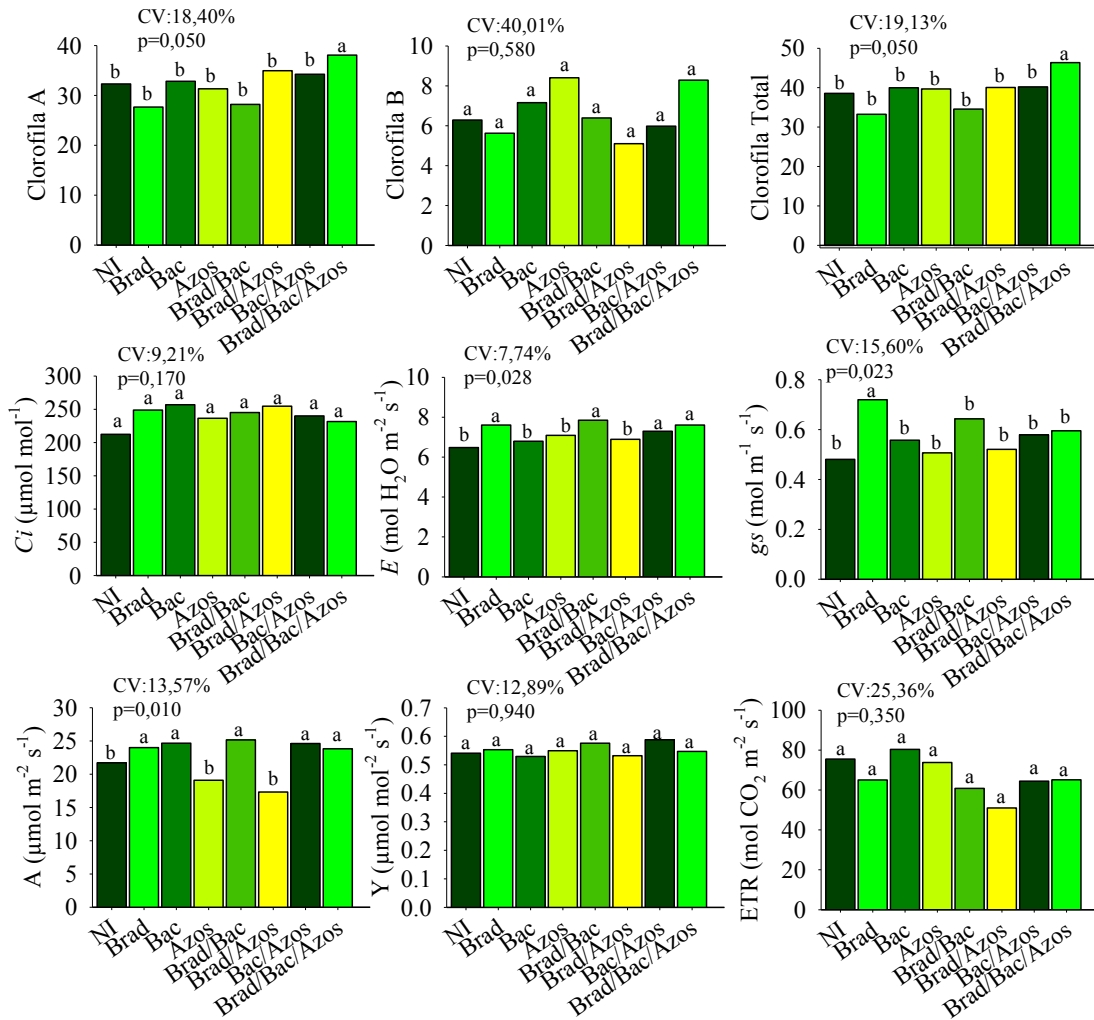
Plantas de grão-de-bico submetidas a inoculações e coinoculações com *B.japonicum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium* + *Bacillus*, *Bacillus* + *Azospirillum* e *Bradyrhizobium* + *Bacillus* + *Azospirillum* exibiram maior taxa fotossintética (A) em comparação aos outros tratamentos (Figura 2). Isso reforça o efeito positivo da coinoculação em plantas de grão-de-bico, permitindo que elas exibam maior capacidade fotossintética. No entanto, a inoculação com *Azospirillum* sozinho ou em combinação com *Bacillus* apresentou valores de A semelhantes aos do tratamento controle não inoculado (Figura 2). Estudos anteriores [45;46], obtiveram resultados positivos com a coinoculação de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* em soja e *Urochloa* sp. (capim), respectivamente.

A taxa fotossintética é essencial na determinação do potencial produtivo da planta, especialmente em plantas inoculadas com microrganismos promotores de crescimento, e pode promover efeitos na produtividade da cultura, sendo o potencial fotossintético máximo relacionado à área foliar da planta [47]. Os microrganismos podem aumentar a tolerância da planta ao déficit hídrico.

Não houve diferença significativa na máxima eficiência quântica (Y) e na taxa de transporte de elétrons (ETR) nas plantas de grão-de-bico expostas a inoculação e coinoculação (Figura 2). Essa resposta pode estar relacionada à plasticidade fisiológica da espécie, que, sob condições ideais de umidade, mantém a integridade do aparato fotossintético mesmo com menor adubação. No entanto, em casos de deficiência de nutrientes essenciais, como nitrogênio (componente de proteínas e da clorofila), fósforo (envolvido no armazenamento e transferência de energia) e potássio (atuante na ativação enzimática e controle osmótico), os valores de Y e ETR tendem a diminuir [54].

A eficiência quântica máxima está relacionada com incidência de luz, além da disposição de nutrientes no solo apresentando maior produtividade quântica do fotossistema II, fluorescência variável, quenching fotoquímico (qP) e diminuindo o quenching não fotoquímico – NPQ [55], variáveis essas que arremetem a sanidade do aparato fotossintético, dessa forma, valores mais elevados de Y indicam ausência de estresse em componentes como complexo antena coletor e cadeia de transporte de elétrons nas membranas dos tilacoídes do cloroplasto [56].

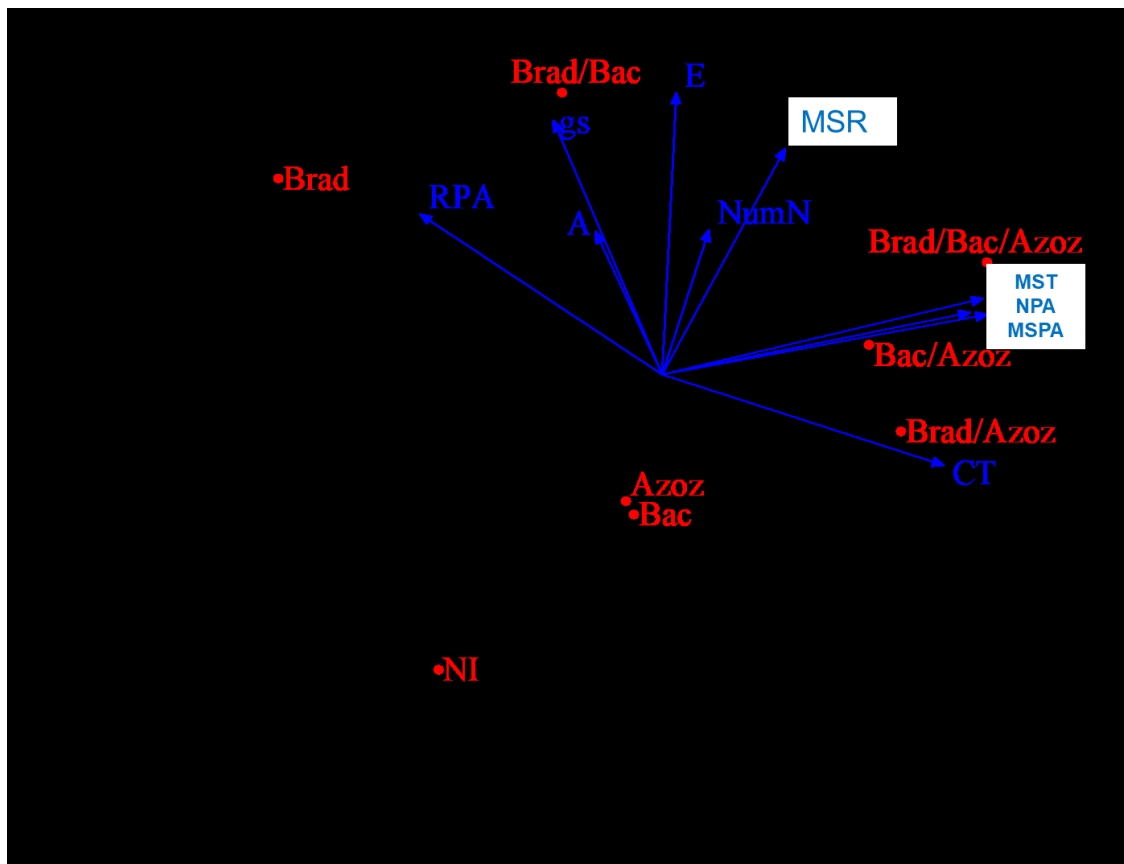
A ETR está diretamente ligada à produção de ATP, NADPH e à síntese de açúcares, e, portanto, à energia das plantas. Plantas com déficit de energia têm menores chances de se recuperarem dos sintomas de toxicidade provocados por fatores como baixa luminosidade, deficiência de nutrientes e presença de poluentes, a ETR tem relação também com a eficiência do aparato fotossintético pois essa variável estima o transporte de elétrons entre as proteínas do fotossistema II, ou seja, plantas saudáveis tendem a apresentar valores de ETR mais elevados [57].



**Figura 2.** Características fisiológicas das plantas de grão-de-bico: (CA) clorofila A, (CB) clorofila B, (CT) clorofila total, (Ci) - concentração interna de carbono ( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ), (E) - taxa de transpiração ( $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), (gs) - condutância estomática do vapor de água ( $\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-1}$ ), (A) - taxa fotossintética ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), (Y) A máxima eficiência quântica do fotossistema II, (ETR) taxa de transporte de elétrons. Após a aplicação dos seguintes tratamentos: inoculação com *Bradyrhizobium japonicum* (Brad), *Bacillus mix* (Bac), *Azospirillum brasilense* (Azos), *Bradyrhizobium japonicum* + *Bacillus mix* (Brad/Bac), *Bradyrhizobium japonicum* + *Azospirillum brasilense* (Brad/Azos), *Bacillus mix* + *Azospirillum brasilense* (Bac/Azos) e a mistura de *Bradyrhizobium japonicum* + *Bacillus mix* + *Azospirillum brasilense* (Brad/Bac/Azos), sem inoculação (NI). As barras verticais indicam o significado de cada inoculação, e as barras de erro representam o intervalo de confiança.

Para os parâmetros de crescimento e acúmulo de nitrogênio em plantas de grão-de-bico, a variável canônica 1 foi responsável por 40,51% dos dados, e a variável canônica 2 foi responsável por 33,86% (Figura 3). A inoculação e a coinoculação com a mistura *Bradyrhizobium* + *Bacillus* + *Azospirillum* tiveram a maior influência nas características de massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca total (MST) e acúmulo de nitrogênio na parte aérea (NPA) (Figura 3, tabela 1). Essas características também foram influenciadas pela coinoculação de *Bacillus* + *Azospirillum*. Em contraste, a combinação de *Azospirillum* + *Bacillus* não influenciou nenhuma das características avaliadas, semelhante ao tratamento controle (Figura 3). Este resultado indica que a combinação de *Azospirillum* e *Bacillus* não

proporciona benefícios para plantas de grão-de-bico. É provável que essas bactérias, na ausência de *Bradyrhizobium japonicum*, compitam entre si e não produzam hormônios de crescimento suficientes ou fixem nitrogênio atmosférico. Portanto, infere-se que *Bradyrhizobium japonicum*, bactéria específica para associação com soja, promoveu o crescimento e o acúmulo de nitrogênio em plantas de grão-de-bico quando em associação com bactérias do gênero *Bacillus* sp. e *Azospirillum brasilense*.



**Figura 3.** Análise de componentes principais entre crescimento, características analisadas: massa seca da raiz (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca total (MST), relação raiz-parte aérea (RPA), nitrogênio da parte aérea (NPA), número de nódulos (NumN), taxa de transpiração ( $E$ ) ( $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), ( $A$ ) - taxa fotossintética ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), Condutância estomática ao vapor de água ( $gs$ ) ( $\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-1}$ ), clorofila total (CT), após aplicação dos seguintes tratamentos: sem inoculação (NI), inoculação com *Bradyrhizobium japonicum* (Brad), *Bacillus mix* (Bac), *Azospirillum brasilense* (Azos), *Bradyrhizobium japonicum* + *Bacillus mix* (Brad/Bac), *Bradyrhizobium japonicum* + *Azospirillum brasilense* (Brad/Azoz), inoculação com *Bacillus mix* + *Azospirillum brasilense* (Bac/Azoz), *Bradyrhizobium japonicum* + *Bacillus mix* + *Azospirillum brasilense* (Brad/Bac/Azoz).

A coinoculação de microrganismos resultou em maiores aumentos no desenvolvimento do grão-de-bico em comparação à inoculação com apenas um microrganismo. Incrementos na biomassa vegetal foram observados com essa técnica de cultivo [53]. Da mesma forma, essa mistura de bactérias aumentou o teor de clorofila A nas plantas. O crescimento adequado das plantas ocorre quando elas são adequadamente nutridas, o que influencia positivamente a produção da cultura. Nesse sentido, a coinoculação tem o potencial de reduzir

os custos de produção do grão-de-bico, pois auxilia no fornecimento de nutrientes e promove o crescimento da planta. Isso é especialmente importante porque os fertilizantes químicos são os insumos que aumentam os custos de produção da cultura. Técnicas como essa, que promovem o desenvolvimento agrônomo adequado de forma sustentável e reduzem custos, são cada vez mais necessárias para garantir a segurança alimentar e, ao mesmo tempo, garantir a longevidade dos sistemas de produção.

## CONCLUSÃO

A coinoculação com bactérias simbióticas e promotoras de crescimento (*Bradyrhizobium japonicum*, *Bacillus* e *Azospirillum brasilense*) promove o desenvolvimento do grão-de-bico em condições tropicais. A inoculação com *Bradyrhizobium japonicum*, combinada com uma mistura de *Bacillus* e *Azospirillum brasilense*, aumenta a massa seca da parte aérea e a massa total das plantas de grão-de-bico.

Plantas de grão-de-bico submetidas à inoculação e coinoculação com *Bradyrhizobium japonicum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium* + *Bacillus*, *Bacillus* + *Azospirillum* e *Bradyrhizobium* + *Bacillus* + *Azospirillum* apresentaram maior taxa fotossintética, promoveram aumento das taxas transpiratórias e apresentou maiores índices de clorofila A e clorofila total.

As inoculações influenciam os parâmetros fisiológicos avaliados nas plantas. Dentre as inoculações e coinoculações, a combinação de *Bradyrhizobium*, *Bacillus* e *Azospirillum*, apresenta resultados positivos em termos de incremento de biomassa vegetal. Esses achados reforçam a importância da seleção e combinação adequada de microrganismos para otimizar o crescimento e o desenvolvimento das plantas de grão-de-bico.

## REFERÊNCIAS

1. Etesami, H., Maheshwari, D. K Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: action mechanisms and prospects. *Ecotoxicol Environ Saf* 156:225–246, 2018. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.03.013.
2. Riaz U, Murtaza G, Qadir Aa, Rafi F, Qazi Ma, Javid S, Tauseef M, Shakir M. Biofertilizers a viable tool for future organic agriculture. *Microbiota and biofertilizers*. 2021, Springer, Singapore, pp 329–340, [https://doi.org/10.1007/978-3-030-61010-4\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-030-61010-4_16)
3. Palmero, F., Fernandez, J. A., Garcia, F. O., Haro, R. J., Prasad, P. V., Salvagiotti, F., & Ciampitti, I. A. A quantitative review into the contributions of biological

nitrogen fixation to agricultural systems by grain legumes. *European Journal of Agronomy*, v. 136, p.126514, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2022.126514>

4. Romanyà, J. & P. Casals. Biological Nitrogen Fixation Response to Soil Fertility Is Species-Dependent in Annual Legumes. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* (2020) 20:546–556 <https://doi.org/10.1007/s42729-019-00144-6>

5. Padilha, K. S. M. A.; Pegoraro, R. F.; Almeida Neta, M. N.; Duarte, E. R.; Sanglard, D. A.; Fernandes, L. A.; Lemes, P. G.; Souza, C. N. Growth-promoting bacteria and symbionts in chickpea: a review. In: Nayara Guetten Ribaski. *Practices And Challenges In The Agricultural Sciences*. Curitiba: Editora Reflexão Acadêmica, 2025. p. 23-53. DOI:10.51497/reflex.978-65-84610-58-3\_2

6. Singh, P., Singh, R. K., Li, H. B., Guo, D. J., Sharma, A., Lakshmanan, P., Malviya, M. K., Song, X. P., Solanki, M. K., Verma, K. K., Yang, L. T., & Li, Y. R. (2021) Diazotrophic, Bacteria *Pantoea dispersa* and *Enterobacter asburiae* Promote Sugarcane Growth by Inducing Nitrogen Uptake and Defense-Related Gene Expression. *Frontiers of Microbiology*, 11, 600417. doi: 10.3389/fmicb.2020.600417

7. Laranjo, M.; Alexandre, A.; Oliveira, S. Legume growth-promoting rhizobia: an overview on the *Mesorhizobium* genus. *Microbiological research*. 2014, 169, 2-17. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.012>

8. Zhang, J.; Chen, W.; Shang, Y.; Guo, C.; Peng, S.; Chen, W. Biogeographic distribution of chickpea rhizobia in the world. *Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture*, Chapter 19 outline, 2020. DOI:10.1016/B978-0-12-818469-1.00020-1

9. Cao, M.; Narayanan, M.; Shi, X.; Chen, X.; Li, Z.; Ma, Y. Optimistic Contributions of Plant Growth-Promoting Bacteria for Sustainable Agriculture and Climate Stress Alleviation. *Environ. Res*, 2023, 217, 114924. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114924>

10. Vasques, N.C.; Nogueira, M.A.; Hungria, M. Increasing Application of Multifunctional *Bacillus* for Biocontrol of Pests and Diseases and Plant Growth Promotion: Lessons from Brazil. *Agronomy* 2024, 14, 1654. <https://doi.org/10.3390/agronomy14081654>

11. Almeida Neta, M. N.; Almeida, E. S. D.; Costa, C. A. D.; Nunes, J. A. D. R.; Fernandes, L. A.; Pegoraro, R. F. Inoculation of *Bacillus* spp. and nitrogen levels increase chickpea production. *Ciência e Agrotecnologia*, 2021, 45, 015421. <https://doi.org/10.1590/1413-7054202145015421>

12. Joshi, D.; Chandra, R.; Suyal, D.C.; Kumar, S. Impacts of bioinoculants *Pseudomonas jessenii* MP1 and *Rhodococcus qingshengii* S10107 on chickpea (*Cicer arietinum*

L.) yield and soil nitrogen status. *Pedosphere*, 2019, 29, 388-399. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(19\)60807-6](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(19)60807-6)

13. Rana, K. L.; Kour, D.; Kaur, T.; Devi, R.; Yadav, A. N.; Yadav, N.; Saxena, A. K. Endophytic microbes: biodiversity, plant growth-promoting mechanisms and potential applications for agricultural sustainability. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2020, 113, 1075-1107. DOI: 10.1007/s10482-020-01429-y

14. Kumar, H.; Ishtiyag, S.; Favas, P. J.; Varun, M.; Paul, M. S. Effect of metal-resistant PGPB on the metal uptake, antioxidative defense, physiology, and growth of *Atriplex lentiformis* (Torr.) S. Wats. in soil contaminated with cadmium and nickel. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2023, 42(6), 3868-3887. <https://doi.org/10.1007/s00344-022-10853-5>

15. Nagpal, S.; Sharma, P.; Sirari, A.; Kumawat, K. C.; Wati, L.; Gupta, S. C.; Mandahal, K. S. Chickpea (*Cicer arietinum* L.) as model legume for decoding the co-existence of *Pseudomonas fluorescens* and *Mesorhizobium* sp. as bio-fertilizer under diverse agro-climatic zones. *Microbiological Research*, 2021, 247, 126720. DOI: 10.1016/j.micres.2021.126720

16. Htwe, A. Z., Moh, S. M., Moe, K., & Yamakawa, T. (2019) Biofertiliser production for agronomic application and evaluation of its symbiotic effectiveness in soybeans. *Agronomy*, 9, 162. <https://doi.org/10.3390/agronomy9040162>.

17. Almeida Neta, M. N.; Pegoraro, R. F.; Duarte, E. R.; Soares, V. A. S. F.; Nunes, J. A. R. N.; Sampaio, R. A.; FERNANDES, L. A. Inoculation with *Bacillus* spp. combined with nitrogen fertilization increases growth and uptake of macronutrients in chickpea. *Revista contribuciones a las ciencias sociales*. 2024, DOI: 10.55905/revconv.17n.1-426

18. Khan, M. I. Improving Nutrient Uptake, Growth, Yield and Protein Content in Chickpea by the Co-Addition of Phosphorus Fertilizers, Organic Manures, and *Bacillus* sp. MN-54. *Agronomy*, 11:436, 2021. <https://doi.org/10.3390/agronomy11030436>

19. Verma, G., Kumar, A., Sing, R., Babu, S. (2020). Impact of Fertility Levels and Biofertilizers on Root Architecture, Yield and Nutrient Uptake of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Crop. *International Journal Current Microbiology Aplicativo Science*, 9, 2018-2024. DOI:10.20546/ijcmas.2020.902.230

20. Hill Y, Colombi E, Bonello E, Haskett T, Ramsay J, O'Hara G, Terpolilli J. 2021. Evolution of Diverse Effective N<sub>2</sub>-Fixing Microsymbionts of *Cicer arietinum* following Horizontal Transfer of the *Mesorhizobium ciceri* CC1192 Symbiosis Integrative and Conjugative Element. *Applied Environmental Microbiology*. Vol. 87, N 5. 187:e02558-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.02558-20>

21. Alvares Ca, Stape JI, Sentelhas Pc, Golçalves Jlm, Sparovek G. Koppen's climate classification map for Brazil. 2013 Meteorol Zeitschrift 22(6):711-728. DOI: 10.1127/0941-2948/2013/0507
22. Santos H. G., Jacomine P K T, Anjos L H C, Lumbreras J F, Coelho M R, Cunha T J F. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. 2018. Embrapa, Brasília, Brasil
23. Pegoraro, R.F., Almeida Neta, M.N., Costa, C.A., Sampaio, R.A., Fernandes, L.A., Rodrigues, M.N. Chickpea production and soil chemical attributes after phosphorus and molybdenum fertilization. 2018. *Ciência e Agrotecnologia* 42: 474-483. <https://doi.org/10.1590/1413-70542018425011618>
24. Tedesco Mj, Volkweiss Sj, Bohnen H (1995) Análise de solo, plantas e outros materiais. UFRGS, Porto Alegre, Brasil.
25. Vurukonda, S. S.; Vardharajula, S.; Shrivastava, M.; Skz, A. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*, v. 184, p. 13-24, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.12.003>
26. Elias, N.V., Herridge, D.F. Naturalised populations of mesorhizobia in chickpea (*Cicer arietinum* L.) cropping soils: effects on nodule occupancy and productivity of commercial chickpea. *Plant Soil* 387, 233\_249, 2014. DOI 10.1007/s11104-014-2298-z
27. Wolde-Meskel E, van Heerwaarden J, Abdulkadir B, Kassa S, Aliyi I, Degefu T, Wakweya K, Kanampiu F, Giller KE. (2018). Additive yield response of chickpea (*Cicer arietinum* L.) to *Rhizobium* inoculation and phosphorus fertilizer across small holder farms in Ethiopia. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 261, 144-152. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.01.035>
28. Tariq, M., Hasnain, N., Rasul, I., Asad, M. A., Javed, A., Rashid, K., Shafique, J., Iram, W., Hameed, A., & Zafar, M. (2023) Reconnoitering the capabilities of nodule endophytic *Pantoea dispersa* for improved nodulation and grain yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, doi: 10.1007/s11274-023-03525-
29. Laranjeira, S. S.; Alves, I. G., Marques, G. Chickpea (*Cicer arietinum*L.) Seeds as a Reservoir of Endophytic Plant Growth-Promoting Bacteria. *Current Microbiology*, 79:277, 2022. DOI: 10.1007/s00284-022-02942-1
30. Jameel, S., Hameed, A., & Shah, T. M. (2021). Investigation of distinctive morpho-physio and biochemical alterations in desi chickpea at seedling stage under irrigation, heat, and combined stress. *Frontiers in Plant Science*, 12, 692745. doi: 10.3389/fpls.2021.692745. eCollection 2021.

31. Santos, M. S.; Nogueira, M. A.; Hungria, M. Outstanding impact of *Azospirillum* brasilense strains Ab-V5 and Ab-V6 on the Brazilian agriculture: Lessons that farmers are receptive to adopt new microbial inoculants. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 45, 2021. DOI: 10.36783/18069657rbc20200128
32. Fukami, J.; Cerezini, P.; Hungria, M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *AMB Express*, v. 8, n. 73, 2018. doi: 10.1186/s13568-018-0608-1.
33. Filipini L D, Pilatti F K, Meyer E, Ventura B S, Lourenzi C R, Lovato P E. Application of *Azospirillum* on seeds and leaves, associated with *Rhizobium* inoculation, increases growth and yield of common bean. *Arch Microbiol*. 2021 Apr;203(3):1033-1038. doi: 10.1007/s00203-020-02092-7. Epub 2020 Nov 2. PMID: 33140139.
34. Agda, L. O. L. A.; Ingrid, S. S. A., V. P. Da C. N. A.; Jerri Edson Z. B.; Artenisa C. R. C. Aurenivia Bonifacio. 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 (2022) 104603. Contents lists available at ScienceDirect *Applied Soil Ecology* journal homepage: [www.elsevier.com/locate/apsoil](http://www.elsevier.com/locate/apsoil) <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2022.104603>
35. Barbosa, H. M., Alvarez, R. D. C. F., Lima, S. F. D., Cordeiro, M. A. S., Zanella, M. S., & Bernardo, V. F. (2022). *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* co-inoculation associated with cobalt and molybdenum application in the soybean crop. *Ciência Rural*, 53(7), 20210871. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20210871>
36. Abdela, A.A.; Barka, G.D.; Degefu, T. Co-inoculation effect of *Mesorhizobium ciceri* and *Pseudomonas fluorescens* on physiological and biochemical responses of Kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.) during drought stress. *Plant Physiol. Rep.* 2020, 25,359–369. <https://doi.org/10.1007/s40502-020-00511-x>
37. Benjelloun, I., Thami Alami, I., El Khadir, M., Douira, A., & Udupa, S. M. (2021). Co-inoculation of *Mesorhizobium ciceri* with either *Bacillus* sp. or *Enterobacter aerogenes* on chickpea improves growth and productivity in phosphate-deficient soils in dry areas of a Mediterranean region. *Plants*, 10(3), 571. doi: 10.3390/plants10030571.
38. Xavier, G. R., Jesus, E. D. C., Dias, A., Coelho, M. R. R., Molina, Y. C., & Rumjanek, N. G. (2023). Contribution of biofertilizers to pulse crops: From single-strain inoculants to new technologies based on microbiomes strategies. *Plants*, 12(4), 954. <https://doi.org/10.3390/plants12040954>

39. Sreevidya, M., & Gopalakrishnan, S. (2017). Direct and indirect plant growth-promoting abilities of *Bacillus* species on chickpea, isolated from compost and rhizosphere soils. *Organic agriculture*, 7, 31-40. DOI 10.1007/s13165-015-0141-3
40. Khan, M. I., Afzal, M. J., Bashir, S., Naveed, M., Anum, S., Cheema, S. A., ... & Chen, Z. (2021). Improving nutrient uptake, growth, yield and protein content in chickpea by the co-addition of phosphorus fertilizers, organic manures, and *Bacillus* sp. Mn-54. *Agronomy*, 11(3), 436. DOI: 10.3390/agronomy11030436
41. Ferreira, M. A. M ; Andrade Junior, V. C ; Oliveira, A. J. M ; Ferreira, E. A. ; Brito, O. G ; Silva, L. R . Physiological characterization of plant growth in sweet potato. *Horticultura Brasileira*, v. 37, p. 112-118, 2019. DOI:10.1590/s0102-053620190118
42. Taiz, L.; Møller, I. M.;Murphy,A. S.;Zeiger, E. Fisiologia e desenvolvimento vegetal. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888 p.
43. Concenço, G.; Ferreira, E.A.; Aspiazu, I.; Silva, A.F.; Galon, L.; Ferreira, F.A.;Silva, A. A.; Andres, A. Uso da água por plantas de arroz em competição com biótipos de *Echinochloa crusgalli* resistente e suscetível ao herbicida quinclorac. *Planta Daninha*, Viçosa, v.27, n. 2, p.249-256, 2009
44. Manabe, P.M. S.;Matos, C. C.;Ferreira, E. A.; Silva, A. A.; Sedyama,T.;Manabe,A.;Silva, A. F.; Rocha, P. R. R.;Galon,L. Características fisiológicas de feijoeiro em competição com plantas daninhas. *Bioscience Journal*, Uberlândia, v. 30, n. 6, p. 1721-1728,2014.
45. Hungria, M., Nogueira, M. A., & Araujo, R. S. (2015). Soybean seed co-inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: a new biotechnological tool to improve yield and sustainability. *American Journal of Plant Sciences*, 6(6), 811-817. DOI:10.4236/ajps.2015.66087
46. Hungria, M., Rondina, A. B. L., Nunes, A. L. P., Araujo, R. S., & Nogueira, M. A. (2021). Seed and leaf-spray inoculation of PGPR in brachiarias (*Urochloa* spp.) as an economic and environmental opportunity to improve plant growth, forage yield and nutrient status. *Plant and Soil*, 463, 171-186.
47. Long, S.P.; Marshall-Colon, A.; Zhu, X.G. Meeting the global food demand of the future by engineering crop photosynthesis and yield potential. *Cell*, v.161, p.56-66, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.019>
48. Silva, A.M.S.; Santos, M.V.; Silva, L.D *et al.*, Effects of irrigation and nitrogen fertilization rates on yield, agronomic efficiency and morphophysiology in *Tithonia*

diversifolia. *Agric. Water Manag.*, v.248, p.106782, 2021.  
<https://doi.org/10.1016/j.agwat.2021.106782>

49. Costa, G.A.; Tuffi-Santos, L.D.; Santos, S.A.D *et al.*, Efficiency of glyphosate and carfentrazone-ethyl in the control of *Macropodium atropurpureum* (Dc.) Urb. Under different light intensities. *S. Afr. J. Bot.*, v.131, p.302-309, 2020.  
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.02.028>

50. Cabral, C. E. A, Abreu, J. G., Bonfim-Silva E. M., Cabral C.H.A, Scaramuzza J. F, Silva T. J. A. (2013) Eficiência de produção e concentração de nitrogênio nos capins marandu, decumbens e convert submetidos à adubação nitrogenada. *Biosci J.* 29: 1653-1663.

51. Lopes, C. M., Paciullo, D. S. C., Araújo, S. A. C., Gomide, C. A. M., Morenz, M. J. F., Villela, S. D. J. (2017) Massa de forragem, composição morfológica e valor nutritivo de capim-braquiária submetido a níveis de sombreamento e fertilização. *Arq Bras Med Vet Zoo.*69: 225-233.

52. Viana, E. M., Kiehl, J. C. (2010) Doses de nitrogênio e potássio no crescimento do trigo. *Bragantia.* 69: 975-982. DOI:10.1590/S0006-87052010000400024

53. Pandey, S., Gupta, S., & Ramawat, N. (2019). Unravelling the potential of microbes isolated from rhizospheric soil of chickpea (*Cicer arietinum*) as plant growth promoter. *3 Biotech*, 9(7), 277. *3 Biotech* (2019) 9:277 <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1809-2>

54. Ferreira, E. A.; Pereira, G. A. M. ; Alves, D. P. ; Agazzi, L. R. A. ; Silva, D. V.; Andrade Júnior, V. C. De . Capacidades fisiológicas e produção de matéria seca de acessos de batata-doce batata-doce. *Cultura Agronomica (Unesp. Ilha Solteira)*, v. 28, p. 493-504, 2020.

55. Song, X.; Li, H. Effects of building shade on photosynthesis and chlorophyll fluorescence of *Euonymus fortunei*. *Acta Ecologica Sinica*, v. 36, n. 5, p. 350-355, 2016.  
<https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2016.05.008>

56. Hazrati, S.; Tahmasebi-Sarvestani, Z.; Modarres-Sanavy, S. A. M.; Mokhtassi-Bidgoli, A.; Nicola, S. Effects of water stress and light intensity on chlorophyll fluorescence parameters and pigments of *Aloe vera* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 106, p. 141-148, 2016. DOI: 10.1016/j.plaphy.2016.04.046

57. Saroussi S, Karns D A J, Thomas D C, Bloszies C, Fiehn O, Posewitz M C, Grossman A R. 2019. Alternative outlets for sustaining photosynthetic electron transport during dark-to-light transitions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 166, 1151811527. <https://doi.org/10.1073/pnas.1903185116>

### 3.3 Capítulo 3

3.3.1 Artigo 3 - Identificação de microrganismos promotores de crescimento e sua relação com componentes da produção de grão-de-bico em regiões tropicais

#### RESUMO

O estudo de microrganismos promotores do crescimento de plantas é crucial para o desenvolvimento de novas estratégias agrícolas que visem aumentar a produtividade e a resiliência em ambientes semiáridos, onde a escassez de água e a degradação do solo representam desafios críticos. Portanto, este estudo teve como objetivo identificar e relacionar os efeitos da inoculação de microrganismos promotores de crescimento ou nodulares em isolados de raízes de grão-de-bico cultivados em região semiárida. Análises microbiológicas e identificação bioquímica foram conduzidas para identificar os isolados. Duas cultivares de grão-de-bico, Aleppo e Cristalino, foram plantadas em casa de vegetação para avaliar os efeitos dos microrganismos identificados. As plantas foram inoculadas e cultivadas por 72 dias para avaliar as características fisiológicas e de produção. Oito espécies bacterianas foram identificadas: *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Enterobacter asburiae*, *Klebsiella variicola*, *Kosakonia radicincitans*, *Mesorhizobium* sp. 1, *Pseudomonas monteilii* e *Rhizobium radiobacter*. A cultivar Cristalino apresentou melhora significativa no comprimento da raiz, peso seco da parte aérea, número de nódulos e teor total de nitrogênio quando inoculada com *Klebsiella variicola* e *Mesorhizobium* sp. 1. A cultivar Aleppo apresentou maior massa seca da raiz, peso seco total e relação raiz-parte aérea quando inoculada com *Mesorhizobium* sp. 1 e *Bacillus cereus*. Os microrganismos encontrados neste estudo têm potencial significativo para promover o crescimento das plantas de grão-de-bico e contribuir para uma melhoria ambientalmente mais sustentável em seu desenvolvimento.

**Palavras-chave:** Bactérias associativas; Bactérias nativas; *Mesorhizobium* sp.; Nódulos de raiz; Produção sustentável

## IDENTIFICATION OF GROWTH-PROMOTING MICROORGANISMS AND THEIR RELATIONSHIP WITH CHICKPEA PRODUCTION COMPONENTS IN TROPICAL REGIONS

### ABSTRACT

The study of plant growth-promoting microorganisms is crucial for the development of new agricultural strategies aimed at increasing productivity and resilience in semiarid environments, where water scarcity and soil degradation represent critical challenges. Therefore, this study aimed to identify and evaluate the effects of inoculation with plant growth-promoting or nodulating microorganisms isolated from chickpea roots cultivated in a semiarid region. Microbiological analyses and biochemical identification were conducted to characterize the isolates. Two chickpea cultivars, Aleppo and Cristalino, were grown in a greenhouse to assess the effects of the identified microorganisms. Plants were inoculated and cultivated for 72 days to evaluate physiological and yield-related traits. Eight bacterial species were identified: *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Enterobacter asburiae*, *Klebsiella variicola*, *Kosakonia radicincitans*, *Mesorhizobium* sp. 1, *Pseudomonas monteilii*, and *Rhizobium radiobacter*. The Cristalino cultivar showed significant improvements in root length, shoot dry weight, nodule number, and total nitrogen content when inoculated with *Klebsiella variicola* and *Mesorhizobium* sp. 1. The Aleppo cultivar exhibited higher root dry mass, total dry weight, and root-to-shoot ratio when inoculated with *Mesorhizobium* sp. 1 and *Bacillus cereus*. The microorganisms identified in this study demonstrate significant potential to promote chickpea plant growth and contribute to a more environmentally sustainable crop development.

**Keywords:** Associative bacteria; *Mesorhizobium* sp.; Native bacteria; Root nodules; Sustainable production.

### INTRODUÇÃO

O grão-de-bico é uma leguminosa de grande importância global, e suas sementes são fontes de proteínas e vitaminas (Gunnabo *et al.*, 2020; Hussain *et al.*, 2020). É uma leguminosa tradicionalmente cultivada na Índia, o país com maior produção e consumo dessa leguminosa (FAO, 2022; Nagtal *et al.*, 2020; Gul *et al.*, 2022). O grão-de-bico, assim como outras leguminosas, apresenta forte associação com bactérias fixadoras de nitrogênio (Laranjo *et al.*,

2014) e forma associações com organismos promotores de crescimento (Almeida Neta *et al.*, 2021). O grão-de-bico apresenta a capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN) por meio da simbiose com rizóbios, o que contribui para seu cultivo em solos pobres em nutrientes e reduz os custos associados à fertilização (Romanyá *et al.*, 2019; Bosse *et al.*, 2021).

A simbiose do grão-de-bico é descrita como restritiva às espécies *Mesorhizobium ciceri* e *Mesorhizobium mediterraneum* (Laranjo *et al.*, 2014; Armas-capote *et al.*, 2014). No entanto, outras espécies de bactérias do gênero *Mesorhizobium* sp. foram descritas em simbiose com o hospedeiro grão-de-bico. Isso se deve à transferência horizontal dos genes simbióticos *nifH* e *nodC* entre as linhagens, onde podem ser levados através de sementes cultivadas em outros locais (Tena *et al.*, 2014; Elias *et al.*, 2014; Gunnabo *et al.*, 2020 Padilha *et al.*, 2025).

Outros gêneros de bactérias são conhecidos na agricultura como promotores de crescimento, pois aumentam a fertilidade do solo, o crescimento das plantas e fornecem proteção contra patógenos ou estresses abióticos (Cao *et al.*, 2023; Racioppo *et al.*, 2023). Entre eles, estão *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. e *Erwinia* sp., que já foram isolados de raízes de grão-de-bico (Verma *et al.*, 2020; Khan *et al.*, 2021; Benjelloun *et al.*, 2021). São considerados bactérias promotoras de crescimento e bioinsumos (Gunnabo *et al.*, 2020; Rana *et al.*, 2020), pois promovem o crescimento da biomassa, a solubilização do fósforo, a produção de fitormônios e o rendimento de grãos (Nagpal *et al.*, 2021; Kumar *et al.*, 2023).

O uso de bioinsumos tem se destacado como uma alternativa viável para a produção agrícola sustentável devido ao seu baixo custo e toxicidade ambiental (Riaz *et al.*, 2021). Esses produtos consistem em microrganismos promotores do crescimento vegetal que contribuem para o melhor desenvolvimento das plantas e o controle de doenças, aumentando assim a produtividade das culturas de forma ecologicamente correta (Pardo-Dias *et al.*, 2021; Dal Cortivo *et al.*, 2022). No Brasil, a identificação de rizóbios em simbiose ou associados ao grão-de-bico ainda é pouco estudada. Em Mianmar, cepas nativas de *Mesorhizobium* sp. foram observadas em simbiose com grão-de-bico (Zhang *et al.*, 2023; Padilha *et al.*, 2025), descritas como bactérias noduladoras em grão-de-bico, com importância para a produção de inoculantes para a cultura e para o rendimento econômico. Da mesma forma, na Austrália, um estudo descreveu a identificação de cepas nativas em simbiose com grão-de-bico (Elias *et al.*, 2014).

Diversas técnicas são utilizadas para identificar esses microrganismos promotores do crescimento de plantas, entre elas a MALDI-TOF, que utiliza uma abordagem sistêmica de Espectrometria de Massas (EM), como ferramentas promissoras para a caracterização de bactérias (Dieckmann *et al.*, 2008), fungos (Valentine *et al.*, 2002), vírus (Colquhoun *et al.*, 2006) e até mesmo nematoides (Perera *et al.*, 2005). Esse sistema emprega diferentes estratégias

proteômicas para a análise direta de proteínas intactas, identificando microrganismos para determinar um espectro único para cada proteína (Torres-Sangiao *et al.*, 2021).

Outros métodos são comumente utilizados para a identificação e classificação desses microrganismos, como o sequenciamento do gene 16S rRNA e a eletroforese em gel (Sandrin *et al.*, 2013; Mojumbar *et al.*, 2022). No entanto, são caros, demorados e trabalhosos. A técnica MALDI-TOF é uma excelente ferramenta para a identificação e caracterização de microrganismos e tem sido mais amplamente utilizada do que o sequenciamento dos genes 16S e 18S rRNA (Havlicek *et al.*, 2013; Dingle *et al.*, 2013).

Considerando o exposto, fica clara a importância da identificação e caracterização de bactérias nativas do solo que interagem com o grão-de-bico cultivado em regiões tropicais. Isso é importante para a obtenção de informações para o desenvolvimento de inoculantes ou para a compreensão da ação da bactéria nas plantas. Portanto, este estudo teve como objetivo identificar e relatar os efeitos da inoculação de bactérias promotores de crescimento ou noduladores em isolados de raízes de grão-de-bico cultivados em região semiárida e relatar os efeitos da inoculação no crescimento da cultura.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

A pesquisa consistiu em dois experimentos. No primeiro, foram recolhidos nódulos de raízes de grão-de-bico e analisados para identificar microrganismos nativos promotores do crescimento das plantas da área experimental. No segundo, foi formulado um inoculante utilizando os microrganismos identificados que mostraram potencial para promover o crescimento e o desenvolvimento das plantas, e foi aplicado em duas cultivares de grão-de-bico Kabuli.

### *Área de estudo e condições experimentais*

O estudo foi conduzido na área experimental da Universidade Federal de Minas Gerais, no Instituto de Ciências Agrárias, campus Montes Claros – MG, no período de junho a setembro de 2022. A área de coleta possuía histórico de cultivo anual de grão-de-bico há seis anos, onde já tinham sido observados nódulos nas raízes desta cultura. As parcelas foram demarcadas com as dimensões de 2 x 1m, contendo quatro linhas de cultura com um espaçamento de 0,50 x 0,10m entre linhas e plantas, respectivamente. Para as avaliações foram selecionadas dez plantas localizadas na área central (1,0 m<sup>2</sup>) em 32 parcelas.

O solo da área foi classificado como Cambissolo Háplico de textura média (Alves *et al.*, 2013). Vinte dias antes da implantação da cultura, foram recolhidas amostras de solo na camada de 0-20 cm de profundidade para caracterização química. Os resultados são os seguintes: pH (H<sub>2</sub>O): 5,8; P disponível (Mehlich 1, mg dm<sup>-3</sup>): 33,4 mg dm<sup>-3</sup>; P remanescente: 35,5 mg L<sup>-1</sup>; K (mg dm<sup>-3</sup>): 446,1 mg dm<sup>-3</sup>; Ca<sup>2+</sup> : 6,86 mmol dm<sup>-3</sup>; Mg<sup>2+</sup> : 1,40 (cmolc dm<sup>-3</sup>); Al<sup>3+</sup> (cmolc dm<sup>-3</sup>): 0,00 ; acidez potencial (H<sup>+</sup> + Al<sup>3+</sup> ): 0,83 mmol dm<sup>-3</sup>; soma de bases (SB): 9,40 mmol dm<sup>-3</sup>; CTC efetiva (t): 9,40 mmol dm<sup>3</sup>; saturação por alumínio (m): 0,0%; CTC em pH 7,0 (T): 10,23 mmol dm<sup>3</sup>; saturação por bases (V): 91,93%; matéria orgânica: 2,34 dag kg<sup>-1</sup>; areia grossa: 14,40 dag kg<sup>-1</sup>; areia fina: 15,60 dag kg<sup>-1</sup>; silte: 42,00 dag kg<sup>-1</sup>; argila: 28,00 dag kg<sup>-1</sup>.

A cultivar de grão-de-bico utilizada foi a BRS Cristalino, de grãos do tipo *kabuli*, crescimento semiereto e adaptabilidade ao semiárido mineiro. A semeadura foi realizada manualmente, diretamente nos sulcos de plantio. A fertilização de sementeira foi realizada no sulco abaixo das sementes com 20 kg ha<sup>-1</sup> de N e K<sub>2</sub>O sob a forma de ureia e cloreto de potássio, respectivamente e P na forma de super simples (Pegoraro, *et al.*, 2018; Almeida Neta, *et al.*, (2020). Adotou-se o sistema de irrigação por microaspersão com esquema de rega de quatro em quatro dias. O controle de plantas daninhas foi realizado manualmente, utilizando enxada e as pragas foram retiradas da área manualmente por catação.

#### *Separação de nódulos radiculares*

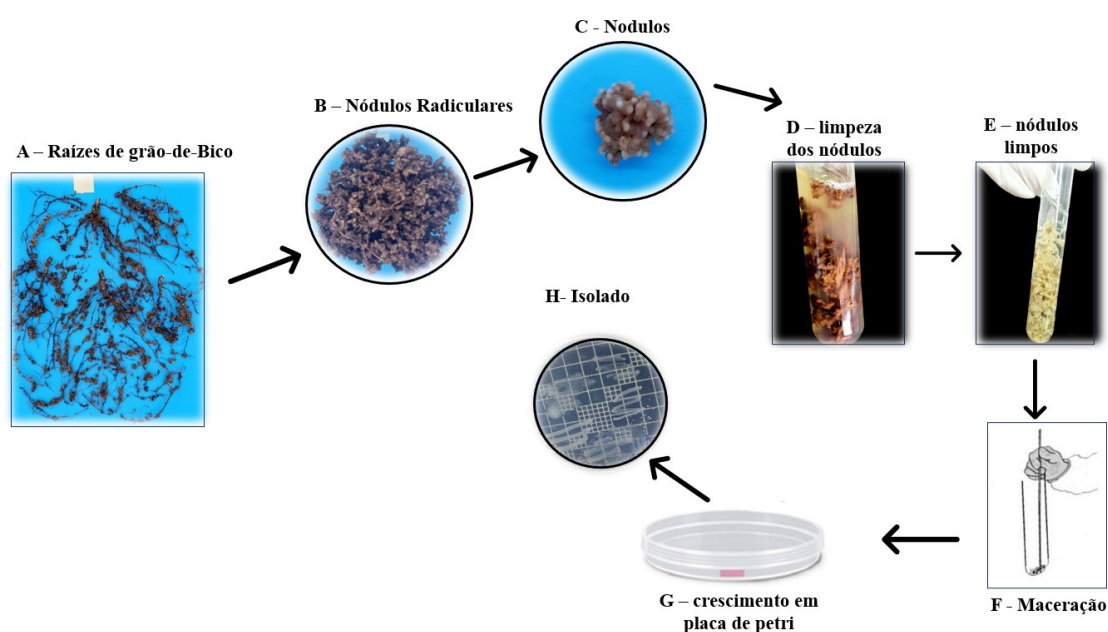
As plantas foram colhidas 70 dias após o plantio, durante o estágio de plena floração, período que corresponde ao pico de atividade nodular. Para a coleta, demarcou-se ao redor de cada planta uma área com raio de aproximadamente 20 cm, correspondente à zona radicular. Escavou-se até cerca de 50 cm de profundidade e, com o auxílio de uma pá, a planta foi removida cuidadosamente para minimizar a perda de raízes e nódulos. Em seguida, separou-se a parte aérea do sistema radicular.

O excesso de solo foi removido das raízes, mergulhando-as em recipientes com água, seguido de lavagem com jato d'água de torneira sobre peneira com malha de 2,0 mm até a completa limpeza. Em seguida, os nódulos radiculares foram removidos para análise microbiológica. A parte aérea foi separada e seca em estufa a 65 °C para determinação da massa seca e do teor de nitrogênio. As raízes foram colocadas em estufa a 65 °C para obtenção da massa seca.

### Obtenção de isolados bacterianos

Os nódulos foram destacados, lavados com água destilada autoclavada e desinfetados por imersão em etanol a 95% por 25 segundos, seguida de imersão em hipoclorito de sódio (NaClO) a 3% por 1 minuto. Em seguida, foram lavados cinco vezes com água destilada estéril. Após a assepsia, os nódulos foram macerados, e a suspensão obtida foi diluída até  $10^{-6}$  em solução salina contendo 0,85 g de NaCl em 100 mL de água destilada (Dionisio *et al.*, 2016).

Os microrganismos foram inoculados em meio de cultura YMA (Manitol:  $10,0 \text{ (g L}^{-1}\text{)}$ ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ :  $0,5 \text{ (g L}^{-1}\text{)}$ ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ :  $0,2 \text{ (g L}^{-1}\text{)}$ ; NaCl:  $0,1 \text{ (g L}^{-1}\text{)}$ ; Extrato de levedura:  $0,5 \text{ (g L}^{-1}\text{)}$ ;  $15,0 \text{ (g L}^{-1}\text{)}$ ; Água destilada q.b.p.: 1 (L); bromotimol:  $5 \text{ mL L}^{-1}$ ; pH:6,8) a  $28^\circ\text{C}$  (Yano *et al.*, 1993). Após a incubação, foram observados diariamente até 7 dias ou até o crescimento microbiano para contagem de colônias (Figura 1).



**Figura 1:** Processo de limpeza de nódulos radiculares para análise microbiológica: (A) Raízes de grão-de-bico (B) Nódulos radiculares, (C) Nódulos separados, (D) Limpeza de nódulos, (E) Nódulos limpos, (F) Maceração de nódulos, (G, H) Análise microbiológica.

As colônias formadas foram avaliadas visualmente quanto ao tempo de crescimento, diâmetro, aspecto, forma e coloração no meio de cultura. Após 24 horas de incubação, contaram-se as unidades formadoras de colônias (UFCs). As colônias selecionadas foram submetidas à coloração de Gram (Figura 1). Após o isolamento em meio puro, repetiu-se o teste de Gram nas colônias cultivadas por até 24 horas em placas de Petri. O procedimento foi

realizado em lâminas de vidro limpas com álcool etílico e previamente identificadas de acordo com o microrganismo, conforme o protocolo descrito por Yano *et al.*, (1993).

#### *Análise de espectrometria de massa de desorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS)*

Os isolados bacterianos foram purificados e analisados após 24 horas de crescimento em meio YMA com azul de bromotimol, cultivado em placas de Petri. A identificação foi realizada por espectrometria de massas MALDI-ToF, utilizando o software MALDI-Biotyper v2.0 (Farfour *et al.*, 2012), no Laboratório de Diagnóstico de Doenças de Animais Aquáticos da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), campus Belo Horizonte, MG.

#### *Preparação do Inoculante e plantio em Estufa*

Após a identificação e purificação das bactérias, conduziu-se um experimento em delineamento de blocos ao acaso, com esquema fatorial  $2 \times 10$ . O primeiro fator correspondeu a duas cultivares de grão-de-bico do tipo kabuli (BRS Aleppo e BRS Cristalino). O segundo fator consistiu em dez tratamentos de inoculação de sementes com os seguintes microrganismos: (1) *Bacillus cereus*, (2) *Bacillus mycoides*, (3) *Enterobacter asburiae*, (4) *Klebsiella variicola*, (5) *Kosakonia radicincitans*, (6) *Mesorhizobium* sp. 1, (7) *Pseudomonas monteilii*, (8) *Rhizobium radiobacter*, (9) Mix 1 (*B. cereus*, *K. variicola*, *R. radiobacter*, *Mesorhizobium* sp. 1) e (10) Mix 2 (*B. cereus*, *K. variicola*, *R. radiobacter*).

Para produzir os inoculantes, os microrganismos foram cultivados em 50 mL de caldo estéril Brain Heart Infusion (BHI) (37g de meio por 1L de água destilada) e incubados por 48 horas. As culturas foram então diluídas para atingir uma concentração uniforme de microrganismos de  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>. Cada semente de grão-de-bico foi inoculada com 10 µL da solução inoculante. Cinco sementes de grão-de-bico foram plantadas em vasos contendo 0,5 L de substrato comercial autoclavado, e duas plantas por vaso foram mantidas após a germinação.

O grão-de-bico foi cultivado por 70 dias em casa de vegetação, aplicando-se 100 mL de solução de Hoagland (sem nitrogênio adicionado) quatro vezes por semana. As plantas também foram irrigadas com água destilada, conforme necessário.

### *Caracterização dos Componentes de Produção e Determinação do Teor de Nitrogênio*

As plantas coletadas foram levadas ao laboratório para a separação das partes aérea e radicular para análise das seguintes características: MSPA (massa seca da parte aérea); MST (massa seca total); NR (nitrogênio na raiz); NS (nitrogênio na parte aérea); NN (nitrogênio no nódulo); NunN (número de nódulos). Após a separação dos componentes, as partes foram secas em estufa com circulação forçada de ar a 65 °C até atingir peso constante para obtenção da massa seca. Amostras de plantas foram moídas em moinho Wiley com peneira de malha de 2 mm e o teor de nitrogênio foi determinado pelo método de Kjeldahl (Bremner *et al.*, 1965).

### *Análises estatísticas*

Como os dados não apresentaram normalidade, optou-se por realizar uma análise descritiva. Os dados foram estudados por meio da análise de correlação de Pearson, utilizando o software estatístico R (R Core Team, 2020) e Análise Multivariada. Adicionalmente, foi realizada análise de cluster (dendrogramas) utilizando o Método de Pares e Grupos Não Ponderados com Média Aritmética (UPGMA) e a métrica da distância euclidiana (não padronizada). Foram realizadas análises de ACP e de cluster utilizando as variáveis de crescimento das plantas e os microrganismos encontrados neste estudo.

## **RESULTADOS**

### *Isolados bacterianos*

Foram encontrados nódulos radiculares nas plantas em toda a área cultivada. A caracterização visual dos nódulos indicou uma grande variedade em termos de tamanho e forma (Figura 2). As análises microbiológicas permitiram a caracterização das bactérias com base na sua morfologia, distinguindo-as pelo tamanho, forma e disposição (Tabela 1). Estas análises facilitaram o isolamento e a identificação das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs), com a morfologia das bactérias (Tabela 1).



**Figura 2:** Raízes de grão-de-bico com nódulos radiculares (A). Nódulos radiculares separados da raiz, indicando variedade em tamanho e forma (B, C). Nódulos radiculares seccionados (D, E).

Através do método de Gram sob microscopia (aumento de 100x), foi realizada a diferenciação entre bactérias gram-positivas e gram-negativas, além da observação do formato. A determinação final da espécie foi baseada no teste MALD-TOF. Dentre as bactérias identificadas, apenas duas são descritas como formadoras de nódulos em leguminosas: *Rhizobium radiobacter* e *Mesorhizobium* sp1. As bactérias restantes podem estar relacionadas de alguma forma com o crescimento das plantas.

**Tabela 1.** Características morfológicas de bactérias isoladas de nódulos de raiz de grão-de-bico.

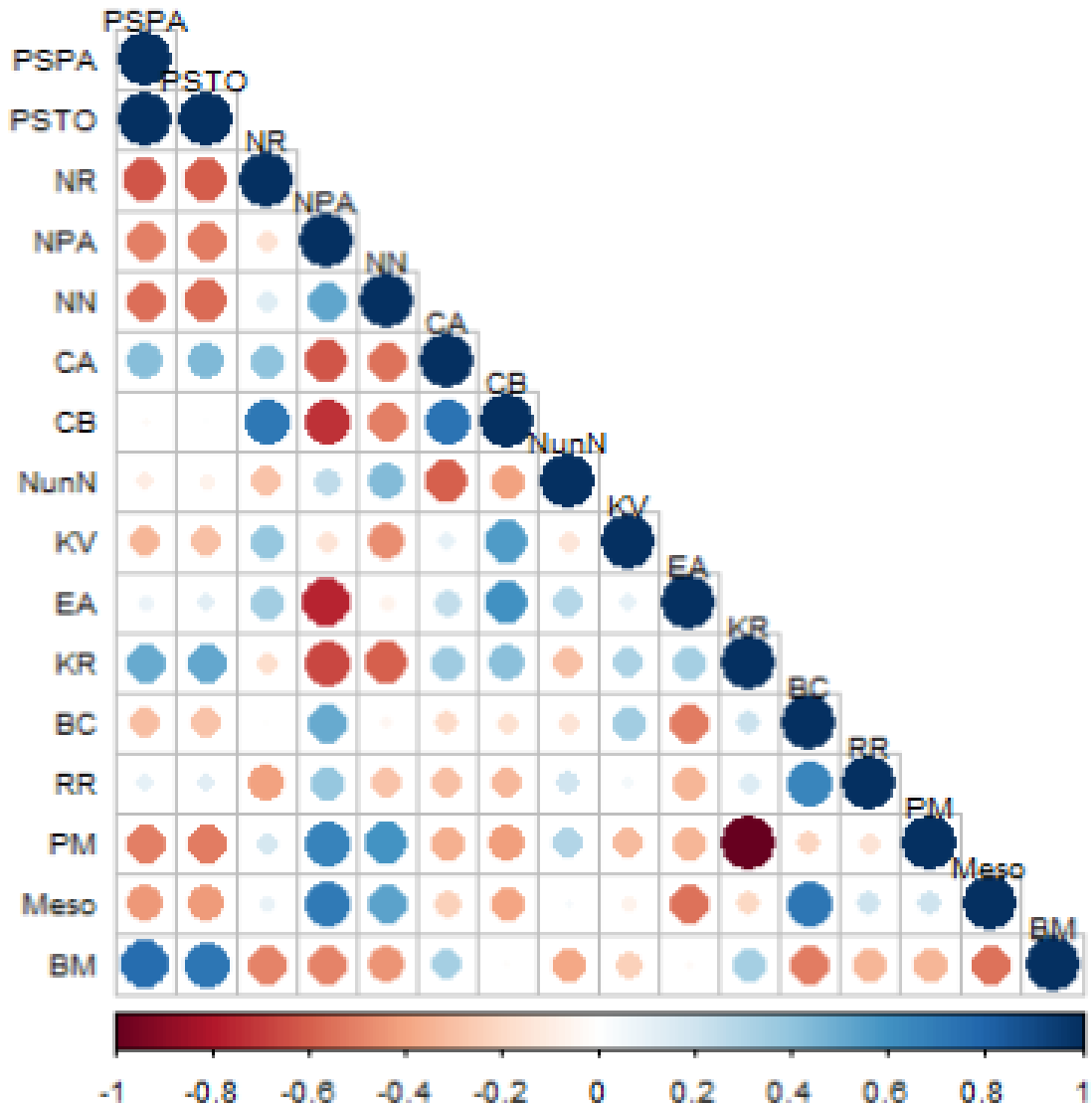
Bactérias	Morfologia das Colônias	Morfologia Celular	Teste Gram
<i>Klebsiella varicola</i>	Elevado, plano, regular	Bastonetes médias	-
<i>Enterobacter asburiae</i>	Plano, opaco, irregular.	Bastonetes médias	-
<i>Kosakônia radincintanos</i>	Elevado, liso e brilhante.	Bastonetes grandes	-
<i>Bacillus cereus</i>	Irregular, redondo, elevado, liso.	Bastonetes grandes	+
<i>Pseudomonas monteilii</i>	Irregular, elevado, liso	Bastonetes normais	-
<i>Bacillus mycoides</i>	Irregular, filamentosos.	Bastonetes grandes	+
<i>Rhizobium radiobacter</i>	Redondo, liso e não pigmentado.	Bastonetes normais	-
<i>Mesorhizobium</i> sp1	Irregular, elevada, lisa.	Bastonetes normais	-

\* Identificação pelo método de MALD-TOF

#### *Relação entre isolados bacterianos e componentes de produção de grão-de-bico*

A associação entre microrganismos e a planta consiste em uma interação íntima, na qual a planta fornece nutrientes e habitat, enquanto as bactérias promovem, o crescimento e a saúde da planta. A bactéria *Mesorhizobium* sp. correlacionou-se positivamente com as

características de acúmulo de nitrogênio na parte aérea e nos nódulos (Figura 3). Uma correlação positiva também foi observada entre *Mesorhizobium* sp. e a presença de *Bacillus cereus* ( $r = 0,73$ ), indicando uma possível associação entre essas duas bactérias no cultivo de grão-de-bico. A bactéria *Rhizobium radiobacter* também se correlacionou positivamente com *Bacillus cereus* (Figura 3), mas ambas não apresentaram fortes correlações com as características de biomassa ou acúmulo de nitrogênio (Figura 3).



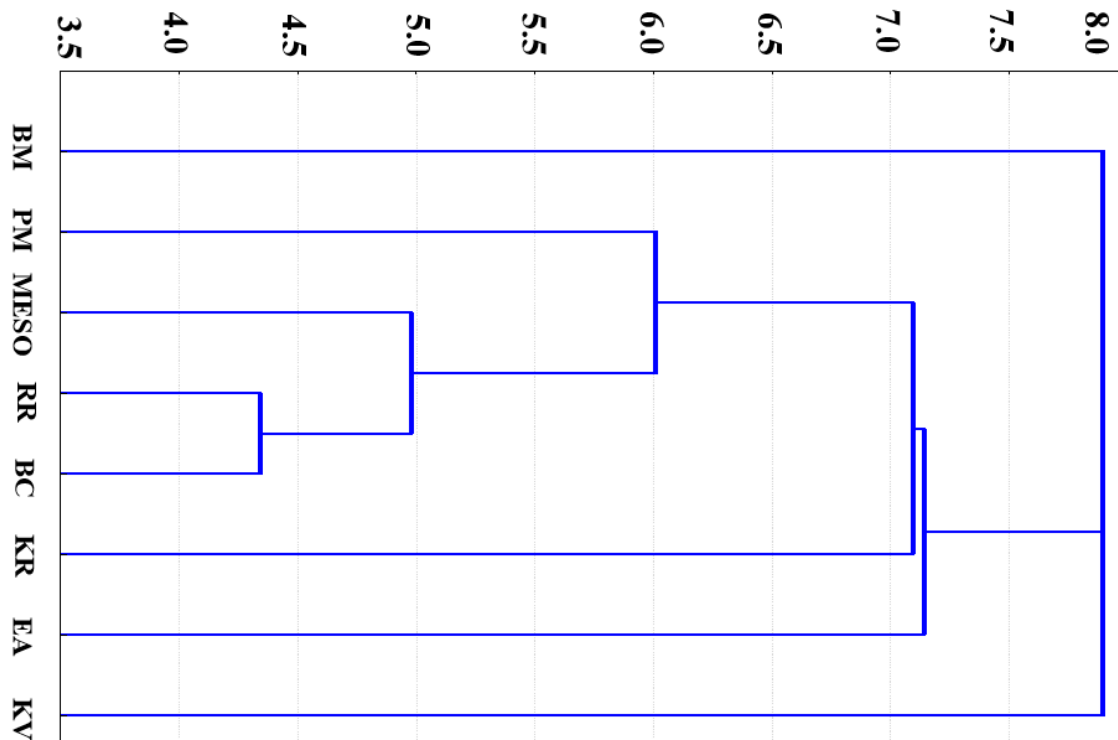
**Figura 3:** Análise de correlação ( $p \leq 0,10$ ) entre as variáveis da planta e do microrganismo, e entre as variáveis do microrganismo: DWOP (peso seco das partes aéreas); TDW (peso seco total); NR (nitrogênio nas raízes); NPA (nitrogênio na parte aérea); NN (nitrogênio nos nódulos); CA (clorofila A); CB (clorofila B); NunN (número de nódulos); KV (*Klebsiella variicola*); EA (*Enterobacter asburiae*); KR (*Kosakonia radicincitans*); BC (*Bacillus cereus*); RR (*Rhizobium radiobacter*); PM (*Pseudomonas monteilii*); Meso (*Mesorhizobium* sp.); BM (*Bacillus mycoides*) na cultivar BRS Cristalino de grão-de-bico. Interações negativas são representadas por cores vermelhas que variam de 0 a -1, enquanto interações positivas são representadas por cores azuis que variam de 0 a 1. Correlações mais fortes são indicadas por tons mais escuros com diâmetro maior, enquanto correlações mais fracas são representadas por tons mais claros.

Para a bactéria *Enterobacter asburiae*, observou-se uma correlação negativa com o nitrogênio da parte aérea ( $r = -0,77$ ), sugerindo que, neste estudo, a bactéria pode não estar associada ao acúmulo de nitrogênio na parte aérea ou pode ter menor absorção de nitrogênio atmosférico (Figura 3). Por outro lado, a bactéria *Kosakonia radicincitans* apresentou correlação negativa com o acúmulo de nitrogênio tanto na parte aérea quanto no nódulo (Figura 3).

A bactéria *Pseudomonas monteilii* apresentou correlação positiva com o acúmulo de nitrogênio, tanto na parte aérea quanto nos nódulos, indicando que pode ser uma bactéria fixadora de nitrogênio associativa, sem necessariamente se envolver em simbiose na formação de nódulos de grão-de-bico. No entanto, houve correlação negativa com a biomassa seca tanto da parte aérea quanto da biomassa total.

Dois gêneros de bactérias do gênero *Bacillus spp.* também foram identificadas (*B. cereus* e *B. mycoides*). A bactéria *B. cereus* apresentou correlação positiva com o acúmulo de nitrogênio na parte aérea, mas correlação negativa com a bactéria *Enterobacter asburiae* (Figura 3). A bactéria *B. mycoides* correlacionou-se positivamente com a biomassa tanto da parte aérea quanto da biomassa total e apresentou correlação fraca com o acúmulo de nitrogênio na parte aérea e nas raízes (Figura 3).

O teste de agrupamento estimou a distância entre os microrganismos estudados. Foi possível observar menor dissimilaridade entre as bactérias *B. cereus* e *R. radiobacter* (Figura 4). A identificação mostrou cinco classes de resposta. A primeira classe com *Klebsiella variicola*, a segunda classe com *Enterobacter asburiae*, a terceira com *Bacillus mycoides* e a quarta com *Kosakonia radicincitans*. E uma quinta classe com maior similaridade entre as bactérias *Pseudomonas monteilii*, *Mesorhizobium sp. 1*, *Rhizobium radiobacter* e *Bacillus cereus* (Figura 4).



**Figura 4.** Dendrogramas com análise de agrupamento multivariada usando o método da distância euclidiana para as bactérias identificadas em raízes de grão-de-bico, a saber: *KV* (*Klebsiella variicola*); *EA* (*Enterobacter asburiae*); *KR* (*Kosakonia radicincitans*), *BC* (*Bacillus cereus*); *RR* (*Rhizobium radiobacter*); *PM* (*Pseudomonas monteilii*); *Meso* (*Meso-Rhizobium* sp. 1); *BM* (*Bacillus mycoides*). A análise de agrupamento (dendrogramas) foi realizada usando o Método de Pares-Grupos Não Ponderados com Média Aritmética (UPGMA) e métrica de distância euclidiana (não padronizada).

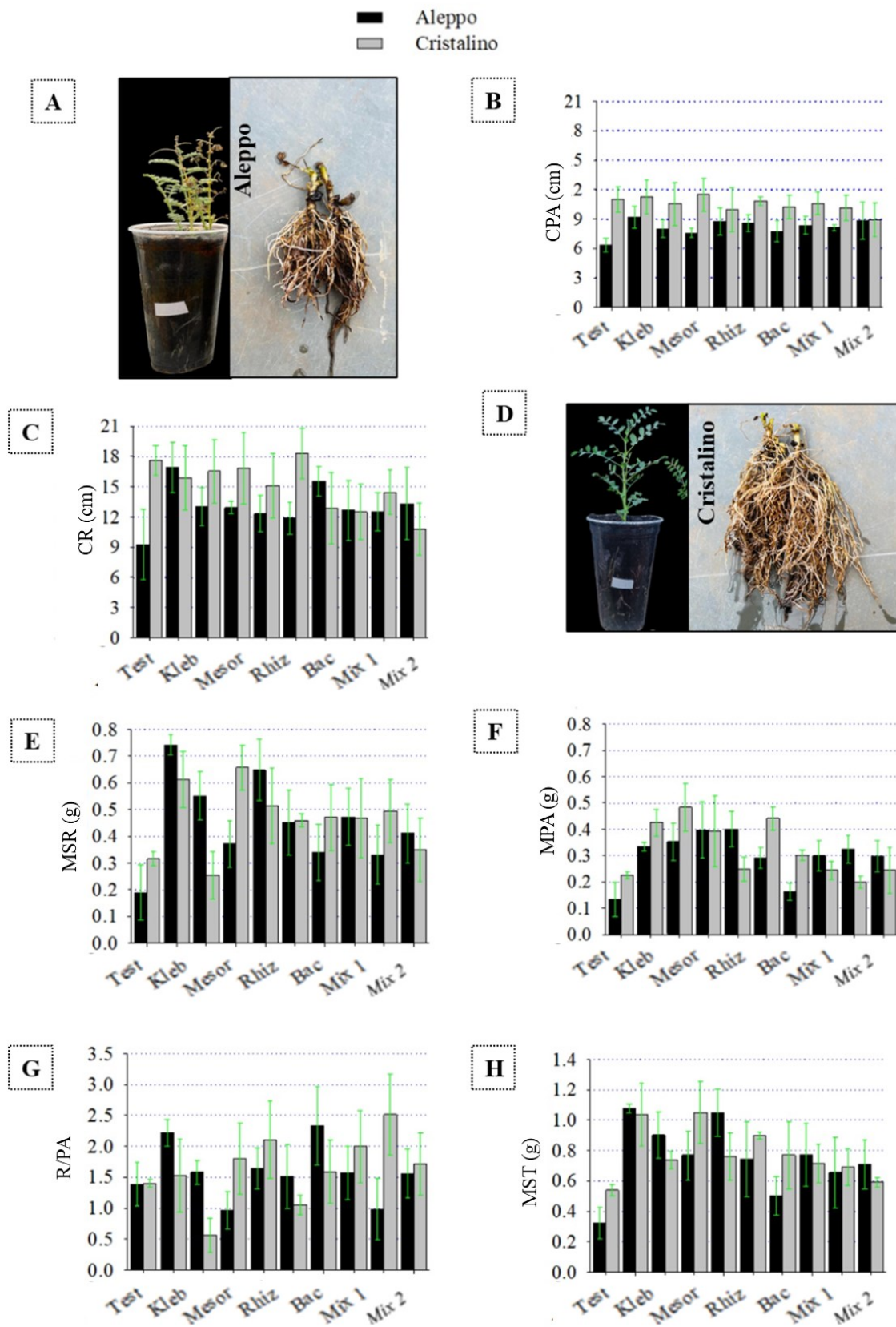
#### *Avaliação do inoculante nas cultivares BRS Cristalino e BRS Aleppo*

Não houve diferença estatística entre os tratamentos utilizados, portanto, optou-se por realizar uma análise descritiva dos dados. Para as cultivares BRS Cristalino e BRS Aleppo inoculadas e cultivadas em casa de vegetação, observou-se que a testemunha não inoculada apresentou menor comprimento da parte aérea em comparação a todos os outros tratamentos de inoculação para ambas as cultivares (Figura 5 B). Entretanto, para a cultivar Cristalino, as plantas não inoculadas apresentaram maior comprimento de raiz em comparação àquelas inoculadas com *Rhizobium radiobacter* e Mix 2 (Figura 5 B). Para a cultivar Aleppo, a testemunha não inoculada apresentou menor comprimento de raiz em comparação à inoculação com *Mesorhizobium* sp. 1 (Figura 5 C).

As plantas não inoculadas da cultivar BRS Aleppo apresentaram menor biomassa seca da parte aérea em comparação a todos os outros tratamentos, exceto para a inoculação com *Bacillus* (Figura 5 C). Para a cultivar BRS Cristalino, não houve diferenças significativas na

biomassa seca da parte aérea entre o controle não inoculado e as inoculações com *Pseudomonas monteilii*, Mix1 e Mix2, (Figura 5 C).

A biomassa seca da raiz para a cultivar BRS Aleppo não inoculada foi semelhante à das inoculações com *Bacillus* e Mix 1 e 2 (Figura 5 E). Em contraste, para a cultivar BRS Cristalino, maior biomassa seca da raiz foi observada para as inoculações com *Mesorhizobium* sp. 1 e *Pseudomonas monteilii* (Figura 5 E). As inoculações com *Kosakonia radicincitans* e Mix 2 apresentaram biomassa seca da raiz menor e semelhante à do controle não inoculado (Figura 5 E).



**Figura 5.** Comprimento da parte aérea (B), comprimento da raiz (C), matéria seca da raiz (E), matéria seca da parte aérea (F), relação raiz-parte aérea (G) e matéria seca total (H) de plantas de grão-de-bico BRS Aleppo e BRS Cristalino inoculadas com *Mesorhizobium* sp. 1 (*Mesor*), *Kosakonia radicincitans* (*Kosak*), *Enterobacter asburiae* (*Enter*), *Pseudomonas monteilii* (*Pseud*), *Klebsiella varicola* (*Kleb*), *Bacillus cereus* (*Bac*), *Rhizobium radiobacter*

(*Rhiz*), Mistura 1 de bactérias (*Klebsiella varicola*, *Bacillus cereus*, *Rhizobium radiobacter*, *Mesorhizobium* sp. 1) e Mistura 2 de bactérias (*Klebsiella varicola*, *Bacillus cereus*, *Rhizobium radiobacter*) em 70 dias. As linhas verticais acima das barras nos gráficos indicam um intervalo de confiança de 95% (n = 4). A: Planta em vaso e raízes BRS Aleppo. D: Planta em vaso e raízes BRS Cristalino.

As plantas não inoculadas apresentaram menor massa seca total em comparação aos outros tratamentos de inoculação, para duas cultivares. A cultivar Aleppo apresentou menor relação raiz-parte aérea quando não inoculada em comparação às inoculações com *Mesorhizobium* sp. 1 e *Bacillus* (Figura 4 F). Para a cultivar Cristalino, a inoculação com *Kosakonia radicincitans* foi menos efetiva em comparação aos outros tratamentos (Figura 4. F).

Observou-se que a cultivar Cristalino apresentou melhor adaptação em comparação a cultivar Aleppo (Figura 6). A cultivar Cristalino demonstrou maiores comprimentos de parte aérea e raiz em comparação a cultivar Aleppo não inoculada (Figuras 6 A e 6 D). Além disso, a Cristalino apresentou maior massa seca de parte aérea e total quando inoculada com *Mesorhizobium* sp. 1 (Figuras 6 G e 4 H).

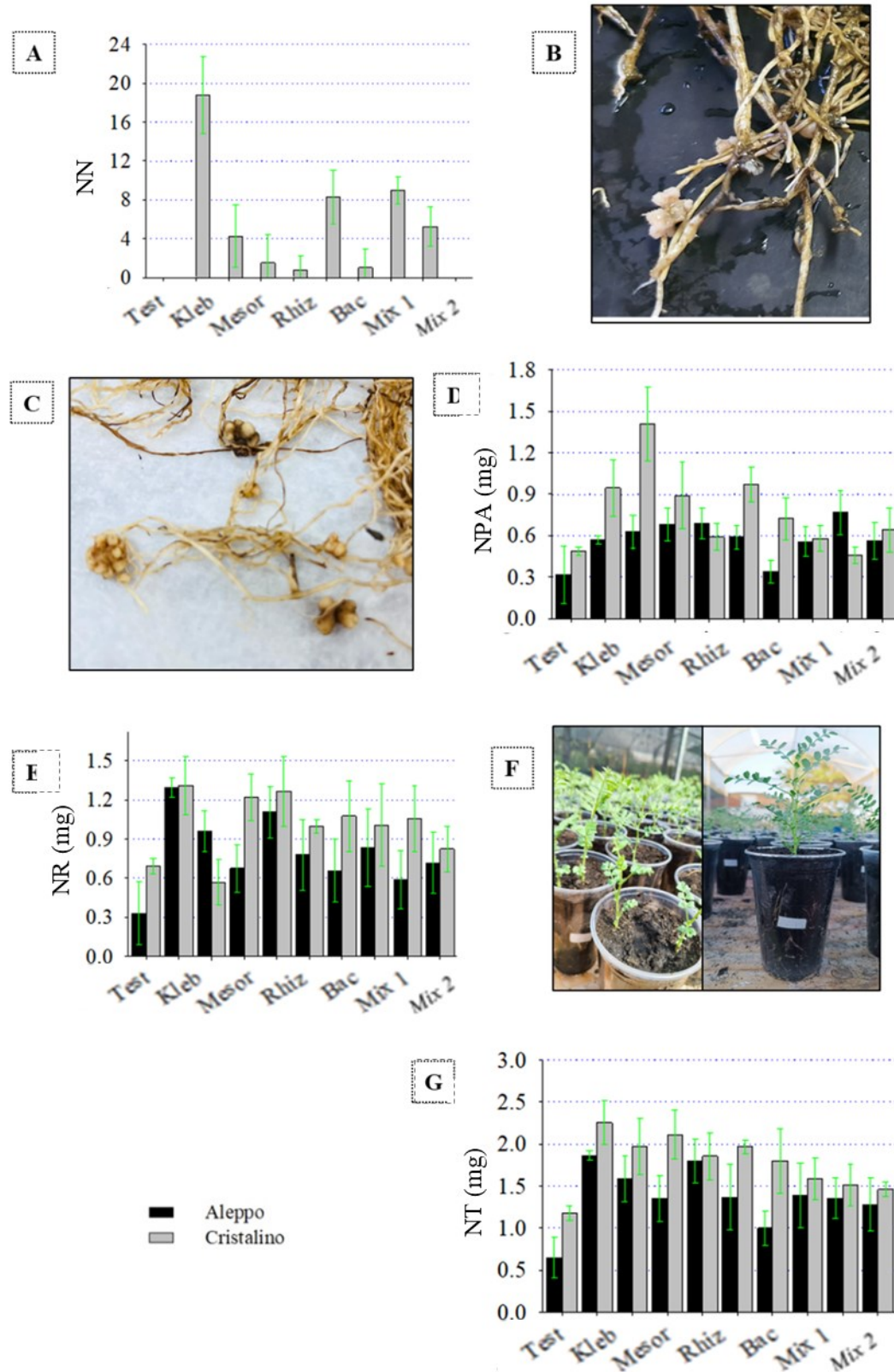
Nódulos estavam presentes apenas na cultivar Cristalino, com maior número de nódulos observado nas plantas inoculadas com *Mesorhizobium* sp. 1 e *Rhizobium radiobacter* (Figura 6 A). Na cultivar Aleppo, não foi observada nodulação para nenhuma das bactérias inoculadas (Figura 6 A). Na cultivar Aleppo, não houve diferença significativa no teor de nitrogênio na parte aérea entre os tratamentos inoculados e o controle não inoculado, com o menor teor de N observado na presença de *Bacillus* (Figura 6 D).

Plantas não inoculadas da cultivar Cristalino apresentaram menor teor de N em comparação à inoculação com o Mix 1, mas não houve diferença significativa entre esses dois tratamentos (Figura 6 D). Em relação ao teor de N nas raízes, não houve diferença entre as cultivares quando inoculadas com *Mesorhizobium* sp. 1, mas a cultivar Cristalino apresentou maior teor de N na parte aérea em comparação a cultivar Aleppo (Figura 6 E).

A cultivar Aleppo apresentou menor teor de nitrogênio nas raízes quando não inoculada e com as inoculações com o Mix 1 e o Mix 2 (Figura 6 E). Para a cultivar Cristalino, a inoculação com *Kosakonia radicincitans* foi menos efetiva em comparação aos demais tratamentos (Figura 6 E).

As plantas não inoculadas apresentaram o menor teor total de nitrogênio, o que não diferiu da inoculação com *Bacillus* (Figura 6 G) para a cultivar Aleppo. Na cultivar Cristalino, as inoculações com *Rhizobium* e Mix 1 e Mix 2 não diferiram da testemunha não inoculada, com menores teores de N em comparação aos demais tratamentos (Figura 6 G). Nódulos radiculares foram encontrados em tratamentos como *Mesorhizobium* sp. 1 (*Mesor*), *Kosakonia*

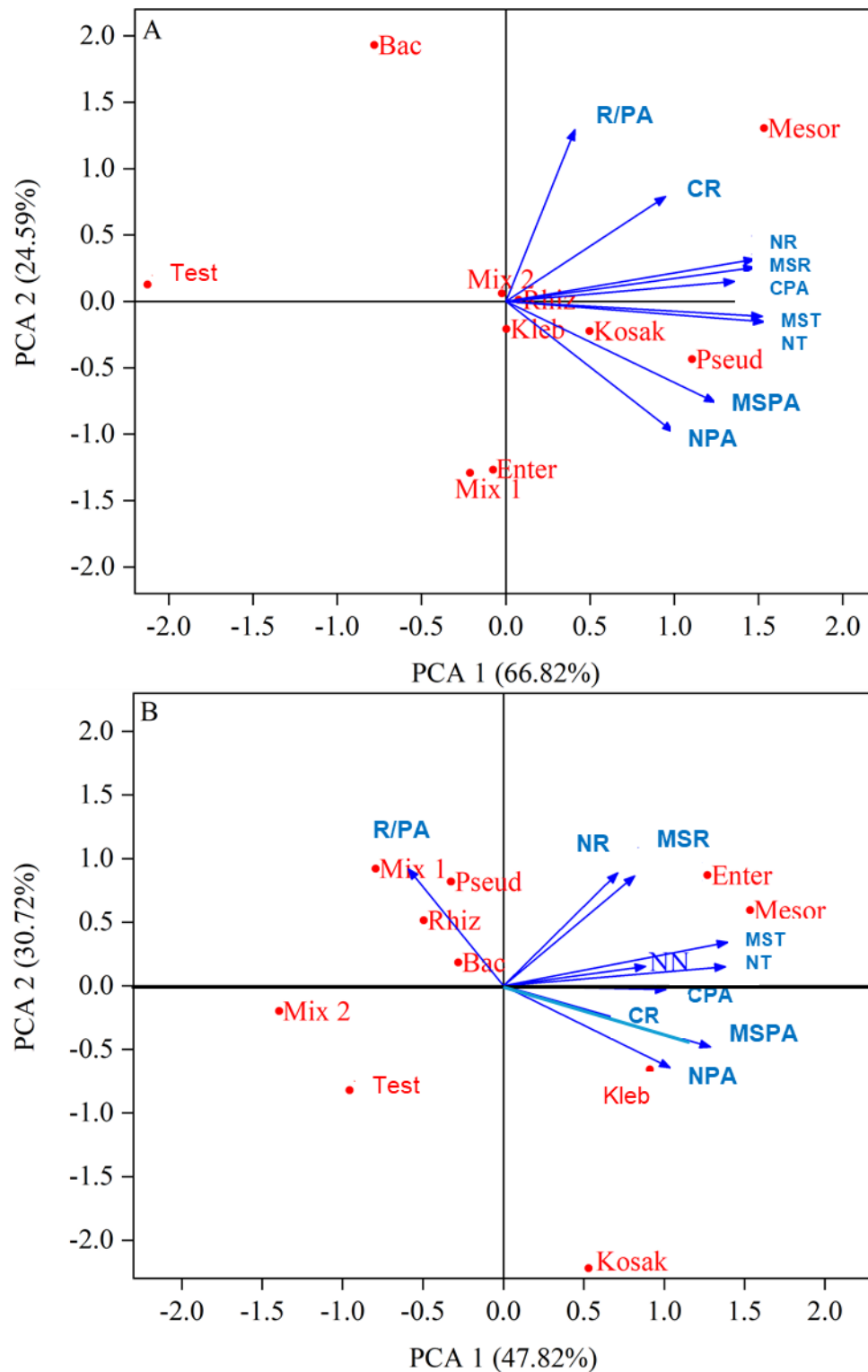
*radicincitans* (Kosak), *Enterobacter asburiae* (Enter), *Pseudomonas monteilii* (Pseud), *Klebsiella variicola* (Kleb), *Bacillus cereus* (Bac), *Rhizobium radiobacter* (Rhiz), Mix 1, para a cultivar BRS Cristalino (Figura 6 A, B, C).



**Figura 6:** Número de nódulos – NN (A), teor de nitrogênio na parte aérea (D), raízes (E) e teor total de nitrogênio (G) em plantas de grão-de-bico BRS Aleppo e BRS Cristalino inoculadas com *Mesorhizobium* sp. 1 (Mesor),

*Kosakonia radicincitans* (Kosak), *Enterobacter asburiae* (Enter), *Pseudomonas monteilii* (Pseud), *Klebsiella variicola* (Kleb), *Bacillus cereus* (Bac), *Rhizobium radiobacter* (Rhiz), Mistura 1 de bactérias (*Klebsiella variicola*, *Bacillus cereus*, *Rhizobium radiobacter*, *Mesorhizobium* sp. 1) e Mix 2 de bactérias (*Klebsiella variicola*, *Bacillus cereus*, *Rhizobium radiobacter*). As linhas verticais acima das barras nos gráficos indicam um intervalo de confiança de 95% (n=4). B, C: Nódulos de raízes de grão-de-bico inoculados com *Mesorhizobium* sp. 1 e *Rhizobium radiobacter*. F: Plantas inoculadas com bactérias promotoras de crescimento sem adição de nitrogênio.

A análise de Componentes Principais (PCA) para a cultivar Aleppo revelou relações significativas entre os diferentes tratamentos e as características de crescimento das plantas. O PCA 1 explicou 66,82% da variação total e o PCA 2, 24,59%. Observou-se que a inoculação com *Mesorhizobium* sp. 1 (Mesor), *Kosakonia radicincitans* (Kosak), *Pseudomonas monteilii* (Pseud), *Klebsiella variicola* (Kleb) e *Rhizobium radiobacter* (Rhiz) apresentou correlação positiva com todos os parâmetros morfológicos analisados (Figura 7 A). Isso indica que, para a cultivar Aleppo, a presença desses microrganismos está associada ao aumento da biomassa da parte aérea e ao maior teor total de nitrogênio nas plantas, sugerindo um efeito benéfico no crescimento das plantas e na nutrição nitrogenada. O PCA 2 explicou 24,59% da variação total. Neste componente, não se observou correlação entre os microrganismos inoculados e os parâmetros analisados, incluindo o controle sem inoculação, que não apresentou resultados significativos em relação aos outros tratamentos (Figura 7 A).



**Figura 7:** Análise de Componentes Principais (PCA): Aleppo (A) e Cristalino (B): PCA Biplot para Comprimento da parte aérea (CPA), Comprimento da Raiz (CR), Massa seca da parte aérea (MSPA), Massa Seca da Raiz (MSR), Massa Seca Total (MST), relação raiz/parte aérea (R/PA), Número de Nódulos (NN), Teor de Nitrogênio na parte aérea (NPA), Teor de Nitrogênio na Raiz (NR) e Teor de Nitrogênio Total (NT) em Plantas de Grão-de-bico Inoculadas com *Mesorhizobium sp. 1* (*Mesor*), *Kosakonia radicincitans* (*Kosak*), *Enterobacter asburiae* (*Enter*), *Pseudomonas monteilii* (*Pseud*), *Klebsiella variicola* (*Kleb*), *Bacillus cereus* (*Bac*), *Rhizobium radiobacter* (*Rhiz*), Mistura Bacteriana 1 (*Klebsiella variicola*, *Bacillus cereus*, *Rhizobium radiobacter*, *Mesorhizobium sp. 1*) e Mistura Bacteriana 2 (*Klebsiella variicola*, *Bacillus cereus*, *Rhizobium radiobacter*).

Para a cultivar Cristalino, o PCA 1 explicou 47,82% da variação total, mostrando uma correlação positiva entre a inoculação com *Mesorhizobium* sp. 1 (Mesor), *Klebsiella variicola* (Kleb) e *Enterobacter asburiae* (Enter) para todas as características analisadas, exceto para a relação raiz/parte aérea. O PCA 2 explicou 30,72% da variação total, apresentando uma correlação positiva quando inoculada com Mix1, *Pseudomonas monteilii*, *Bacillus cereus* e *Rhizobium radiobacter* para a relação raiz/parte aérea. Para o controle, não se verificou correlação positiva para os parâmetros analisados (Figura 7 B).

## DISCUSSÃO

Foram identificadas oito espécies de bactérias nos nódulos radiculares por meio de análises morfológicas e testes MALDI-TOF, das quais seis apresentaram um estilo de vida endofítico: *Klebsiella variicola*, *Enterobacter asburiae*, *Kosakonia radicincitans*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides* e *Pseudomonas monteilii*. Além disso, duas espécies apresentaram um estilo de vida simbiótico: *Rhizobium radiobacter* e *Mesorhizobium* sp. 1 (Tabela 1).

Neste estudo, foi observada uma grande variedade de formatos de nódulos radiculares formados pela simbiose com *Rhizobium radiobacter* e *Mesorhizobium* sp. Foram identificadas duas bactérias simbióticas fixadoras de N<sub>2</sub> (Figuras 2 e 4 B, C). Algumas leguminosas formam nódulos radiculares infectados por um único rizóbio fundador ou mais, portanto, na maioria dos casos, a população de rizóbios dentro de um único nódulo é isogênica (Mendonza-Soárez *et al.*, 2020). Conseqüentemente, apenas uma pequena proporção de rizóbios na rizosfera de uma planta será bem-sucedida na competição pela ocupação dos nódulos (Burghardt *et al.*, 2023). Estudos recentes indicam que os resultados da competição não são afetados pela presença de isolados adicionais da mesma espécie de rizóbio, resultando em uma hierarquia competitiva, onde o sucesso de um isolado pode ser previsto com base nos resultados de outro (Burghardt *et al.*, 2022).

A aplicação das bactérias *Mesorhizobium* sp. 1, *Kosakonia radicincitans*, *Enterobacter asburiae*, *Pseudomonas monteilii*, *Klebsiella variicola*, *Bacillus cereus*, *Rhizobium radiobacter* aumentam a absorção de nitrogênio e a produção de matéria seca nas raízes e parte aérea das cultivares Aleppo e Cristalino (Figuras 4 e 5). As bactérias promotoras de crescimento, também conhecidas como bioinsumos, estimulam o crescimento das plantas, facilitam a disponibilidade de nutrientes e fornecem proteção contra agentes patogênicos, o que destaca a importância de sua identificação por meio de técnicas confiáveis. Esses

microrganismos produzem fitohormônios, como a aminociclopropano-1-carboxilato desaminase (ACC-desaminase), enzimas hidrolíticas, fosfato solúvel, compostos orgânicos voláteis, cianeto de hidrogênio, fixação de nitrogênio atmosférico, sideróforos e exopolissacarídeos para a formação de biofilme (Khan *et al.*, 2021).

Além disso, sua utilização pode contribuir para a redução de custos e promover maior sustentabilidade nas práticas agrícolas (Gunnabo *et al.*, 2020). É mais eficaz inocular as plantas com microrganismos isolados da rizosfera da planta hospedeira do que utilizar microrganismos exógenos do microbioma (Racioppo *et al.*, 2023).

A inoculação de sementes de grão-de-bico com uma mistura de *Nitrobacter* e *Rhizobium* promove maior absorção de N, P e K, com respostas mais efetivas no crescimento das plantas em solos distróficos e com menor teor de matéria orgânica, ou na presença de populações bacterianas nativas (Soe *et al.*, 2020). A aplicação de bactérias simbióticas (*Mesorhizobium sp. 1*) e não simbióticas (*Kosakonia radicincitans*, *Enterobacter asburiae*, *Pseudomonas monteilii*, *Klebsiella variicola* e *Bacillus cereus*) promoveu a absorção de nitrogênio e o crescimento das plantas de grão-de-bico (Figuras 5 e 7). Em áreas com elevado teor de matéria orgânica e pH alcalino, a ação do *Bacillus spp.* na rizosfera do grão-de-bico foi favorecida (Almeida Neta *et al.*, 2021), o que também foi observado neste estudo, onde a inoculação com *Bacillus* favoreceu o crescimento das plantas (Figura 5).

A presença do gênero *Bacillus spp.* sugere a presença de bactérias capazes de solubilizar fosfato e promover o crescimento das plantas, já reportada em outros trabalhos (Almeida Neta *et al.*, 2021). O efeito positivo da inoculação com uma mistura de *Bacillus spp.* em grão-de-bico resultou em aumento da produtividade em áreas de solo tropical (Almeida Neta *et al.*, 2021), como o solo utilizado neste estudo. A presença de *B. mycoides* e *B. cereus* isolados das raízes foi associada à produção de matéria seca e ao número de nódulos em plantas de grão-de-bico. Essas relações entre as bactérias identificadas e as características de rendimento das plantas são indicadores importantes de como as bactérias podem influenciar a relação solo-planta-microrganismo.

A presença de *Pseudomonas monteilii* nas raízes de grão-de-bico indica seu potencial como promotora de crescimento, associando-se à acumulação de nitrogênio e à nodulação, especialmente na cultivar Aleppo. A co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento ou simbióticas tem sido amplamente estudada, e trabalhos relatam que a combinação de *Mesorhizobium sp.* e *Pseudomonas sp.* em cultivares de grão-de-bico exerce efeito sinérgico na proteção contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Nagpal *et al.*, 2020). Essa estratégia pode favorecer a disponibilidade de nutrientes e a proteção fitossanitária da cultura. No presente

estudo, a associação de *Klebsiella variicola*, *Bacillus cereus*, *Rhizobium radiobacter* e *Mesorhizobium* sp. 1 apresentou efeitos positivos na nodulação, na relação raiz/parte aérea (R/S) e na acumulação de N nos grãos de grão-de-bico (Figura 7).

Em estudos com *Mesorhizobium ciceri* e *Mesorhizobium muleiense* (Zhang *et al.*, 2023), observaram uma maior abundância da bactéria *Pseudomonas* na rizosfera do grão-de-bico na presença de *M. muleiense*. Isso sugere que a *Pseudomonas* é um microrganismo-chave na nodulação do grão-de-bico na China (Zhang *et al.*, 2023). A observação da bactéria *Kosakonia radicincitans* pode indicar que sua atividade contribui para o aumento da massa seca da planta, possivelmente por outros meios de promoção do crescimento (Figura 3). Isso pode envolver uma maior solubilização de outros macronutrientes ou a produção de fitormônios. Esta bactéria possui propriedades promotoras de crescimento, bem como mecanismos genômicos potencialmente envolvidos em sua interação benéfica com uma planta hospedeira, exercendo sua influência em uma ampla gama de hospedeiros (Anvar, *et al.*, 2019; Quintas-Nunes, *et al.*, 2022).

A identificação do gênero *Mesorhizobium* sp. nas raízes indicou que, apesar de não ser uma bactéria endêmica dos solos tropicais, foi observada nas raízes do grão-de-bico formando nódulos (Figura 2). Provavelmente, na área de cultivo, existiram estirpes deste gênero que conseguem colonizar as raízes e fixar o nitrogênio atmosférico, por se tratar de uma bactéria descrita como simbiote do grão-de-bico (Laranjo *et al.*, 2014). Essas estirpes provavelmente transportam genes simbióticos (*nifH* e *nodC*) como as estirpes *M. ciceri* e *M. mediterraneum*, que eram anteriormente consideradas os únicos simbiossiontes do grão-de-bico (Laranjo *et al.*, 2014; Gunnado *et al.*, 2020; Soe *et al.*, 2020). Neste estudo, esta estirpe de bactérias esteve associada à acumulação de nitrogênio na parte aérea e à nodulação do grão-de-bico, características que reforçam a ação simbiótica da bactéria com um aumento da absorção de nitrogênio (Figura 6).

A bactéria *Rhizobium radiobacter* foi observada com efeito positivo associada à estirpe *Mesorhizobium* sp. 1. Ambas são bactérias noduladoras que induzem a planta a formar nódulos nas suas raízes; no entanto, no caso de *R. radiobacter*, não se verificou qualquer relação com a biomassa vegetal ou com a acumulação de nitrogênio. Neste caso, mais características precisam ser analisadas para elucidar como esta bactéria interage com a planta, se tem um efeito benéfico ou não.

As cultivares de grão-de-bico originárias de regiões semiáridas podem enfrentar dificuldades de associação com bactérias nas suas raízes, seja por interações endofíticas ou pela formação de nódulos (Kumar *et al.*, 2023). As estirpes nativas, que iniciam a nodulação e a

fixação de nitrogênio nas raízes, levando conseqüentemente ao aumento do crescimento da biomassa, da absorção de nutrientes e na produtividade de grãos de grão-de-bico (Soe *et al.*, 2020; Becker *et al.*, 2018).

Observou-se que os agrupamentos a classe com menor dissimilaridade (V), contendo bactérias noduladoras e fixadoras de nitrogênio atmosférico (*Mesorhizobium* sp. 1, *R. radiobacter*), juntamente com bactérias promotoras de crescimento endofíticas (*P. monteilli* e *B. cereus*), apresentou maiores relações tanto para o número de nódulos quanto para o teor de nitrogênio na biomassa aérea (Figura 3,4). Isto indica que esta é uma mistura promissora de bactérias no cultivo do grão-de-bico, uma vez que abrange tanto a diazotrófica noduladora quanto a solubilizadora de fósforo.

A classe contendo *Bacillus mycoides* apresentou menor dissimilaridade com a biomassa seca total da planta (Figura 3). Neste caso, isso também é um indicativo de que esta bactéria deve ser estudada em futuras pesquisas, pois poderá ser utilizada como componente de bioinsumos para o cultivo de grão-de-bico em regiões tropicais.

Esta investigação, envolvendo identificações iniciais de bactérias diazotróficas, tem um valor significativo no âmbito microbiológico desta leguminosa em regiões semiáridas. Para os próximos estudos e cultivos, serão testadas inoculações com cada bactéria e suas combinações, tanto em vasos com solo estéril quanto em condições de campo.

As bactérias nativas do solo podem colonizar a rizosfera do grão-de-bico, promovendo um aumento significativo do crescimento das raízes e da biomassa acima do solo. Esta identificação inicial de bactérias que habitam as raízes do grão-de-bico revela que a maioria apresenta alguma associação positiva com a planta, enquanto outras não demonstram tal relação. Assim sendo, são necessários estudos mais aprofundados com cada uma dessas bactérias para caracterizar seus mecanismos de ação e efeitos durante o ciclo de crescimento do grão-de-bico.

A identificação precisa das bactérias promotoras do crescimento das plantas é de grande importância para a agricultura moderna. Essas bactérias desempenham papéis essenciais na promoção do crescimento e desenvolvimento das plantas hospedeiras por meio de mecanismos multifacetados, incluindo a fixação de nitrogênio atmosférico, a solubilização de fosfato, a produção de fitohormônios e a proteção contra agentes patogênicos. Compreender a diversidade dessas bactérias e sua interação com as plantas pode levar ao desenvolvimento de estratégias de gestão sustentável das culturas, reduzindo a dependência de insumos químicos e aumentando a produtividade agrícola de forma ambientalmente responsável.

## CONCLUSÕES

No presente estudo, foi possível identificar oito bactérias nas raízes da cultivar de grão-de-bico Cristalino, na região tropical brasileira. Seis delas foram identificadas como bactérias endofíticas promotoras de crescimento (*Klebsiella variicola*, *Enterobacter asburiae*, *Kosakonia radicincitans*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Pseudomonas monteilii*). Além disso, duas bactérias capazes de formação de nódulos e fixação de nitrogênio foram *Rhizobium radiobacter* e *Mesorhizobium* sp. 1.

A inoculação de isolados bacterianos nas cultivares de grão-de-bico BRS Aleppo e BRS Cristalino promove o crescimento das plantas. Nesse contexto, a aplicação de *Mesorhizobium* sp. 1, *Kosakonia radicincitans*, *Enterobacter asburiae*, *Pseudomonas monteilii*, *Klebsiella variicola*, *Bacillus cereus* e *Rhizobium radiobacter* aumentaram a nodulação, a absorção de N e a produção de matéria seca nas raízes e na parte aérea do grão-de-bico.

## REFERÊNCIAS

1. Abián, J.; Carrascal, M.; Gay, M. Introducción a la Espectrometría de Masas Para la Caracterización de Péptidos y Proteínas en Proteómica; ProteoRed: Barcelona, Spain, 2008, Volume 2, p. 30.
2. Almeida Neta, M. N.; Almeida, E. S. D.; Costa, C. A. D.; Nunes, J. A. D. R.; Fernandes, L. A.; Pegoraro, R. F. Inoculation of *Bacillus* spp. and nitrogen levels increase chickpea production. *Cienc. Agrotec.* 2021, 45, 015421. <https://doi.org/10.1590/1413-7054202145015421>
3. Almeida Neta, M. N.; Pegoraro, R. F.; Sampaio, R. A.; Costa, C. A. DA.; Fernandes, L. A.; Ferreira, J, M. Does inoculation with *Rhizobium tropici* and nitrogen fertilization increase chickpea production? *Cienc. Agrotec.* 2020, 44, 016520. <https://doi.org/10.1590/1413-7054202044016520>
4. Altun, O.; Botero-Kleiven, S.; Carlsson, S.; Ullberg, M.; Ozenci, V. Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by MALDI-TOF MS following short-term incubation on solid media. *J. Med. Microbiol.* 2015, 64, 1346-1352. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000168>
5. Anvar, A.; Khaitov, B.; Toderich, K.; Park, KW. Growth, nutrient uptake, and yield parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.) enhance by *Rhizobium* and *Azotobacter*

inoculations in saline soil. *J. Plant Nutr.* 2019, 42, 2703-2714. <https://doi.org/10.1080/01904167.2019.1655038>

6. Armas-Capote, N.; Pérez-Yépez, J.; Martínez-Hidalgo, P.; Garzón-Machado, V.; del Arco-Aguilar, M.; Velázquez, E.; León-Barrios, M. Core and symbiotic genes reveal nine *Mesorhizobium* genospecies and three symbiotic lineages among the rhizobia nodulating *Cicer canariense* in its natural habitat (La Palma, Canary Islands). *Syst. Appl. Microbiol.* 2014, 37, 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.08.004>

7. Becker, M.; Patz, S.; Becker, Y.; Berger, B.; Drungowski, M.; Bunk, B.; Overmann, J.; Spröer, C.; Reetz, J.; Tchuisseu Tchakounte, G. V.; Ruppel, S. Comparative Genomics Reveal a Flagellar System, a Type VI Secretion System and Plant Growth-Promoting Gene Clusters Unique to the Endophytic Bacterium *Kosakonia radicincitans*. *Front. Microbiol.* 2018, 9, 1997. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01997>

8. Benjelloun, I.; Thami Alami, I.; El Khadir, M.; Douira, A.; Udupa, S. M. Co-Inoculation of *Mesorhizobium ciceri* with Either *Bacillus* sp. or *Enterobacter aerogenes* on Chickpea Improves Growth and Productivity in Phosphate-Deficient Soils in Dry Areas of a Mediterranean Region. *Plants* 2021, 10, 571. <https://doi.org/10.3390/plants10030571>

9. Bosse, M.A.; Silva M.B.; Oliveira N.G.R.M. Physiological impact of flavonoids on nodulation and ureide metabolism in legume plants. *Plant Physiol. Biochem.* 2021, 166, 512–521. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.06.007>

10. Bremner, J.M. Total Nitrogen. Methods of soil analysis Part 2- Chemical and Microbiological Properties, number 9 in the series Agronomy. American Society of Agronomy, Inc., Publisher USA, p.1149-1178, 1965.

11. Burghardt, L. T.; DiCenzo, G. C. The evolutionary ecology of rhizobia: multiple facets of competition before, during, and after symbiosis with legumes. *Curr. Opin. Microbiol.* 2023, 72, 102281. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2023.102281>

12. Burghardt, L.T.; Epstein, B.; Hoge, M.; Trujillo, D.I.; Tiffin, P.: Host-associated rhizobial fitness: dependence on nitrogen, density, community complexity, and legume genotype. *Appl. Environ. Microbiol.* 2022, 88, e00526-22. <https://doi.org/10.1128/aem.00526-22>

13. Cao, M.; Narayanan, M.; Shi, X.; Chen, X.; Li, Z.; Ma, Y. Optimistic Contributions of Plant Growth-Promoting Bacteria for Sustainable Agriculture and Climate Stress Alleviation. *Environ. Res* 2023, 217, 114924. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114924>

14. Colquhoun, D.R.; Schwab, K.J.; Cole, R.N.; Halden, R.U. Detection of norovirus capsid protein in authentic standards and in stool extracts by matrix-assisted laser desorption ionization and nanospray mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72, 2749–2755. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2749-2755.2006>
15. Cuenod, A.; Foucault, F.; Pfluger, V.; Egli, A. Factors Associated With MALDI-TOF Mass Spectral Quality of Species Identification in Clinical Routine Diagnostics. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2021, 11, 646648. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.646648>
16. Dal Cortivo, C.; Ferrari, M.; Visioli, G.; Lauro, M.; Fornasier, F.; Barion, G.; Panozzo, A.; Vamerali, T. Effects of seed-applied biofertilizers on rhizosphere biodiversity and growth of common wheat (*Triticum aestivum* L.) in the field. *Front Plant Sci.* 2020, 11, 72. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00072>
17. Dieckmann, R.; Helmuth, R.; Erhard, M.; Malorny, B. Rapid classification and identification of salmonellae at the species and subspecies levels by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008, 74, 7767–7778. <https://doi.org/10.1128/AEM.01402-08>
18. Dingle, T.C.; Butler-Wu, S.M. Accidental exposure to Burkholderia pseudomallei in the laboratory in the era of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Clin. Lab. Med.* 2013, 33, 589. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2013.03.001>
19. Dionisio, J. A.; Pimentel, I. C.; Signor, D.; Paula, A. M. De; Maceda, A.; Matanna, A. L. Guia prático de biologia do solo. Curitiba: SBCS: NEPAR, 2016, cap. 10, p. 60-66.
20. Elias, N.V.; Herridge, D.F. Naturalised populations of mesorhizobia in chickpea (*Cicer arietinum* L.) cropping soils: effects on nodule occupancy and productivity of commercial chickpea. *Plant Soil* 2014, 387, 233-249. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2298-z>
21. FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Available via DIALOG. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>. 2022, Accessed. Accessed 23 May 2023.
22. Farfour, E.; Leto, J.; Barritault, M.; Barberis, C.; Meyer, J.; Dauphin, B.; Join-Lambert, O. Evaluation of the andromas matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of aerobically growing gram-positive bacilli. *J. Clin. Microbiol.* 2012, 50, 2702–2707. <https://doi.org/10.1128/JCM.00368-12>

23. Gunnabo, A. H.; van Heerwaarden, J.; Geurts, R.; Wolde-Meskel, E.; Degefu, T.; Giller, K. E. Symbiotic interactions between chickpea (*Cicer arietinum L.*) genotypes and *Mesorhizobium* strains. *Symbiosis* 2020, 82, 235-248. <https://doi.org/10.1007/s13199-020-00724-6>
24. Gul, J.; Ullah, M. Biochemical, physiological, and growth evaluation of different chickpea genotypes under varying salinity regimes. *Brasilian Journal of Biology*, 2022, vol. 82, e268350. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.268350>
25. Havlicek, V.; Lemr, K.; Schug, K.A. Current Trends in Microbial Diagnostics Based on Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2013, 85, 790. <https://doi.org/10.1021/ac3031866>
26. Hussain, N.; Yasmeen, A.; Yousaf, M. M. Antioxidant status and their enhancements strategies for water stress tolerance in chickpea. *Brasilian Journal of Biology*, 2020, vol. 82, e237809. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.237809>
27. Hoagland, D.R.; Arnon, D.I. The water culture method for growing plants without soils. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 347p., 1950.
28. Khan, M.A.; Khan, A.A.; Sahile, R.; Jan, S.; Asaf, M.; Hamayun, M.; Imran, A.; Adhikari, S.-M.; Kang, K.-M.; Kim, I.-J. L. Halotolerant bacteria mitigate the effects of salinity stress on soybean growth by regulating secondary metabolites and molecular responses. *BMC Plant Biol.* 2021, 21,176. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-02937-3>.
29. Kumar, H.; Ishtiyag, S.; Favas, P. J.; Varun, M.; Paul, M. S. Effect of metal-resistant PGPB on the metal uptake, antioxidative defense, physiology, and growth of *Atriplex lentiformis* (Torr.) S. Wats. in soil contaminated with cadmium and nickel. *J. Plant Growth Regul.* 2023, 42(6), 3868-3887. <https://doi.org/10.1007/s00344-022-10853-5>
30. Laranjo, M.; Alexandre, A.; Oliveira, S. Legume growth-promoting rhizobia: an overview on the *Mesorhizobium* genus. *Microbiol. Res.* 2014, 169, 2-17. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.012>
31. Llamas, A.; Leon-Miranda, E.; Tejada-Jimenez, M. Microalgal and Nitrogen-Fixing Bacterial Consortia: From Interaction to Biotechnological Potential. *Plants* 2023, 12, 2476. <https://doi.org/10.3390/plants12132476>
32. Mendoza-Suárez, M.A.; Geddes, B. A.; Sánchez-Cañizares, C.; Ramírez González, R.H.; Kirchhelle, C.; Jorrián, B.; Poole PS: Optimizing *Rhizobium*- legume symbioses by simultaneous measurement of rhizobial competitiveness and N<sub>2</sub> fixation in nodules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2020, 117, 9822-9831, <https://doi.org/10.1073/pnas.1921225117>
33. Mojumdar, A.; Hee-Jin Y.; Duck-Hyun K.; Cho, K. High-Throughput Screening Technique for Microbiome using MALDI-TOF Mass Spectrometry: A Review.

December 2022, Mass Spectrometry Letters 13(4):106  
<https://doi.org/10.5478/MSL.2022.13.4.106>

34. Nagpal, S.; Sharma, P.; Sirari, A.; Gupta, R. K. Coordination of *Mesorhizobium* sp. and endophytic bacteria as elicitor of biocontrol against *Fusarium* wilt in chickpea. *Eur. J. Plant Pathol.* 2020, 158, 143-161. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02062-1>

35. Nagpal, S.; Sharma, P.; Sirari, A.; Kumawat, K. C.; Wati, L.; Gupta, S. C.; Mandahal, K. S. Chickpea (*Cicer arietinum* L.) as model legume for decoding the co-existence of *Pseudomonas fluorescens* and *Mesorhizobium* sp. as bio-fertilizer under diverse agro-climatic zones. *Microbiol. Res.* 2021, 247, 126720. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126720>

36. Padilha, K. S. M. A.; Pegoraro, R. F.; Almeida Neta, M. N.; Duarte, E. R.; Sanglard, D. A.; Fernandes, L. A.; Lemes, P. G.; Souza, C. N. Growth-promoting bacteria and symbionts in chickpea: a review. In: Nayara Guetten Ribaski. Practices And Challenges In The Agricultural Sciences. Curitiba: Editora Reflexão acadêmica, 2025. p. 23-53.

37. Palmero, F.; Fernandez, J. A.; Garcia, F. O.; Haro, R. J.; Prasad, P. V.; Salvagiotti, F.; Ciampitti, I. A. A quantitative review into the contributions of biological nitrogen fixation to agricultural systems by grain legumes. *Eur. J Agron.* 136, 126514, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2022.126514>

38. Pardo-Diaz, S.; Romero-Perdomo, F.; Mendoza-Labrador, J.; Delgadillo-Duran, D.; Castro-Rincon. E.; Silva, A.M.; Rojas-Tapias, D.F.; Cardoso, E.J.; Estrada-Bonilla, G, A. Endophytic PGPB improves Plant Growth and Quality and modulates the Bacterial Community of an Intercropping System. *Front. Sustainable Food Syst.* 2021, 5, 715270. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.715270>

39. Pegoraro, R.F.; Almeida Neta, M.N.; Costa, C.A.; Sampaio, R.A.; Fernandes, L.A.; Rodrigues, M.N. Chickpea production and soil chemical attributes after phosphorus and molybdenum fertilization. *Cienc. Agrotec.* 2018, 42, 474-483. <https://doi.org/10.1590/1413-70542018425011618>

40. Perera, M.R.; Vanstone, V.A.; Jones, M.G. A novel approach to identify plant parasitic nematodes using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* RCM 2005, 19, 1454–1460. <https://doi.org/10.1002/rcm.1943>

41. Pramanik, K.; Mitra, S.; Sarkar, A.; Soren, T.; Maiti, T.K. Characterization of cadmium resistant *Klebsiella pneumoniae* MCC 3091 promoted rice seedling growth by

alleviating phytotoxicity of cadmium. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2017, 24, 24419. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0033-z>

42. Quintas-Nunes, F.; Rossi, M. J.; Nascimento, F. X. Genomic insights into the plant-associated lifestyle of *Kosakonia radicincitans* MUSA4, a diazotrophic plant-growth-promoting bacterium. *Syst. Appl. Microbiol.* 2022, 45. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2022.126303>

43. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, 2020, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>

44. Racioppo, A.; d'Amelio, A.; De Santis, A.; Bevilacqua, A.; Corbo, M. R.; Sinigaglia, M. Potential. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria to Enhance Growth and Soil Fertility in Marginal Areas: Focus on the Apulia Region, Italy. *Agronomy* 2023, 13(12), 2983. <https://doi.org/10.3390/agronomy13122983>

45. Rana, K. L.; Kour, D.; Kaur, T.; Devi, R.; Yadav, A. N.; Yadav, N.; Saxena, A. K. Endophytic microbes: biodiversity, plant growth-promoting mechanisms and potential applications for agricultural sustainability. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2020, 113, 1075-1107. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01429-y>

46. Riaz, U.; Murtaza, G.; Qadir, A.A.; Rafi, F.; Qazi, M.A.; Javid, S.; Tauseef, M.; Shakir, M. Biofertilizers: A Viable Tool for Future Organic Agriculture. In: Dar, G.H., Bhat, R.A., Mehmood, M.A., Hakeem, K.R. (eds) *Microbiota and Biofertilizers*, Vol 2. Springer, 2021. Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-61010-4\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-030-61010-4_16)

47. Romanyà, J.; Casals, P. Biological nitrogen fixation response to soil fertility is species-dependent in annual legumes. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 2019, 20, 546-556. <https://doi.org/10.1007/s42729-019-00144-6>

48. Sandrin, T.R.; Goldstein, J.E.; Schumaker, S. MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: A review. *Mass Spectrom. Rev.* 2013, 32, 188. <https://doi.org/10.1002/mas.21359>

49. Soe, K. M.; Htwe, A. Z.; Moe, K.; Tomomi, A.; Yamakawa, T. Diversity and effectivity of indigenous *Mesorhizobium* strains for chickpea (*Cicer arietinum* L.) in Myanmar. *Agronomy* 2020, 10(2), 287. <https://doi.org/10.3390/agronomy10020287>

50. Tedesco, M.J.; Volkweiss, S.J.; Bohnen, H. Análise de solo, plantas e outros materiais. UFRGS, Porto Alegre, Brasil, 1995.

51. Tena, W.; Wolde-Meskel, E.; Degefu, T.; Walley, F. Genetic and phenotypic diversity of rhizobia nodulating chickpea (*Cicer arietinum* L.) in soils from southern and

Central Ethiopia. *Can. J. Microbiol.* 2017, 63, 690–707. <https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0776>

52. Tong, C.Y.; Honda, K.; Derek, C.J.C. A Review on Microalgal-Bacterial Co-Culture: The Multifaceted Role of Beneficial Bacteria towards Enhancement of Microalgal Metabolite Production. *Environ. Res.* 2023, 228, 115872. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115872>

53. Torres-Sangiao, E.; Leal Rodriguez, C.; García-Riestra, C. Application and Perspectives of MALDI–TOF Mass Spectrometry in Clinical Microbiology Laboratories. *Microorganisms* 2021, 9, 1539. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071539>

54. Valentine, N.B.; Wahl, J.H.; Kingsley, M.T.; Wahl, K.L. Direct surface analysis of fungal species by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* RCM 2002, 16, 1352–1357. <https://doi.org/10.1002/rcm.721>

55. Verma, G.; Yadav, D.D.; Kumar, A.; Singh, R.; Babu, S.; Avasthe, R. K.; Sharma, VK. Impact of fertility levels and biofertilizers on root architecture, yield and nutrient uptake of chickpea (*Cicer arietinum* L.) *Crop. Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 2020, 9, 2018–2024. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.902.230>

56. Wolde-Meskel, E.; Heerwaarden, J. V.; Abdulkadir, B.; Kassa, S.; Aliyi, I.; Degefu, T.; Wakweya, K.; Kanampiu, F.; Giller, K. E. Additive yield response of chickpea (*Cicer arietinum* L.) to *Rhizobium* inoculation and phosphorus fertilizer across mall holder farms in Ethiopia. *Agric. Ecosyst. Environ.* 2018, 261, 144–152. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.01.035>

57. Yano, D.M.Y.; Farris, M.G.; Umino, C.Y.; Coutinho, H.L.C.; Canhos, V.P. Técnicas para cultivo, identificação e preservação de bactérias. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, 1993. 64p. il.

58. Zhang, J.; Chen, W.; Shang, Y.; Guo, C.; Peng, S.; Chen, W. Biogeographic distribution of chickpea rhizobia in the world. *Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture*, Chapter 19 outline, 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818469-1.00020-1>

59. Zhang, J.; Wang, N.; Li, S.; Wang, J.; Feng, Y.; Wang, E.; Li, Y.; Yang, T.; Chen, W. The Effect of Different Rhizobial Symbionts on the Composition and Diversity of Rhizosphere Microorganisms of Chickpea in Different Soils. *Plants* 2023, 12, 3421. <https://doi.org/10.3390/plants12193421>

### 3.4 Capítulo 4

#### 3.4.1 Artigo 4 - Avaliação de inoculantes com rizobactérias nativas e sua interação com adubação orgânica na promoção de crescimento do grão-de-bico

##### RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar um inoculante produzido com bactérias nativas de solo tropical e sua interação com adubação orgânica na promoção de crescimento vegetal de grão-de-bico. O experimento foi realizado em campo, no delineamento em blocos casualizados com quatro repetições, em esquema fatorial  $2 \times 4 + 1$ , consistindo de ausência e presença de adubação orgânica; quatro inoculantes (sem inoculação-SI, inoculação com Mix 1 de bactérias – *Klebsiella variicola*, *Bacillus cereus*, *Rhizobium radiobacter*, *Mesorhizobium* sp1 e Mix 2 – *Kosakonia radicincitans*, *Pseudomonas monteilii*, *Enterobacter asburiae*, *Mesorhizobium* sp1; e um tratamento adicional, correspondendo a adubação mineral com N, P e K. Foram avaliadas as rizobactérias quanto a sua produção de compostos bioquímicos responsáveis pela solubilização de nutrientes, fixação de nitrogênio e promoção de crescimento. As análises mostraram que os tratamentos com inoculação e adubação orgânica propiciaram aumento na formação de nódulos, acúmulo de nutrientes e biomassa das plantas, o que sugere que a adubação orgânica pode estimular o crescimento bacteriano, melhorando o desenvolvimento das plantas, eficiência de absorção e fixação de nutrientes. Por outro lado, a ausência de adubação orgânica e a falta de inoculação limitou os efeitos benéficos sobre o crescimento das plantas. Concluímos que o Mix1 combinado com o composto orgânico, foi considerado a melhor combinação dentre todos os outros analisados, aumentando em 52% o número de nódulos, 67% o peso de nódulo, 30% a massa seca total, 42,11% o nitrogênio acumulado, 46,67% o fósforo acumulado e 21,43% o potássio acumulado, com relação ao controle. A combinação dessas práticas pode ser adotada como estratégia eficaz para a produção sustentável de cultivos de grão-de-bico.

**Palavras-chave:** *Mesorhizobium*; *Bacillus cereus*; *Rhizobium radiobacter*; *Kosakonia radicincitans*; solubilizadores de nutrientes; Bioinsumos.

##### ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate an inoculant produced with native bacteria from tropical soil and its interaction with organic fertilization in promoting chickpea plant growth. The field experiment was conducted in a randomized block design with four replications, using a  $2 \times 4 + 1$  factorial scheme consisting of the absence and presence of organic fertilization; four inoculant treatments (no inoculation—NI, inoculation with Mix 1 of bacteria: *Klebsiella variicola*, *Bacillus cereus*, *Rhizobium radiobacter*, *Mesorhizobium* sp. 1; Mix 2: *Kosakonia radicincitans*, *Pseudomonas monteilii*, *Enterobacter asburiae*, *Mesorhizobium* sp. 1); and an additional treatment corresponding to mineral fertilization with N, P, and K. The rhizobacteria were evaluated for their production of biochemical compounds responsible for nutrient solubilization, nitrogen fixation, and growth promotion. The analyses showed that treatments with inoculation combined with organic fertilization increased nodule formation, nutrient accumulation, and plant biomass, suggesting that organic fertilization may stimulate bacterial growth, thereby improving plant development, nutrient uptake, and nitrogen fixation efficiency. On the other hand, the absence of organic fertilization and the lack of inoculation limited the beneficial effects on plant growth. We concluded that Mix 1 combined with organic compost was considered the best combination among all those analyzed, increasing nodule number by 52%, nodule weight by 67%, total dry mass by 30%, accumulated nitrogen by 42.11%, accumulated phosphorus by 46.67%, and accumulated potassium by 21.43% compared with the control. The combination of these practices can be adopted as an effective strategy for the sustainable production of chickpea crops.

**Keywords:** *Bacillus cereus*, Biofertilizers, *Rhizobium radiobacter*, *Kosakonia radicincitans*, *Mesorhizobium*, nutrient solubilizers.

## INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e o aprimoramento de técnicas de cultivo que priorizem o manejo adequado do solo tornam-se cada vez mais relevantes (Hamid *et al.*, 2021). A manutenção e promoção da diversidade de organismos edáficos, particularmente microrganismos benéficos, têm sido apontadas como estratégias promissoras para aumentar a eficiência produtiva dos sistemas agrícolas (Riaz *et al.*, 2021).

No Brasil, estima-se que a fixação biológica de nitrogênio (FBN) nas lavouras de soja, por exemplo, gera uma economia de cerca de US\$ 10,2 bilhões por ano, reduzindo a necessidade de fertilizantes sintéticos nitrogenados, como a ureia. Em culturas como milho,

trigo, arroz e cana-de-açúcar, o potencial de economia com bioinsumos chega a US\$ 5,1 bilhões por ano, com reduções de emissão de 18,5 milhões de toneladas de CO<sub>2</sub> eq (Embrapa, 2025).

Já o cultivo das leguminosas, principalmente a soja, além da economia direta, a redução do uso de fertilizantes sintéticos reduz a emissão de gases de efeito estufa, uma vez que a FBN evita a liberação de 430 milhões de toneladas de CO<sub>2</sub> eq por ano, contribuindo para solos mais saudáveis e sistemas agrícolas mais sustentáveis. O custo de aplicação de inoculantes é pequeno, varia entre R\$ 8,00 a R\$ 15, 00 por hectare, principalmente quando se comparado aos R\$ 500,00 a 906,00 por hectare com ureia, o que representa uma economia de até R\$ 898,00/ha somente na cultura da soja (Olmo, *et al.*, 2022; Embrapa, 2025)

Dentre os microrganismos do solo, aqueles capazes de estabelecer relações simbióticas com plantas, como as bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico, têm papel fundamental na agricultura de base biológica. Tradicionalmente, espécies do gênero *Rhizobium* foram consideradas as principais responsáveis pela FBN em leguminosas. No entanto, avanços recentes revelam a diversidade de bactérias associadas a nódulos radiculares, incluindo microrganismos dos gêneros, *Pantoea*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Enterobacter* (Deng *et al.*, 2020; Zaw *et al.*, 2021; Palmero *et al.*, 2022). Além da FBN, esses microrganismos atuam como promotores de crescimento vegetal, por meio da produção de ácido indol-3-acético (AIA), sideróforos, 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminase, enzimas hidrolíticas e compostos antimicrobianos (Gopalakrishnan *et al.*, 2015). Estratégias de coinoculação envolvendo rizóbios e microrganismos promotores de crescimento vegetal, não nodulantes têm apresentado efeitos sinérgicos no crescimento e desenvolvimento de leguminosas (Mukhtar *et al.*, 2020).

Neste contexto, o grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) tem despertado crescente interesse, tanto pelo seu potencial produtivo quanto pelo seu valor nutricional, principalmente devido ao alto teor de proteína. Além disso, é uma cultura rústica, com baixa incidência de pragas e doenças, e boa tolerância ao déficit hídrico, o que a torna muito promissora para cultivo em regiões semiáridas, com bons resultados produtivos no cerrado brasileiro: em sistemas de sequeiro, produtividades comerciais variam entre 2.000 kg ha<sup>-1</sup>, enquanto em áreas irrigadas já foram registrados rendimentos acima de 3.000 kg ha<sup>-1</sup>, chegando a 3.600 kg ha<sup>-1</sup> com a cultivar BRS Aleppo (Avelar *et al.*, 2018). Em experimentos conduzidos em Montes Claros (MG) com semeadura em maio, observou-se produtividade média de 5,300 kg ha<sup>-1</sup>, e em Januária (MG), entre 3,0 e 5,3 t ha<sup>-1</sup>, reforçando o alto potencial produtivo da cultura no Norte de Minas (Avelar, *et al.*, 2018).

O grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) destaca-se como leguminosa responsiva à simbiose com microrganismos fixadores de nitrogênio, sua capacidade de nodulação eficiente e resposta positiva à inoculação com cepas específicas (Flowers *et al.*, 2010; Almeida Neta *et al.*, 2020; Padilha *et al.*, 2025). A compatibilidade entre as cepas bacterianas e o genótipo da planta hospedeira é essencial para o sucesso da simbiose e da nutrição nitrogenada (Etesame *et al.*, 2022). Apesar do potencial agrônomo da cultura, no Brasil, a identificação de rizóbios nativos associados ao grão-de-bico ainda é incipiente, enquanto países como Myanmar e Austrália já avançaram no isolamento de cepas locais de *Mesorhizobium* para uso em inoculantes (Hill *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2023).

Paralelamente, o uso de compostos orgânicos provenientes de estações de tratamento urbano de esgoto tratado, como fonte orgânica de nutrientes tem se consolidado como prática sustentável, capaz de melhorar a fertilidade e a saúde do solo. Sua aplicação no solo tem favorecido a ciclagem de nutrientes e o melhoramento físico, especialmente no que diz respeito à estruturação do solo e ao aumento da fertilidade (Bicalho *et al.*, 2024; Pegoraro *et al.*, 2024). O lodo é rico em matéria orgânica, macronutrientes (N e P) e micronutrientes essenciais (Fe, Zn, Cu, Mg), sendo alternativa promissora na formulação de fertilizantes orgânicos e organominerais (Pereira *et al.*, 2020; Viana *et al.*, 2025). Além de fornecer nutrientes, o lodo estimula a biomassa microbiana, a atividade enzimática e a diversidade funcional do solo, fatores diretamente ligados à melhoria da nodulação e da simbiose em leguminosas (Souza *et al.*, 2020; Pegoraro *et al.*, 2024). A aplicação controlada do resíduo, em doses adequadas, mostrou-se segura e eficaz, promovendo ganhos comparáveis aos obtidos com fertilizantes minerais, sem comprometer os processos biológicos do solo.

Embora haja escassez de estudos específicos sobre o efeito do lodo de esgoto no grão-de-bico, evidências oriundas de outras leguminosas indicam seu potencial para melhorar a nodulação e favorecer a colonização por microrganismos promotores de crescimento vegetal. Assim, a integração entre o uso de adubação orgânica com lodo e a inoculação de sementes com bactérias nativas pode representar abordagem sinérgica para o fortalecimento da simbiose e do desempenho agrônomo do grão-de-bico e outras leguminosas em solos tropicais e semiáridos. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar inoculantes produzidos com rizobactérias nativas de solo tropical e a interação com adubação orgânica na promoção de crescimento vegetal de grão-de-bico.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Localização da área e condições experimentais*

O estudo foi conduzido em área experimental do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, situado no município de Montes Claros (16°43'41'' S, 43°51'54'' W), região norte do estado, a 638 metros de altitude. O clima da região é Aw (tropical), o solo da área foi classificado como Cambissolo Háptico de textura média (Alvares *et al.*, 2013). Cultivos sucessivos de grão-de-bico foram realizados na área por seis anos (2016-2022) antes da implantação deste experimento, que foi realizado no ano de 2023.

Antes da implantação do estudo foram coletadas amostras de solo (10 amostras simples para uma amostra composta) na profundidade 0-20 cm, para caracterização física e química: pH (H<sub>2</sub>O): 5,7; P (Mehlich 1): 37,4 mg dm<sup>-3</sup>; P remanescente: 34,5 mg L<sup>-1</sup>; K (Mehlich 1): 380,5 mg dm<sup>-3</sup>; Ca: 6,81 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Mg: 2,05 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Al (KCl): 0,00 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; H+Al: 0,89 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; SB: 9,84 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; t:9,84 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; m: 0,0%; T: 10,73 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; V: 91,68 %; Matéria orgânica: 21,11 g kg<sup>-1</sup>; areia grossa: 13,60 g kg<sup>-1</sup>; areia fina: 20,40 g kg<sup>-1</sup>; silte: 36,00 g kg<sup>-1</sup>; argila: 30,00 g kg<sup>-1</sup>.

O experimento foi realizado em campo, no delineamento em blocos casualizados com quatro repetições, no esquema fatorial 2 x 4 + 1, consistindo de ausência e presença de adubação orgânica; quatro inoculantes (sem inoculação-SI, inoculação com *Mesorhizobium* sp1, inoculação com Mix 1 de bactérias – *Klebsiella variicola*, *Bacillus cereus*, *Rhizobium radiobacter*, *Mesorhizobium* sp1 e Mix 2 – *Kosakonia radicincitans*, *Pseudomonas monteilii*, *Enterobacter asburiae*, *Mesorhizobium* sp1); mais um tratamento adicional, correspondendo a adubação mineral com N, P e K (Mineral). A recomendação de adubação foi realizada de acordo com Pegoraro *et al.*, (2018) e Almeida Neta *et al.*, (2021) e as misturas de compostos orgânicos e fertilizantes para composição dos tratamentos foi descrita (tabela 1).

**Tabela 1:** Recomendação de adubação, compostos orgânicos e fertilizantes para composição dos tratamentos, para os tratamentos: sem composto e sem inoculação; sem composto e inoculação com *Mesorhizobium* sp1; sem composto e inoculação com Mix 1 de bactérias – *Klebsiella variicola*, *Bacillus cereus*, *Rhizobium radiobacter*, *Mesorhizobium* sp1; sem composto e inoculação com Mix 2 – *Kosakonia radicincitans*, *Pseudomonas monteilii*, *Enterobacter asburiae*, *Mesorhizobium* sp1); com composto e sem inoculação; com composto e inoculação com *Mesorhizobium* sp1; com composto e inoculação com Mix 1 de bactérias – *Klebsiella variicola*, *Bacillus cereus*, *Rhizobium radiobacter*, *Mesorhizobium* sp1; com composto e inoculação com Mix 2 – *Kosakonia radicincitans*, *Pseudomonas monteilii*, *Enterobacter asburiae*, *Mesorhizobium* sp1); tratamento adicional, correspondendo a adubação mineral com N, P e K (Mineral).

Tratamento	N	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O	Composto
	----- kg ha <sup>-1</sup> -----			

<b>1. Sem composto e inoculação</b>	20	150	40	0
<b>2. Sem composto, <i>Mesorhizobium</i> sp1</b>	20	150	40	0
<b>3. Sem composto, Mix 1</b>	20	150	40	0
<b>4. Sem composto, Mix 2</b>	20	150	40	0
<b>5. Com composto, sem inoculação</b>	0	150	40	2433.33
<b>6. Com composto, <i>Mesorhizobium</i> sp1</b>	0	150	40	2433.33
<b>7. Com composto, Mix 1</b>	0	150	40	2433.33
<b>8. Com composto, Mix 2</b>	0	150	40	2433.33
<b>9. Adubação mineral (Mineral)</b>	100*	150	40	0

Fontes utilizadas de fertilizantes: N, ureia (46% de N); P, superfosfato simples (18% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) e K, cloreto de potássio (48% de K<sub>2</sub>O). \* Foram aplicados 20 kg ha<sup>-1</sup> de N na semeadura e 80 kg ha<sup>-1</sup> em cobertura nos primeiros 30 dias após a germinação.

### *Origem e preparo do composto*

A matéria prima utilizada para experimentação foi adquirida no município de Montes Claros – MG. O resíduo de serragem, oriundo da madeira do jatobá (*Hymenaea courbaril* L) foi fornecido por Indústria Madeireira e o lodo de esgoto coletado na Estação de Tratamento de Esgotos de Montes Claros (ETE Vieira), no mês de julho de 2022. O composto passou por tratamento biológico anaeróbico em reatores. A água residuária desses reatores seguiu para filtros biológicos aeróbios. Na fase final do tratamento do composto, foi realizado o processo de decantação, possibilitando que a água tratada fosse lançada no corpo hídrico receptor. O lodo de esgoto passou pelos processos de centrifugação e secagem térmica a 350 °C, por 30 minutos, gerando resíduo sólido classe A, de acordo com a resolução 498/2020 - Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA/Brasil 2020). A caracterização físico-química do lodo: teores de nitrogênio (16,46 g kg<sup>-1</sup>), pH (6,17 g kg<sup>-1</sup>), fósforo (14,14 dag/kg), potássio (9,23 ctmol/kg), cálcio (16,36 ctmol/kg), magnésio (1,64 ctmol/kg), enxofre (17,74 ctmol/kg), carbono orgânico total (391,4 dag/kg), carbono lábil (25,03 dag/kg), Capacidade de troca catiônica (618,0 mmol kg<sup>-1</sup>), (Bicalho *et al.*, 2024).

### *Origem e preparo dos inoculantes*

Foram produzidos três inoculantes diferentes, todos com microrganismos eram nativos, isolados de nódulos radiculares de grão-de-bico, e identificados de acordo com Padilha *et al.*, (2025). Os microrganismos foram crescidos em placa de petri em meio de ágar YEM e analisado a pureza delas, antes do preparo do inoculante (Figura 1. B). Os inoculantes foram preparados em meio BHI Broth, meio de cultura líquido, rico em nutrientes, derivado da infusão

de cérebro e coração bovino, o que o torna adequado para o cultivo de microrganismos exigentes, a concentração do inoculante foi de  $1 \times 10^8$  UFC por mL. A inoculação das sementes foi realizada em capela de fluxo laminar para evitar contaminação. A dose utilizada foi determinada com base na recomendação do inoculante comercial, sendo a dose de 100 mL para cada 60.000 sementes.

#### *Análises bioquímicas das bactérias isoladas das raízes do grão-de-bico*

##### *Produção de ácido indol-3-acético (AIA)*

Utilizou-se 1 mL de meio TSB (caldo soja tripticaseína) suplementado com DL-triptofano na concentração de  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  em placa estéril tipo “deep well”, em seguida inoculou-se 5  $\mu\text{L}$  da cultura bacteriana no meio de cultura. As amostras foram incubadas a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  por 5 dias, com agitação de 100 rpm. Após este período centrifugou-se as unidades formadoras de colônias a 4.000 rpm por 15 minutos. Após a centrifugação 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi transferido para microplaca, onde foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  do reagente Salkowski, e incubou-se as amostras em temperatura ambiente, no escuro, por 20 minutos (Figura 1 I) (Lana *et al.*, 2017). Foi analisado absorvância de 530nm. A concentração de AIA produzida pelos isolados bacterianos foi comparada a uma curva padrão gerada a partir de soluções padrão de AIA comercial (Myo *et al.*, 2019).

##### *Solubilização de Fosfato*

Foi utilizado agár Pikovskaya contendo fosfato tricálcico para a triagem da capacidade de solubilização de fosfato (Pikovskaya *et al.*, 1948). As bactérias foram inoculadas pontualmente em 5 pontos da placa de petri (Figura 1 F). A capacidade dos isolados de utilizar P inorgânico neste meio específico foi analisada após 7 dias de incubação a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  avaliando a formação de zona de halo ao redor de colônias bacterianas, indicando solubilização de fosfato. O crescimento de bactérias no meio foi registrado como valores arbitrários fraco (+), moderado (++) , forte (+++) ou negativo (-).

Também foi realizada a estimativa quantitativa da solubilização de fosfato pelo método de extração de fósforo na resina, onde as amostras foram inoculadas em caldo Pikovskaya e incubados a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  por 6 dias. Em seguida adicionadas resinas aniônicas previamente saturadas com  $\text{NaHCO}_3$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ; foram agitadas por duas horas (110 – 120 rpm). Logo após foram lavadas com jatos de água destilada e adicionadas em frasco contendo

40 mL de HCl 0,5 mol L<sup>-1</sup>. As amostras foram deixadas em repouso durante uma hora para liberar CO<sub>2</sub> e depois agitar por 30 min em agitador horizontal. Logo após foi adicionado 3 mL do extrato de eluição foi pipetado e misturado ao reagente fosfo-molibdato e incubado por 10 min (Figura 1 G). A absorvância foi registrada a 880nm usando um espectrofotômetro, usando o equipamento Thermo Tecan Chisto Infinite M Nano (Elhaissofi *et al.*,2020).

#### *Fixação de Nitrogênio*

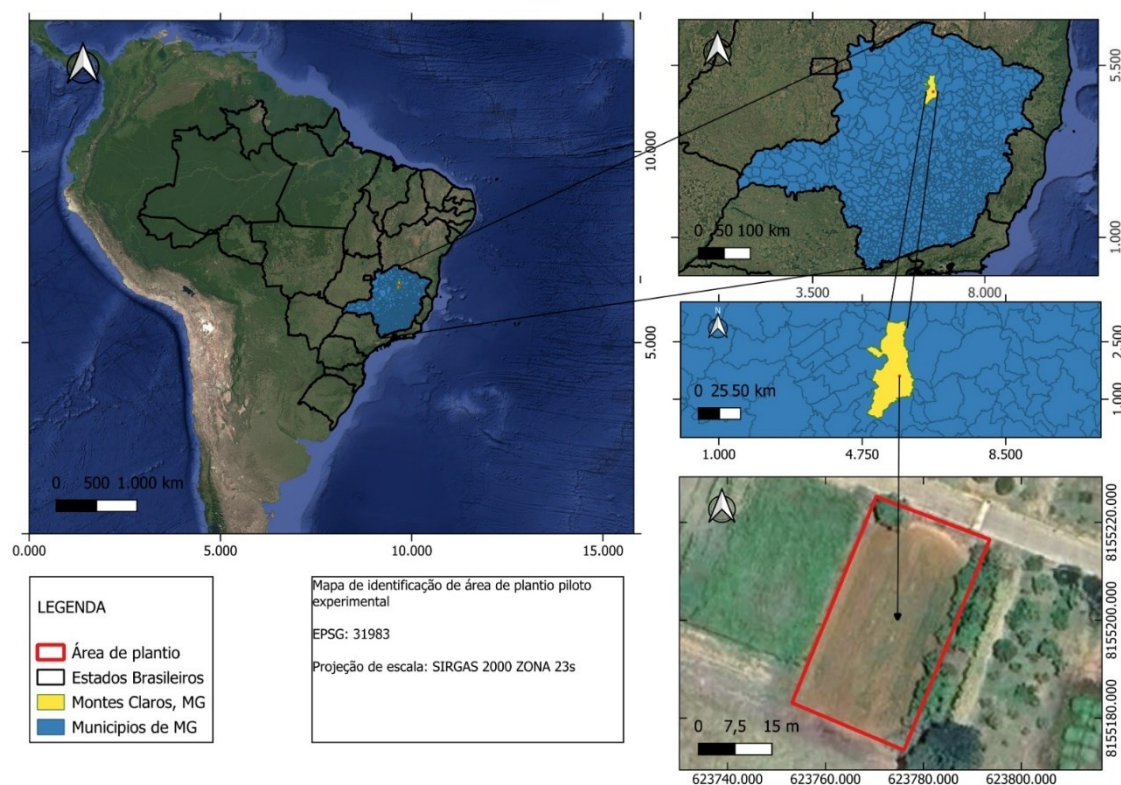
A capacidade de fixação de nitrogênio foi observada testando a capacidade das bactérias em crescer no meio mineral sem adição de nitrogênio. Para isso foi utilizado o meio NFM (Mirza e Rodrigues 2012). As bactérias isoladas foram inoculadas pontualmente em placa de petri (Figura 1 C). Após 3 dias de incubação a 28 °C, o crescimento de bactérias no meio foi registrado como valores arbitrários: fraco (+), moderado (++) , forte (+++) ou negativo (-) (Mirza e Rodrigues 2012). A fim de evidenciar o halo formado, foi adicionado um corante vermelho para registro fotográfico (Figura 1 D).

#### *Solubilização de Potássio*

A capacidade dos isolados de solubilizar potássio foi avaliada pela inoculação pontual de isolados bacterianos no meio Aleksandrov conforme o método de Hu *et al.*, (2006). As placas foram incubadas a 28° C por 5 dias. A formação de uma zona de depuração ao redor das manchas indicou a solubilização de potássio (Figura1 E), o crescimento de bactérias no meio foi registrado como valores arbitrários: fraco (+), moderado (++) , forte (+++) ou negativo (-), (Mir *et al.*, 2021).

#### *Semeadura, condução do estudo e características avaliadas nas plantas de grão-de-bico*

O grão-de-bico 'BRS Cristalino' foi semeado em maio de 2023, no espaçamento 0.5 x 0.10 x m em parcelas com dimensões 2 x 2 m e quatro linhas, sendo utilizado as 10 plantas das duas linhas centrais como parcela útil para avaliação experimental (Figura 1).



**Figura 1.** Localização geográfica da área de estudo. Mapa mostrando a localização do Brasil, da região de Montes Claros (MG) e da área experimental da Universidade Federal de Minas Gerais – Instituto de Ciências Agrárias, campus de Montes Claros.

As plantas de grão-de-bico foram cultivadas com irrigação por microaspersão, o controle de pragas e plantas daninhas foi feito de forma manual, com catação de lagartas e capina, respectivamente. O estudo foi conduzido até pleno florescimento (aproximadamente 70 dias após o plantio), período corresponde ao pico de atividade dos nódulos, momento em que foram coletadas as plantas para análises.

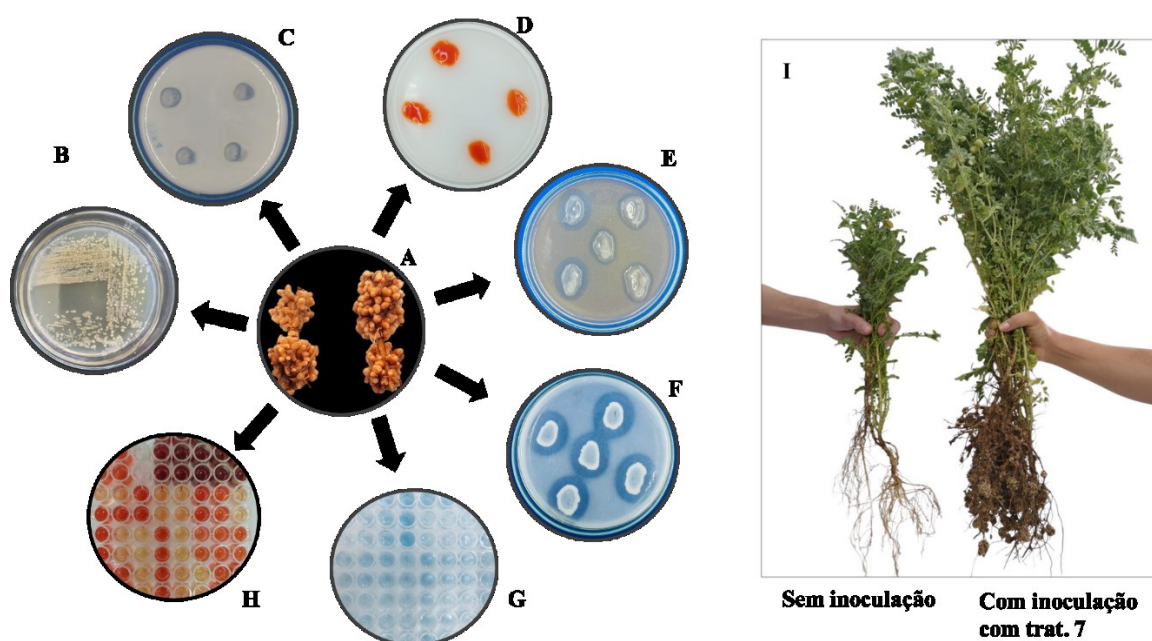
#### *Separação de nódulos radiculares e caracterizações*

As plantas foram colhidas 70 dias após o plantio, em plena floração, uma vez que este período corresponde ao pico de atividade dos nódulos. Foram colhidas dez plantas inteiras de cada parcela experimental. As plantas foram acondicionadas em sacos plásticos e levadas ao laboratório para posteriores análises. As raízes foram lavadas e os nódulos radiculares contados (número de nódulos por planta) e separados para análise anatômica. Também foi determinada a massa seca, onde os nódulos foram secos em estufa de circulação forçada a 65 °C até atingirem peso constante. Após a secagem foi realizado a massa seca de cada compartimento em balança analítica.

*Caracterização dos componentes de produção e determinação do teor de Nitrogênio, Fósforo, Potássio*

As amostras de parte aérea e raiz foram secas em estufa a 65 °C até peso constante e, em seguida, foram moídas em moinho tipo Wiley com peneira de malha de 2 mm e homogeneizadas. Após a secagem, foi realizada a medição da massa seca de cada compartimento em balança analítica e seguiu-se para a determinação do teor de nitrogênio pelo método de Kjeldahl (Bremner *et al.*, 1965). Por sua vez, para a determinação de fósforo e potássio, foi usado o método Tedesco (Tedesco *et al.*, 1995). Os acúmulos de nitrogênio, fósforo e potássio, na parte aérea e raízes, foram calculados multiplicando a massa seca do componente pelo teor de nitrogênio e dividindo o resultado por 100.

Foi realizada análise dos seguintes componentes: Número de nódulos (NunN); Massa fresca do nódulo (MFN); Massa seca da parte aérea (MSPA); Massa seca da raiz (MSR); Massa seca total (MST); Teor nitrogênio na raiz (TNR); Teor nitrogênio na parte aérea (TNPA); Teor nitrogênio total na planta (TNT); Teor fósforo na raiz (TPR); Teor fósforo nas parte aérea (TPPA); Teor fósforo total na planta (TPT); Teor potássio na raiz (TKR); Teor de potássio na parte aérea (TKPA); Teor potássio total na planta (TKR).



**Figura 2.** Nódulos radiculares de grão-de-bico (A), culturas purificadas em meio de ágar YEM (B), desenvolvimento de halo indicando solubilização de nitrogênio (C, D), coloração com fucsina básica do halo, isolados mostrando zonas de halo indicaram solubilização de potássio (E), desenvolvimento de coloração azul indicando solubilização

de fosfato (F), desenvolvimento de coloração rosa indicando produção de IAA (J), plantas de grão-de-bico sem inoculação e com inoculação (tratamento 2) (K).

### *Análises estatísticas*

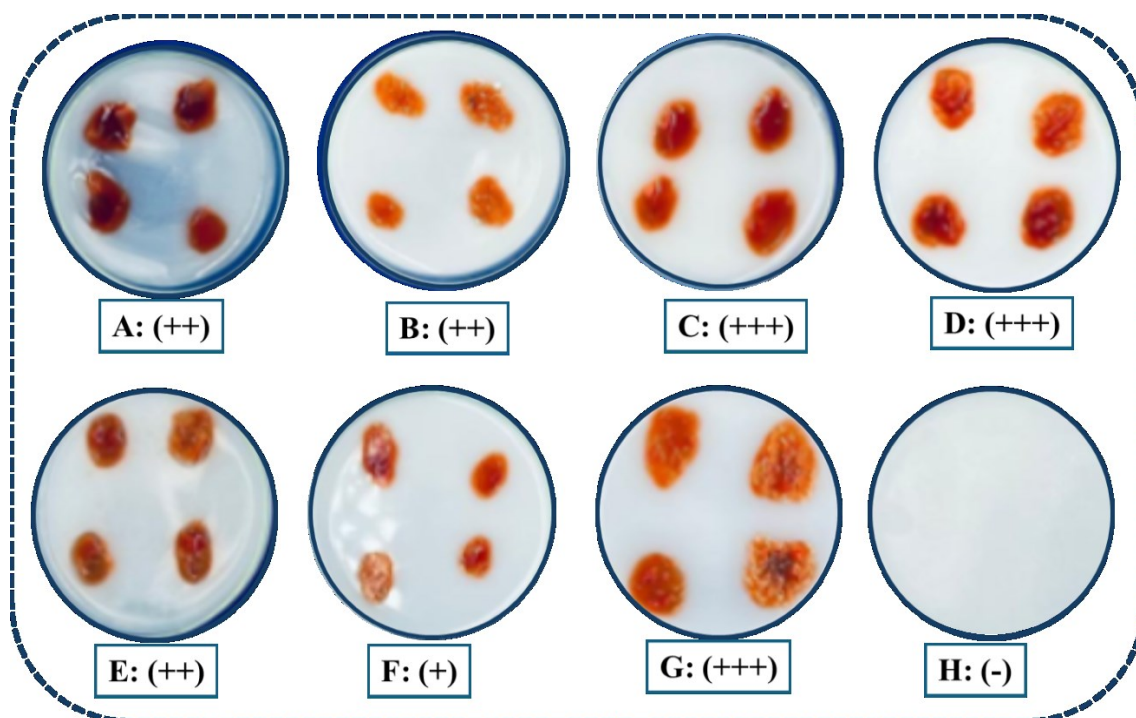
Os parâmetros agrônômicos (número de nódulos, peso fresco dos nódulos, relação raiz/parte aérea, produção de massa seca, teor de nitrogênio, teor de potássio e teor de fósforo) do experimento em campo, e os parâmetros de indução do crescimento vegetal pelas bactérias (produção de AIA e solubilização de fosfato), foram submetidos à análise de variância e teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ) no software estatístico R (R Core Team, 2020).

## RESULTADOS

### *Análises bioquímicas dos microrganismos usados para produção do inoculante*

#### *Fixação de Nitrogênio*

Todos os isolados bacterianos apresentaram capacidade de crescer em meio de cultura sem a presença de N, possivelmente essas colônias bacterianas realizaram fixação de nitrogênio para manter o seu crescimento em meio NFM (Figura 3).



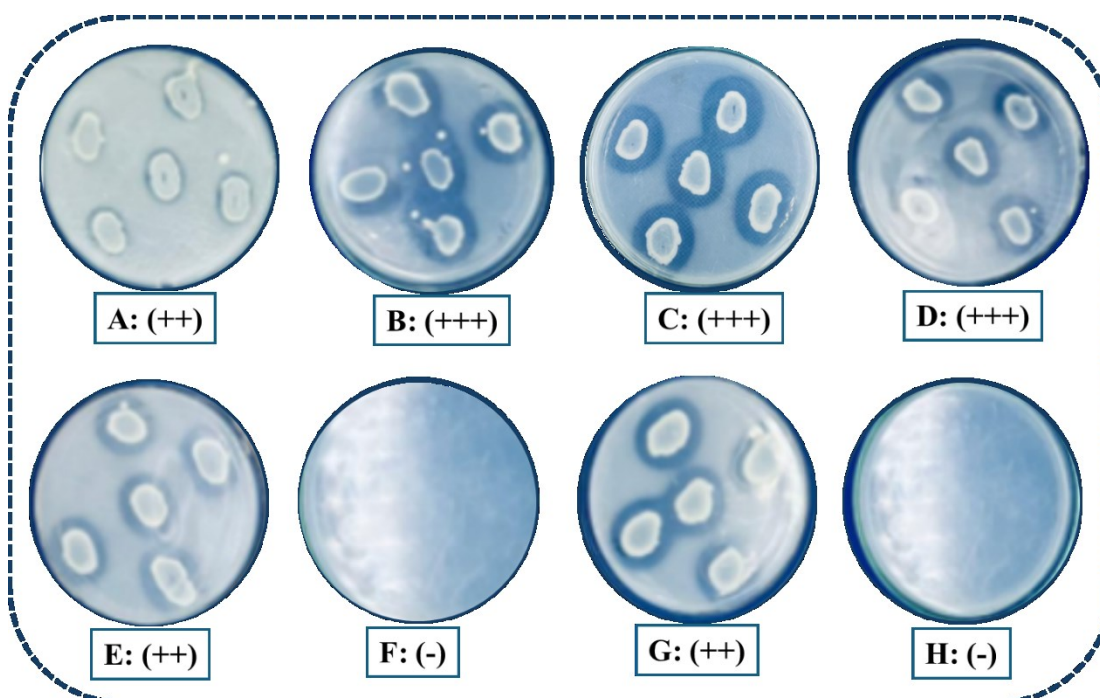
**Figura 3:** Fixação de Nitrogênio: Crescimento do halo em meio NFM e caracterização pelo crescimento bacteriano (atribuída a quatro classes de visualização: fraco (+), moderado (++) e forte (+++)) após 3 dias de incubação a 28 °C, com aplicação de corante, após a incubação dos

isolados a 28° C por 5 dias. *Klebsiella variicola* (A); *Enterobacter asburiae* (B); *Mesorhizobium* sp1, (C); *Kosakonia radicincitans* (D); *Bacillus cereus* (E); *Pseudomonas monteilii* (F); *Rhizobium radiobacter* (G); Controle (H).

O crescimento considerado forte no meio de cultura sem nitrogênio foi observado em *Rhizobium radiobacter*, *Mesorhizobium* sp1, *Kosakonia radicincitans*; moderado em *Klebsiella variicola*, *Enterobacter asburiae*, *Bacillus cereus* e fraco para *Pseudomonas monteilii* (Figura 3).

#### Solubilização de Fosfato

A formação de zona de halo ao redor de colônias bacterianas indicou solubilização de fosfato (Figura 4). O crescimento forte foi observado nas cepas *Enterobacter asburiae*, *Mesorhizobium* sp1, *Kosakonia radicincitans*, moderado em *Rhizobium radiobacter* e *Bacillus cereus*; fraco em *Pseudomonas monteilii*.



**Figura 4:** Solubilização de Fosfato: Crescimento do halo e caracterização pelo crescimento bacteriano (atribuída a quatro classes de visualização: (atribuída a quatro classes de visualização: fraco (+), moderado (++), forte (+++) e negativo (-)) em agár Pikovskaya contendo fosfato tricálcico analisada após 7 dias de incubação a 28 °C. *Klebsiella variicola* (A); *Enterobacter asburiae* (B); *Mesorhizobium* sp1, (C); *Kosakonia radicincitans* (D); *Bacillus cereus* (E); *Pseudomonas monteilii* (F); *Rhizobium radiobacter* (G); Controle (H); evidenciação do halo (I).

As bactérias mais eficientes em solubilização de fosfato em meio líquido foram, *Klebsiella variicola* e *Bacillus cereus*. Observou-se capacidade de solubilização de P nos



colônias bacterianas. A colônia de *Rhizobium radiobacter* foi responsável pela maior produção de AIA, com  $8,60 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Tabela 3), seguida pela *Klebsiella variicola*, com  $7,14 \mu\text{g mL}^{-1}$ , do *Mesorhizobium* sp1 com  $6,49 \mu\text{g mL}^{-1}$ , da *Enterobacter asburiae* e *Kosakonia radicincitans*, com 5,25 e  $4,09 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Os demais isolados tiveram as menores concentrações de AIA e não diferiram entre si.

**Tabela 3:** Concentrações de AIA, fósforo (P) e diâmetro de halo na solubilização de P (cm) formado em meio de cultura, para os isolados.

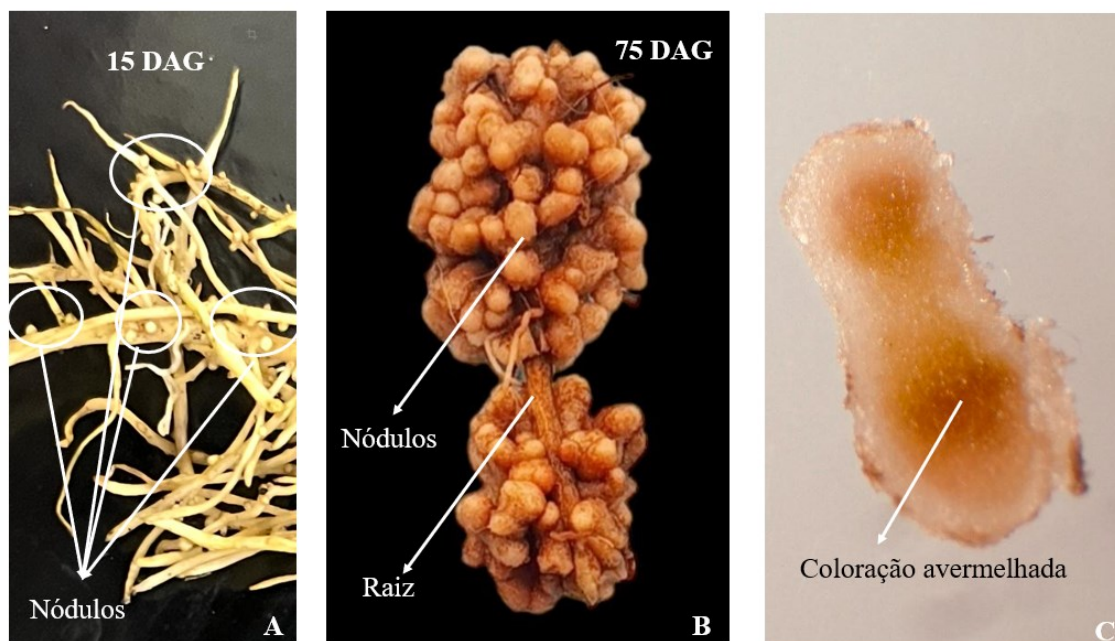
Microrganismos	AIA	P
	----- $\mu\text{g mL}^{-1}$ -----	
<i>Klebsiella variicola</i>	7.14b	24.06a
<i>Enterobacter asburiae</i>	5.25d	22.77b
<i>Mesorhizobium</i> sp1	6.49c	19.34c
<i>Kosakonia radicincitans</i>	4.09d	21.42b
<i>Bacillus cereus</i>	3.21e	24.05a
<i>Rhizobium radiobacter</i>	8.60a	21.15b
<i>Pseudomonas monteilii</i>	2.43e	18.47c
Controle	2.41e	22.46b
Média	4.81	22.89
CV (%)	12.99	10.39
p-valor	0.001	0.001

CV (%): Coeficiente de variação percentual; p-valor: médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de média ao nível de significância de 5%.

### ***Características agronômicas do grão-de-bico***

#### *Avaliação dos nódulos radiculares*

A inoculação com as bactérias promotoras de crescimento vegetal levou à intensa formação de nódulos radiculares. Observou-se surgimento de nódulos radiculares 15 dias após a germinação (Figura 6 A). No período de plena floração todos os nódulos apresentaram características anatômicas semelhantes (Figura 6 B). A partir das imagens, é visível que os isolados bacterianos nodulares aderiram estritamente às superfícies radiculares da planta inoculada. Foi observada a presença da leg-hemoglobina o que indica a viabilidade dos nódulos, ou seja, que há a fixação de nitrogênio atmosférico (Figura 6 C).



**Figura 6:** Visualização da iniciação do crescimento dos nódulos radiculares com 15 dias após a germinação (A); Nódulos formados com 75 dias após a germinação aderidos as raízes (B); Nódulo seccionado apresentando a coloração avermelhada indicando a presença da leg-hemoglobina.

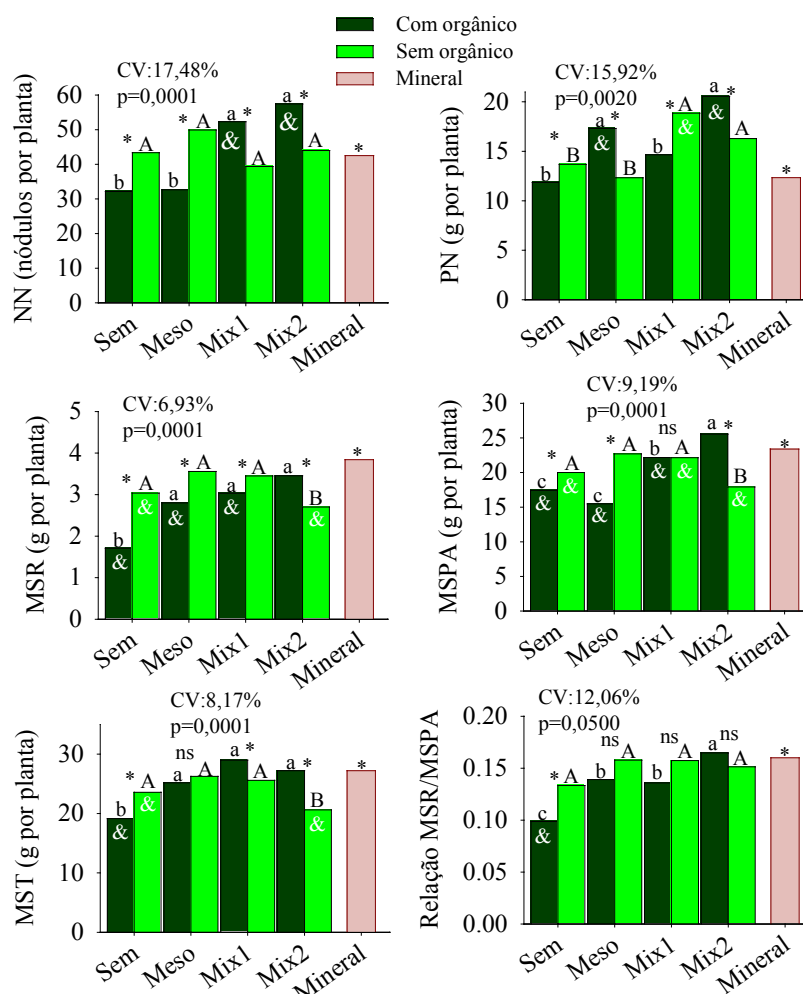
#### *Número de nódulos*

Os tratamentos Mix 1 e Mix 2 propiciaram maior número de nódulos em comparação aos demais (Figura 2), com médias superiores a 50 nódulos por plantas, enquanto no tratamento o tratamento sem inoculação teve 32 nódulos por planta. Esses tratamentos (Mix 1 e Mix 2) também aumentaram o número de nódulos nas raízes de grão-de-bico em comparação àquele com adubação mineral. Na ausência de adubação orgânica, os tratamentos com inoculação não diferiram entre si e da adubação mineral (Figura 8). A adição dos inoculantes na forma de Mix 1 e Mix 2 também estimularam a nodulação de plantas em comparação aos mesmos tratamentos sem adubação com compostos orgânicos, enquanto a aplicação isolada de *Mesorhizobium* sp1 aumentou o número de nódulos das plantas que não receberam adubação orgânica.

#### *Peso de nódulos*

Nos tratamentos com adubação orgânica, observou-se diferença estatística entre inoculantes para massa seca de nódulos (Figura 8), com destaque para os tratamentos com *Mesorhizobium* sp1 e Mix 2, com médias superiores aos demais e ao tratamento com adubação mineral. Na ausência de adubação orgânica, a inoculação com Mix 1 e Mix 2 também aumentou o peso de nódulos em comparação aos demais tratamentos (Figura 2). A adição de

*Mesorhizobium* sp1 e Mix 2 em associação a adubação orgânica aumentaram em 33% e 56% a massa seca de nódulos nas raízes das plantas em comparação com o controle.



**Figura 8.** Características agrônomicas: (NN) número de nódulos; (PN) peso de nódulos; (MSR) massa seca da Raiz; (MSPA) massa seca da parte aérea; (MST) Massa seca total; (MSR/MSPA) relação da massa seca da raiz/massa seca da parte aérea, para os tratamentos sem inoculação, inoculação com *Mesorhizobium* sp1, Mix 1: *Klebsiella variicola*, *Bacillus cereus*, *Rhizobium radiobacter*, *Mesorhizobium* sp1, Mix 2: *Kosakonia radicincitans*, *Pseudomonas monteilii*, *Enterobacter asburiae*, *Mesorhizobium* sp1 e adubação mineral. Médias seguidas de letras minúsculas distintas para comparação entre inoculantes na presença de adubação orgânica (Com orgânico) ou maiúsculas distintas entre inoculantes na ausência de adubação orgânica (Sem orgânico) diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ). \*, ns: indica diferença significativa, ou não significativa, respectivamente, entre adubações com ou sem orgânico, pelo teste F da ANOVA, ou para adubação mineral em comparação as demais pelo teste de Dunnett; &: indica diferença significativa entre as médias de tratamentos e adubação mineral (tratamento adicional) pelo teste de Dunnett.

#### Massa seca de raízes, parte aérea e total

A inoculação com rizobactérias em associação a adubação orgânica aumentaram a produção de matéria seca de raízes, parte aérea e total no grão-de-bico em comparação a ausência de inoculação e contribuíram para obtenção de matéria seca semelhante àquela

observada nos tratamentos com adubação mineral (Figura 8). No entanto, na ausência de adubação orgânica, a inoculação com Mix 2 causou menor produção de matéria seca na planta em comparação a adubação mineral e o tratamento sem inoculação.

#### *Relação raiz/parte aérea*

A inoculação com Mix 2, na presença de adubação orgânica, aumentou a relação raiz/parte aérea em comparação aos demais inoculantes e a ausência de inoculação (Figura 8). A adição de inoculantes, com ou sem adubação orgânica não propiciou alterações na relação raiz/parte aérea das plantas de grão-de-bico em comparação ao tratamento com adubação mineral. Esse manejo (adubação mineral) também propiciou maior relação raiz/parte aérea das plantas em comparação àquele sem inoculação e com adubação orgânica.

#### *Acúmulo de nutrientes no grão-de-bico*

Os fatores adubação orgânica e inoculação tiveram interação significativa ( $p \leq 0.05$ ) para acúmulo dos nutrientes nitrogênio na parte aérea e total da planta, fósforo nas raízes e total, potássio nas raízes, parte aérea e total da planta (Figura 9). Não se obteve efeito significativo da interação entre tratamentos ou de fatores isolados para acúmulo de nitrogênio nas raízes e fósforo na parte aérea. Com os resultados obtidos foi possível observar as porcentagens de rendimento para acúmulo de nutrientes no grão-de-bico com aplicação de adubação orgânica e sem aplicação de adubação orgânica, reforçando a hipótese de que os microrganismos envolvidos contribuem para a solubilização e troca catiônica desse nutriente (Tabela 4).

**Tabela 4:** Porcentagem de rendimento para acúmulo de nutrientes no grão-de-bico com aplicação de adubação orgânica e sem aplicação de adubação orgânica: (N) Nitrogênio na raiz, Nitrogênio na parte aérea, Nitrogênio acumulado na planta, (P) Fósforo na raiz, Fósforo na parte aérea, Fósforo acumulado na planta, (K) Potássio na raiz, Potássio na parte aérea, Potássio acumulado na planta, (NN) número de nódulos; (PN) peso de nódulos; (MSR) massa seca da Raiz; (MSPA) massa seca da parte aérea; (MST) Massa seca total; (MSR/MSPA) relação da massa seca da raiz/massa seca da parte aérea para os tratamentos: inoculação com *Mesorhizobium* sp1, Mix 1: *Klebsiella variicola*, *Bacillus cereus*, *Rhizobium radiobacter*, *Mesorhizobium* sp1, Mix 2: *Kosakonia radicincitans*, *Pseudomonas monteilii*, *Enterobacter asburiae*, *Mesorhizobium* sp1 e adubação mineral, em comparação com o tratamento sem inoculação.

Variável / Tratamentos	Meso (%)	Mix1 (%)	Mix2 (%)	Mineral (%)
<b>NN com orgânico</b>	43,00	52,00	48,00	29,00
<b>NN sem orgânico</b>	29,00	43,00	41,00	27,00
<b>PN com orgânico</b>	33,00	67,00	56,00	11,00
<b>PN sem orgânico</b>	39,00	65,00	61,00	17,00
<b>MSR com orgânico</b>	46,00	54,00	54,00	64,00

<b>MSR sem orgânico</b>	36,00	43,00	29,00	71,00
<b>MSPA com orgânico</b>	33,00	39,00	33,00	61,00
<b>MSPA sem orgânico</b>	32,00	38,00	22,00	55,00
<b>MST com orgânico</b>	24,00	30,00	26,00	47,00
<b>MST sem orgânico</b>	20,00	30,00	15,00	45,00
<b>Relação MSR/MSPA com orgânico</b>	50,00	50,00	50,00	67,00
<b>Relação MSR/MSPA sem orgânico</b>	29,00	33,00	42,00	67,00
<b>N raiz com orgânico</b>	6,06	6,06	7,58	0,00
<b>N raiz sem orgânico</b>	1,35	0,00	1,35	0,00
<b>N parte aérea com orgânico</b>	12,00	28,00	20,00	24,00
<b>N parte aérea em orgânico</b>	14,81	29,63	22,22	14,81
<b>N acumulado com orgânico</b>	21,05	42,11	31,58	36,84
<b>N acumulado sem orgânico</b>	13,04	30,43	17,39	13,04
<b>P raiz com orgânico</b>	20,00	26,67	20,00	33,33
<b>P raiz sem orgânico</b>	25,00	31,25	25,00	25,00
<b>P parte aérea com orgânico</b>	11,76	17,65	11,76	0,00
<b>P parte aérea sem orgânico</b>	5,56	11,11	11,11	0,00
<b>P acumulado com orgânico</b>	33,33	46,67	40,00	33,33
<b>P acumulado sem orgânico</b>	23,53	35,29	29,41	17,65
<b>K raiz com orgânico</b>	14,29	26,81	19,05	9,52
<b>K raiz sem orgânico</b>	13,04	21,74	17,39	0,00
<b>K parte aérea com orgânico</b>	16,67	27,78	16,67	5,56
<b>K parte aérea sem orgânico</b>	15,79	26,32	15,79	5,26
<b>K acumulado com orgânico</b>	10,71	21,43	14,29	7,14
<b>K acumulado sem orgânico</b>	10,00	20,00	10,00	0,00

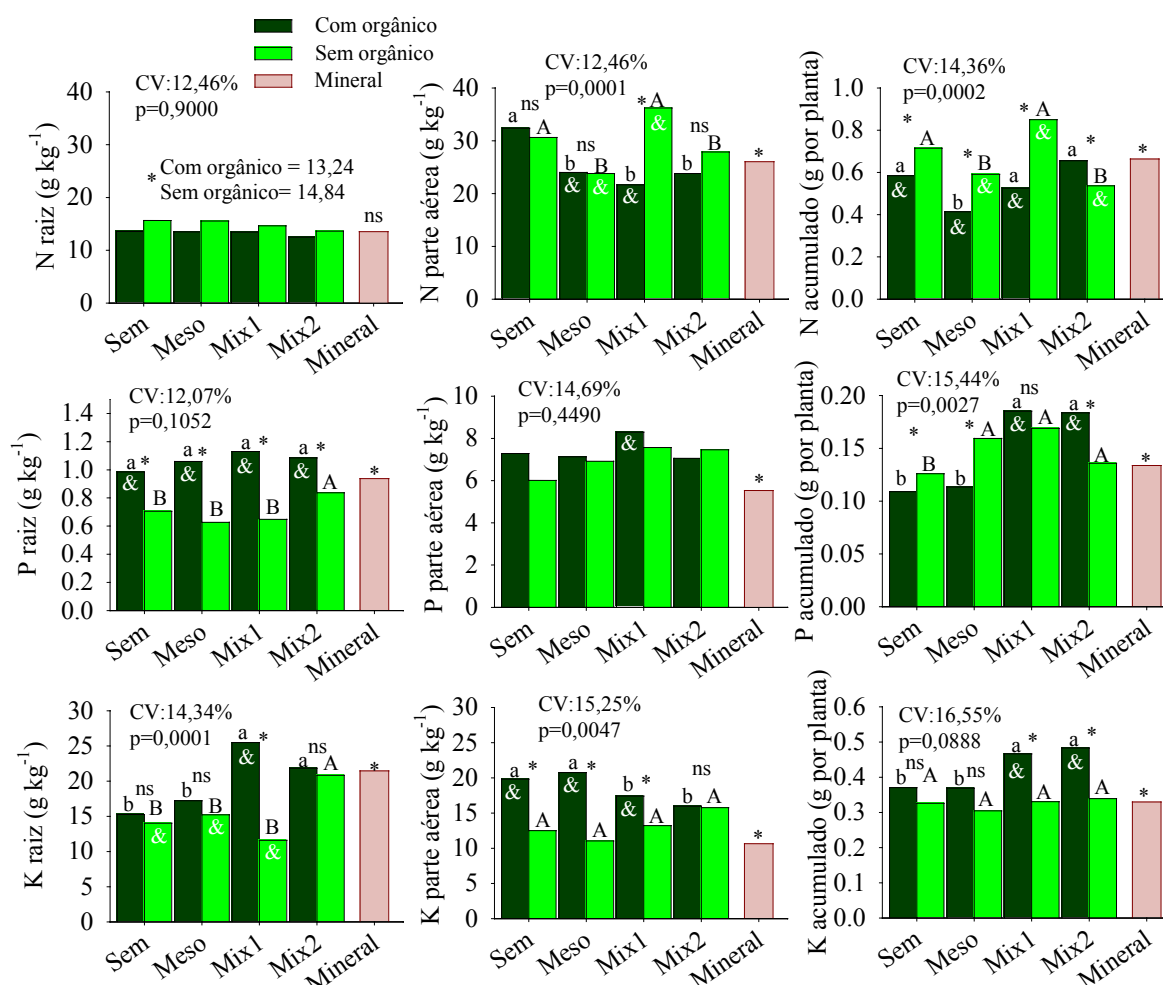
#### *Nitrogênio acumulado na planta*

A inoculação com Mix 1 de rizobactérias e na ausência de adubação propiciou os maiores acúmulos de nitrogênio na parte aérea e total das plantas de grão-de-bico em comparação aos demais tratamentos e a adubação mineral (Figura 9). No entanto, observou-se que na presença de adubação orgânica a maioria dos tratamentos que receberam inoculação tiveram menor acúmulo de N na parte aérea e total em comparação a adubação mineral e tratamentos que não receberam adubação orgânica.

#### *Fósforo acumulado na planta*

Sob adubação orgânica, a inoculação com os tratamentos Mix 1 e Mix 2 aumentaram o acúmulo de fósforo na planta (total) em comparação a inoculação com *Mesorhizobium* sp1, ausência de inoculação e adubação mineral, enquanto nas plantas que não receberam fertilizante orgânico, os três inoculantes utilizados (*Mesorhizobium* sp1 Mix 1 e Mix 2) aumentaram o

acúmulo total de fósforo, em comparação àquelas sem inoculação (Figura 9). A adubação orgânica também estimulou a absorção de fósforo nas raízes das plantas, com isso, maiores acúmulos foram observados nos tratamentos que receberam ou não inoculação, em comparação àqueles sem adubação orgânica e mineral. Maiores acúmulos de fósforo na parte aérea das plantas também foram obtidos após a adubação orgânica e adição do Mix 1 de bactérias, comparativamente ao tratamento que recebeu somente adubação mineral.



**Figura 9.** Acúmulo de nutrientes no grão-de-bico: (N) Nitrogênio na raiz, Nitrogênio na parte aérea, Nitrogênio acumulado na planta, (P) Fósforo na raiz, Fósforo na parte aérea, Fósforo acumulado na planta, (K) Potássio na raiz, Potássio na parte aérea, Potássio acumulado na planta, para os tratamentos sem inoculação, inoculação com *Mesorhizobium* sp1, Mix 1: *Klebsiella variicola*, *Bacillus cereus*, *Rhizobium radiobacter*, *Mesorhizobium* sp1, Mix 2: *Kosakonia radicincitans*, *Pseudomonas monteilii*, *Enterobacter asburiae*, *Mesorhizobium* sp1 e adubação mineral. Médias seguidas de letras minúsculas distintas para comparação entre inoculantes na presença de adubação orgânica (Com orgânico) ou maiúsculas distintas entre inoculantes na ausência de adubação orgânica (Sem orgânico) diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ). \*, ns: indica diferença significativa, ou não significativa, respectivamente, entre adubações com ou sem orgânico, pelo teste F da ANOVA, ou para adubação mineral em comparação as demais tratamentos pelo teste de Dunnett. &: indica diferença significativa entre as médias de tratamentos e adubação mineral pelo teste de Dunnett.

*Potássio acumulado na planta*

A absorção de potássio foi estimulada pela inoculação com bactérias e adubação orgânica, com isso, na presença dos inoculantes Mix 1 e Mix 2 e adubação orgânica o acúmulo total de potássio foi 21 e 14 % maior em comparação com o controle (Figura 9). A interação entre fatores também contribuiu para identificação de inoculantes e adubações que foram eficazes no acúmulo de potássio, com destaque para o Mix 2 na ausência de adubação orgânica para acúmulo do nutriente nas raízes; *Mesorhizobium* sp1 sob adubação orgânica para acúmulo do nutriente na parte aérea; e Mix 1 e Mix 2 sob adubação orgânica para acúmulo total de potássio nas plantas de grão-de-bico.

## DISCUSSÃO

### *Análises bioquímicas dos isolados presentes no inoculante*

As bactérias endofíticas de nódulos radiculares de grão-de-bico utilizadas para produção de inoculantes foram testadas *in vitro* para avaliação da produção de substâncias promotoras do crescimento de vegetal. Nesse contexto, podemos observar que os isolados de *Rhizobium radiobacter* tiveram maior capacidade de solubilização de AIA e fixação de nitrogênio (Figura 3, Tabela 3). Bactérias promotoras do crescimento de plantas são relatadas por exercerem efeitos benéficos no crescimento, desenvolvimento e aquisição de nutrientes das plantas por vários mecanismos, incluindo produção de IAA, solubilização de fosfato, fixação de nitrogênio e bioantagonismo (Abdel-Hamid *et al.*, 2021; Kumar *et al.*, 2023).

Por muitas décadas, bactérias do gênero *Rhizobium* foram consideradas a única fixadora de nitrogênio habitante de nódulos de leguminosas. Estudos recentes relataram que um número de proteobactérias estão presentes em nódulos de ampla gama de leguminosas, como *Pantoea*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Enterobacter* (Gopalakrishnan *et al.*, 2018), estas possuem capacidades de fixação de nitrogênio. E algumas dessas bactérias diazotróficas também demonstraram capacidade de promoção de crescimento e aumento de rendimento de grãos (Martinez-Hidalgo e Hirsch, 2017). Como relatado na literatura, neste estudo também foram observadas outras bactérias diazotróficas presentes nos nódulos radiculares de grão-de-bico que apresentaram capacidade de promoção de crescimento vegetal e solubilização e fixação de nutrientes.

A bactéria do gênero *Bacillus* apresentou valor significativos ( $p \leq 0.05$ ), para solubilização de fosfato ( $24.05 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), *Rhizobium radiobacter* para solubilização de AIA ( $8.60 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e fixação de N. Bactérias promotoras de crescimento (*Azotobacter*

*chromococcum*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus pumilis*) isoladas da rizosfera de plantas de grão-de-bico foram testadas in vitro quanto a sua produção de hormônios, solubilização de fosfato e produção de sideróforos por Pandey *et al.*, (2019), essas bactérias exibiram a produção de AIA entre 20 e 35,34  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Nossos resultados mostraram que as bactérias associadas a nódulos de raízes são promissoras para aumentar a nodulação, promoção de crescimento e produção em grão-de-bico. Estudos semelhantes ao nosso estudando isolados dos nódulos de raízes de grão-de-bico e caracterizados in vitro para habilidades de promoção do crescimento da planta, foi observado a capacidade de *Pantoea dispersa* e *Bacillus* em de produzir ácido indol acético em níveis variados, solubilizador de fosfato, além de todos conseguirem crescer em meio de cultura sem N (Tariq *et al.*, 2023).

Em nosso estudo observamos que as bactérias do gênero *Enterobacter*, apresentaram forte solubilização de K e P. Estudos realizados por Verma *et al.*, (2020) obtiveram resultados semelhantes aos nossos com cepas bacterianas (*Enterobacter* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp., *Pantoea* sp. e *Mixta* sp) em grão-de-bico e os isolados produziram quantidade significativa de Indol-3-ácido acético (AIA) (*Enterobacter hormaechei*), fosfato solubilizado, K e  $\text{NH}_3$  (*Bacillus subtilis*) e inibiram o crescimento do *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* (*Pseudomonas aeruginosa*).

Bactérias endofíticas demonstraram solubilizar fosfato e melhorar o crescimento de várias espécies vegetais (Varga *et al.*, 2020; Mei *et al.*, 2021). A atividade de solubilização de fosfato das bactérias fornece às plantas fósforo solúvel alterando o fósforo imobilizado, resultando em melhor crescimento e desenvolvimento (Tian *et al.*, 2021; De Zutter *et al.*, 2022). Assim como o P, AIA desempenha papel fundamental no crescimento e desenvolvimento das plantas promovendo divisão celular (Majda e Robert 2018), desencadeando o alongamento da raiz (Li *et al.*, 2022).

Nossos isolados possuíam diferentes características de promoção de crescimento vegetal, que podem ser responsáveis pela absorção de nutrientes, pelo aumento do crescimento da planta, outros estudos relataram aumento significativo na absorção de N, P e K por plantas de grão-de-bico inoculadas com *Mesorhizobium* sp. e *Pseudomonas* sp. e *Rhizobium* sp. em comparação ao tratamento controle não inoculado, os autores relataram que o aumento da absorção de N, P e K em grão-de-bico inoculado com os diferentes isolados ocorreu devido a maior capacidade de fixação de nitrogênio, fosfato e solubilização de potássio (Verma *et al.*, (2020).

### *Características agronômicas e acúmulo de nutrientes no grão-de-bico*

Os resultados obtidos demonstram que os tratamentos com aplicação de inoculantes e adubação orgânica, especialmente os Mix1 e Mix2, promoveram incrementos significativos nos principais parâmetros agronômicos do grão-de-bico. Esses efeitos positivos indicam a eficácia da coinoculação de bactérias simbióticas e promotoras de crescimento vegetal, fortalecendo a simbiose com a cultura e a eficiência da fixação biológica de nitrogênio (FBN).

O Mix1 (*Klebsiella variicola*, *Bacillus cereus*, *Rhizobium radiobacter*, *Mesorhizobium* sp1) e Mix2 (*Kosakonia radicincitans*, *Pseudomonas monteilii*, *Enterobacter asburiae*, *Mesorhizobium* sp) promoveram os maiores ganhos em nodulação, com aumento de até 52% no número de nódulos e de até 67% no peso dos nódulos por planta (Tabela 4). Resultados semelhantes foram relatados por Verma *et al.*, (2020), que observaram aumento de 86% na nodulação do grão-de-bico com coinoculação de *Mesorhizobium* sp e bactérias solubilizadoras. A presença de matéria orgânica no solo parece ter potencializado esses efeitos, como apontado por Abdiev *et al.*, (2019) sugerindo que a adubação orgânica atua como facilitadora da interação planta-microrganismo.

A massa seca da raiz (MSR) e da parte aérea (MSPA) aumentaram significativamente com os inoculantes, com destaque para Mix1 + composto orgânico, que apresentou elevações de até 54% na MSR, com relação ao controle (Tabela 4). Esses resultados indicam que os microrganismos utilizados não apenas estimulam o crescimento radicular, mas também promovem um desenvolvimento mais equilibrado da parte aérea, reforçando a importância das associações simbióticas para a fisiologia geral da planta (Shahid *et al.*, 2021). A adubação mineral, embora tenha promovido aumento expressivo de até 71% na MSR, mostrou efeito inferior nos parâmetros ligados à FBN e absorção de fósforo e potássio, o que reforça o papel promissor dos bioinsumos como alternativas sustentáveis.

O acúmulo de nitrogênio total na planta aumentou significativamente com o uso, especialmente o Mix1, que apresentou ganho de até 42,1% com adubação orgânica (Tabela 4). Esse resultado corrobora com estudos anteriores que destacam a eficiência de isolados de *Mesorhizobium* na fixação de nitrogênio (Wolde-Meskel *et al.*, 2018; Padilha *et al.*, 2025). Além disso, os efeitos sobre o fósforo foram bastante expressivos, com Mix1+composto orgânico promovendo um aumento de até 46,7% no acúmulo total, valor superior ao obtido com adubação mineral, que mostrou baixa mobilização do nutriente na parte aérea. Isso pode estar associado à atividade de bactérias solubilizadoras e à melhoria da microbiota do solo em presença de matéria orgânica (Uzinger *et al.*, 2020; Kominko *et al.*, 2022). A adubação orgânica

mostrou sinergia importante com os inoculantes, elevando a eficiência de absorção de nutrientes por meio da melhoria das características físicas e químicas do solo, como relatado por Ghorbani *et al.*, (2022).

Estudos anteriores indicam que o uso combinado de compostos orgânicos e microrganismos benéficos, como observado em *Phaseolus vulgaris* e outras leguminosas, é eficaz para aumentar a biomassa e a absorção de nutrientes (Kumar *et al.*, 2022; Ai *et al.*, 2020). A maior biomassa radicular observada em alguns tratamentos está diretamente associada à capacidade de absorção de nutrientes, o que reforça o papel da adubação orgânica em favorecer a estrutura do solo e a colonização microbiana benéfica.

A hipótese do estudo, que postula que bactérias nativas promotoras de crescimento e fixadoras de nitrogênio podem estabelecer interações eficazes com o grão-de-bico, foi confirmada. As bactérias isoladas demonstraram elevado potencial simbiótico e contribuíram para a sustentabilidade do cultivo, especialmente em ambientes semiáridos.

Os dados indicam que o uso de inoculantes promoveu melhorias significativas em parâmetros agronômicos importantes do grão-de-bico, como nodulação, desenvolvimento radicular e acúmulo de biomassa. A combinação com inoculação e adubação orgânica, foi superior ao controle (Figura 2I), potencializando ainda mais os efeitos, mostrando sinergia entre bioinsumos e fontes orgânicas. Para os três inoculantes desenvolvidos e testados neste trabalho, o mais eficiente foi o Mix1: *Klebsiella variicola*, *Bacillus cereus*, *Rhizobium radiobacter*, *Mesorhizobium* sp1, aumentam significativamente o acúmulo de nutrientes no grão-de-bico em comparação ao controle, superando inclusive a adubação mineral. A adição de adubo orgânico potencializa ainda mais esses efeitos, possivelmente por melhorar a atividade microbiana no solo e fornecer nutrientes de liberação lenta. Isso sugere que a utilização de inoculantes combinados com práticas orgânicas pode ser uma estratégia promissora para o manejo sustentável da cultura do grão-de-bico.

## CONCLUSÕES

Em conclusão, os resultados deste estudo demonstram que o inoculante, principalmente os Mix, testados com bactérias promotoras de crescimento vegetal nativas, isoladas no local de cultivo, aliada à adição de composto orgânico, foram eficazes para promover o crescimento do grão-de-bico.

As bactérias que produziram maiores concentrações de AIA, foi *Rhizobium radiobacter*, que apresentaram maior halo no teste de solubilizam P em placa de petri, foram

*Enterobacter asburiae*, *Mesorhizobium* sp1, *Kosakonia radicincitans*, bactérias mais eficientes em solubilização de fosfato em meio líquido foram, *Klebsiella variicola* e *Bacillus cereus*, que mais solubilizaram potássio foram para *Klebsiella variicola*, *Enterobacter asburiae*, *Kosakonia radicincitans*, *Bacillus cereus*, *Rhizobium radiobacter* e que fixaram nitrogênio, foi *Rhizobium radiobacter*.

O Mix1: *Klebsiella variicola*, *Bacillus cereus*, *Rhizobium radiobacter*, *Mesorhizobium* sp1, combinado com o composto orgânico, aumentou em 52% o número de nódulos, 67% o peso de nódulo, 30% a massa seca total, 42,11% o nitrogênio acumulado, 46,67% o fósforo acumulado e 21,43% o potássio acumulado, com relação ao controle, sendo considerado a melhor combinação dentre todos os outros analisados.

## REFERÊNCIAS

ABDEL-HAMID MS, FOU DA A, EL-ELA HK, EL-GHAMRY AA, HASSAN SE (2021) Plant growth-promoting properties of bacterial endophytes isolated from roots of *Thymus vulgaris* L. and investigate their role as biofertilizers to enhance the essential oil contents. *Biomol Concepts* 12:175–196. <https://doi.org/10.1515/bmc-2021-0019>

ABDIEV, A., KHAITOV, B., TODERICH, K., & PARK, K. W. (2019). Growth, nutrient uptake and yield parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.) enhance by *Rhizobium* and *Azotobacter* inoculations in saline soil. *Journal of Plant Nutrition*, 42, 2703-2714. <https://doi.org/10.1080/01904167.2019.1655038>

AVELAR, R. I. S.; COSTA, C. A. DA., ROCHA, F. DA S., OLIVEIRA, N. L, C. DE; NASCIMENTO, W. M. Yield of chickpeas sown at different times. *Rev. Caatinga*, Mossoró, v. 31, n. 4, p. 900 – 906, out. – dez., 2018. <https://doi.org/10.1590/1983-21252018v31n412rc>

AI, Y.-J.; LI, F.-P.; GU, H.-H.; CHI, X.-J.; YUAN, X.-T.; HAN, D.-Y. Combined Effects of Green Manure Returning and Addition of Sewage Sludge Compost on Plant Growth and Microorganism Communities in Gold Tailings. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2020, 27, 31686–31698. Symbiotic Effectiveness, Rhizosphere Competence and Nodule Occupancy of Chickpea Root Nodule Bacteria from Soils in Kununurra Western Australia and Narrabri New South Wales Australia. *Plants* 2025, 14, 809. <https://doi.org/10.3390/plants14050809>

ALVARES CA, STAPE JL, SENTELHAS PC, GOLÇALVES JLM, SPAROVEK G. Koppen's climate classification map for Brazil. 2013 *Meteorol Zeitschrift* 22(6):711-728.

ARTHIKALA, M. K., BLANCO, L. AFFANTRANGER, X. A., GUZMAN, J. M.; LARA, M.; NANJAREDDY, K. Identification of CBL and CIPK Gene Families and Functional

characterization of PvCIPK7 as an Essential Regulator of Root Nodule Development and Nitrogen Fixation in *Phaseolus vulgaris*, 2023, *Journal of Plant Biology*, DOI:10.1007/s12374-023-09402-8

BICALHO, S. F., PEGORARO, R. F., ALMEIDA NETA, M. N., BARROSO, A. M. F., FRANÇA, L. O., SANTOS, L. S., & VIANA, L. B. (2024). Biochemical changes, metal content, and spectroscopic analysis in sewage sludge composted with lignocellulosic residue using FTIR-MIR and FTIR-NIR. *Environmental Science and Pollution Research*, 31(24), 35727-35743. <https://doi.org/10.1007/s11356-024-33652-9>

BREMNER, J.M. Total Nitrogen. *Methods of soil analysis Part 2- Chemical and Microbiological Properties*, number 9 in the series *Agronomy*. American Society of Agronomy, Inc., Publisher USA, p.1149-1178, 1965.

CHU, S.; WU, D.; LIANG, L.L.; ZHONG, F.; HU, Y.; HU, X.; LAI, C.; ZENG, S. Municipal Sewage Sludge Compost Promotes Mangifera Persiciforma Tree Growth with No Risk of Heavy Metal Contamination of Soil. *Sci. Rep.* 2017, 7, 13408.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). Resolução nº 498, de 19 de agosto de 2020. Define critérios e procedimentos para produção e aplicação de biossólido em solos, e dá outras providências. Brasília, DF, 2020.

DENG, Z.-S., KONG, Z.-Y., ZHANG, B.-C., & ZHAO, L.-F. (2020). Insights into non-symbiotic plant growth promotion bacteria associated with nodules of *Sphaerophysasalsula* growing in northwestern China. *Archives of Microbiology*, 202, 399–409. doi: 10.1007/s00203-019-01752-7

ELHAISSOUFI W, KHOURCHI S, IBNYASSER A, GHOULAM C, RCHIAD Z, ZEROUAL

ETESAMI H, GLICK BR. Bacterial indole-3-acetic acid: A key regulator for plant growth, plant-microbe interactions, and agricultural adaptive resilience. *Microbiol Res.* 2024 Apr;281:127602. doi: 10.1016/j.micres.2024.127602. Epub 2024 Jan 11. PMID: 38228017.

FLOWERS TJ, GAUR PM, GOWDA CL, KRISHNAMURTHY L, SAMINENI S, SIDDIQUE KH, TURNER NC, VADEZ V, VARSHNEY RK, COLMER TD. Salt sensitivity in chickpea. *Plant Cell Environ.* 2010 Apr;33(4):490-509. doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.02051.x. Epub 2009 Oct 14. PMID: 19843257

GHORBANI, M.; AMIRAHMADI, E.; ZAMANIAN, K. In-situ Biochar Production Associated with Paddies: Direct Involvement of Farmers in Greenhouse Gases Reduction Policies besides Increasing Nutrients Availability and Rice Production. *Land Degrad. Dev.* 2021, 32, 3893–3904.

GOPALAKRISHNAN S, SATHYA A, VIJAYABHARATHI R, VARSHNEY RK, GOWDA CL, KRISHNAMURTHY L. Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *3 Biotech*. 2015 Aug;5(4):355-377. doi: 10.1007/s13205-014-0241-x. Epub 2014 Aug 3. PMID: 28324544; PMCID: PMC4522733.

GOPALAKRISHNAN, S., SRINIVAS, V., VEMULA, A., SAMINENI, S., RATHORE, A., 2018. Influence of diazotrophic bacteria on nodulation, nitrogen fixation, growth promotion and yield traits in five cultivars of chickpea. *Biocatal. Agric. Biotech.* 15, 35–42.

HAMID, F., YAZDANPANA, M., BARADARAN, M., KHALILIMOGHADAM, B. and AZADI, H., 2021. Factors affecting farmers' behavior in using nitrogen fertilizers: society vs. farmers' valuation in southwest Iran. *Journal of Environmental Planning and Management*, vol. 64, no. 10, pp. 1886-1908. <http://dx.doi.org/10.1080/09640568.2020.1851175>.

HU, X., CHEN, J., GUO, J. (2006). Two phosphate and potassium solubilizing bacteria isolated from Tianmu Mountain, Zhejiang, China. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22, 983–990.

JOHANSEN, D. A. *Plant microtechnique* New York: McGraw-Hill Book, 1940. 523p.

KUMAR, H.; ISHTIYAQ, S.; FAVAS, P. J.; VARUN, M.; PAUL, M. S. Effect of metal-resistant PGPB on the metal uptake, antioxidative defense, physiology, and growth of *Atriplex lentiformis* (Torr.) S. Wats. in soil contaminated with cadmium and nickel. *J. Plant Growth Regul.* 2023, 42(6), 3868-3887. <https://doi.org/10.1007/s00344-022-10853-5>

LANA, U. G. P.; RIBEIRO, V. P.; GOMES, E. A.; OLIVEIRA, C. A. Seleção em Larga Escala de Bactérias Produtoras do Hormônio Ácido Indolacético (AIA), Auxina Associada à Promoção de Crescimento em Plantas. Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2017. 12 p. : il. -- (Documentos / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1518-4277; 218).

LI M, ZHU Y, LI S, ZHANG W, YIN C, LIN Y (2022) Regulation of phytohormones on the growth and development of plant root hair. *Front Plant Sci.* <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.865302>

MAJDA M, ROBERT S (2018) The role of auxin in cell wall expansion. *Int J Mol Sci* 19:951. <https://doi.org/10.3390/ijms19040951>

MARTINEZ-HIDALGO, P., HIRSCH, A.M., 2017. The nodule microbiome: N<sub>2</sub>-fixing rhizobia do not live alone. *Phytobiomes J.* 1, 70–82.

MEI C, CHRETIEN RL, AMARADASA BS, HE Y, TURNER A, LOWMAN S (2021) Characterization of phosphate solubilizing bacterial endophytes and plant growth

promotion in vitro and in greenhouse. *Microorganisms* 9:1935. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091935>

MIR MI, KUMAR BK, GOPALAKRISHNAN S, VADLAMUDI S, HAMEEDA B. Characterization of rhizobia isolated from leguminous plants and their impact on the growth of ICCV 2 variety of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Heliyon*. 2021 Nov 5;7(11):e08321. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e08321. PMID: 34820538; PMCID: PMC8601996.

MIR, M. I., KUMAR, B. K., GOPALAKRISHNAN, S., VADLAMUDI, S., & HAMEEDA, B. (2021). Characterization of rhizobia isolated from leguminous plants and their impact on the growth of ICCV 2 variety of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Heliyon*, 7(11).

MIRZA BS, RODRIGUES JL (2012) Development of a direct isolation procedure for free-living diazotrophs under controlled hypoxic conditions. *Appl Environ Microbiol* 78:5542–5549. <https://doi.org/10.1128/AEM.00714-12>

MUKHTAR, S.; HIRSCH, A. M.; KHAN, N.; MALIK, K. A.; HUMM, E. A.; PELLEGRINI, M.; SHI, B.; BRISCOE, L.; HUNTEMANN, M.; CLUM, A.; FOSTER, B.; FOSTER, B.; ROUX, S.; PALANIAPPAN, K.; VARGHESE, N.; MUKHERJEE, S. REDDY, T. B. K.; DAUM, C.; COPELAND, A.; IVANOVA, NATALIA N.; KYRPIDES, NIKOS C.; SHAPIRO, N.; ELOE-FADROSH, E. A.; MAYMON, M.; MIRZA, M. S.; MEHNAZ, S. American Phytopathological Society (APS Press), Impact of soil salinity on the cowpea nodule-microbiome and the isolation of halotolerant PGPR strains to promote plant growth under salinity stress., (2020), 20219973378, English, Journal article, USA, doi:10.1094/PBIOMES-09-19-0057-R, 2471-2906, 4, (4), St. Paul, Phytobiomes, (364–374).

MYO EM, GE B, MA J, CUI H, LIU B, SHI L, JIANG M, ZHANG K (2019) Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces fradiae* NKZ-259 and its formulation to enhance plant growth. *BMC Microbiol* 19:1–14. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1528-1>

NETA, M. N. A., ALMEIDA, E. S. D., COSTA, C. A. D., NUNES, J. A. D. R., FERNANDES, L. A., & PEGORARO, R. F. (2021). Inoculation of *Bacillus* spp. and nitrogen levels increase chickpea production. *Ciência e Agrotecnologia*, 45, e015421.

OLDROYD, G. E. D. (2023) Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews, Microbiology*, pag. 11.

OLIVEIRA, D.A., FERREIRA, S.C., CARRERA, D.L.R., SERRÃO, C.P., CALLEGARI, D.M., BARROS, N.L.F., COELHO, F.M., & SOUZA, C. R. B. (2021). Characterization of *Pseudomonas* bacteria of *Piper tuberculatum* regarding the production of potentially bio-stimulating compounds for plant growth. *Acta Amazonica*, 51, 10-19. <https://doi.org/10.1590/1809-4392202002311>.

OLMO, R.; WETZELS, S.; ARMANHI, J.S.L.; ARRUDA, P.; BERG, G.; CERNAVA, T.; COTTER, P. D.; ARAUJO, S.C.; DE SOUZA, R. S. C.; FERROCINO, I.; FRISVAD, J. C.; GEORGALAKI, M.; HANSEN, H. H.; KAZOU, M.; KIRAN, G. S.; KOSTIC, T.; KRAUSS-ETSCHMANN, S.; KRIAA, A.; LANGE, L.; MAGUIN, E.; MITTER, B.; NIELSEN, M. O.; OLIVARES, M.; QUIJADA, N. M.; ROMANÍ-PÉREZ, M.; SANZ, Y.; SCHLOTTER, M.; SCHMITT-KOPPLIN, P.; SEATON, S. C.; SELVIN, J.; SESSITSCH, A.; WANG, M.; ZWIRZITZ, B.; SELBERHERR, E.; AND WAGNER, M. (2022). Microbiome research as an effective driver of success stories in agrifood systems – A selection of case studies. *Front. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.834622>

PADILHA, K. S. M. A.; PEGORARO, R. F.; ALMEIDA NETA, M. N.; DUARTE, E. R.; SANGLARD, D. A.; FERNANDES, L. A.; LEMES, P. G.; SOUZA, C. N. *Growth-promoting bacteria and symbionts in chickpea: a review*. In: NAYARA GUETTEN RIBASKI. PRACTICES AND CHALLENGES IN THE AGRICULTURAL SCIENCES. Curitiba: Editora Reflexão acadêmica, 2025. p. 23-53.

PALMERO, F., FERNANDEZ, J. A., GARCIA, F. O., HARO, R. J., PRASAD, P. V., SALVAGIOTTI, F., & CIAMPITTI, I. A. A quantitative review into the contributions of biological nitrogen fixation to agricultural systems by grain legumes. *European Journal of Agronomy*, v. 136, p.126514, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2022.126514>

PANDEY, S., GUPTA, S., & RAMAWAT, N. (2019). Unravelling the potential of microbes isolated from rhizospheric soil of chickpea (*Cicer arietinum*) as plant growth promoter. *3 Biotech*, 9, 277. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1809-2>

PEGORARO, R. F., ALMEIDA NETA, M. N. D., COSTA, C. A. D., SAMPAIO, R. A., FERNANDES, L. A., & NEVES RODRIGUES, M. (2018). Chickpea production and soil chemical attributes after phosphorus and molybdenum fertilization. *Ciência e Agrotecnologia*, 42(5), 474-483.

PEGORARO, R. F., RODRIGO, J., SILVA, T., FRAZ, A., SAMPAIO, R. A., & BICALHO, S. F. (2024). Nutrient availability in tropical soils fertilized with sewage sludge and natural phosphate. *Int J Recycl Org Waste Agricult*, 13(2). <https://doi.org/10.57647/j.ijrowa.2024.1302.17>

PEREIRA IS, BAMBERG AL, DE SOUSA RO, MONTEIRO AB, MARTINAZZO R, SILVEIRA CAP, *ET AL.*, Agricultural use and pH correction of anaerobic sewage sludge with acid pH. *J Environ Manag.* 2020;275:111203. doi: 10.1016/j.jenvman.2020.111203

PIKOVSKAYA RI (1948) Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya* 17:362–370

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, **2020**, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>

RIAZ U, MURTAZA G, QADIR AA, RAFI F, QAZI MA, JAVID S, TAUSEEF M, SHAKIR M. Biofertilizers a viable tool for future organic agriculture. Microbiota and biofertilizers. 2021, Springer, Singapore, pp 329–340

SAIDI, S., CHEBIL, S., GTARI, M., MHAMDI, R., 2013. Characterization of root-nodule bacteria isolated from *Vicia faba* and selection of plant growth-promoting traits. World J. Microbiol. Biotechnol. 29, 1099–1106.

SHAHID, M., KHAN, M. S., SYED, A., MARRAIKI, N., & ELGORBAN, A. M. (2021) *Mesorhizobium ciceri* as biological tool for improving physiological, biochemical and antioxidant state of *Cicer arietinum* (L.) under fungicide stress. *Scientific Reports*. 6, 9655. doi: 10.1038/s41598-021-89103-9. PMID: 33958646; PMCID: PMC8102606.

SOUZA, C. A.; REIS JUNIOR, F. B.; MENDES, I. C.; LEMAINSKI, J.; SILVA, J. E. da. Lodo de esgoto em atributos biológicos do solo e na nodulação e produção de soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 55, e2290, 2020. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pab/a/6rNV3nx9t7MMWQGmzVwrLhw/>. Acesso em: 17 abr. 2025.

STAMBULSKA, U. Y., & BAYLIAK, M. M. (2019). Legume-*Rhizobium* symbiosis: secondary metabolites, free radical processes, and effects of heavy metals, in Co Evolution of Secondary Metabolites. Eds. J.-M. Merillon and K. G. Ramawat (Cham: Springer International Publishing), 1–32p.

TARIQ, M., HASNAIN, N., RASUL, I., ASAD, M. A., JAVED, A., RASHID, K., SHAFIQUE, J., IRAM, W., HAMEED, A., & ZAFAR, M. (2023) Reconnoitering the capabilities of nodule *endophytic Pantoea dispersa* for improved nodulation and grain yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, doi: 10.1007/s11274-023-03525-

TEDESCO, M.J.; VOLKWEISS, S.J.; BOHNEN, H. Análise de solo, plantas e outros materiais. UFRGS, Porto Alegre, Brasil, 1995.

TIAN J, GE F, ZHANG D, DENG S, LIU X (2021) Roles of phosphate solubilizing microorganisms from managing soil phosphorus deficiency to mediating biogeochemical P cycle. *Biology* 10:158. <https://doi.org/10.3390/biology10020158>

UZINGER, N.; TAKÁCS, T.; SZILI-KOVÁCS, T.; RADIMSZKY, L.; FÜZY, A.; DRASKOVITS, E.; SZŰCS-VÁSÁRHELYI, N.; MOLNÁR, M.; FARKAS, É.; KUTASI, J.; *ET AL.*, Fertility Impact of Separate and Combined

Treatments with Biochar, Sewage Sludge Compost and Bacterial Inocula on Acidic Sandy Soil. *Agronomy* **2020**, *10*, 1612.  
<https://doi.org/10.3390/agronomy10101612>

VARGA T, HIXSON KK, AHKAMI AH, SHER AW, BARNES ME, CHU RK, BATTU AK, NICORA CD, WINKLER TE, RENO LR, FAKRA SC (2020) Endophyte-promoted phosphorus solubilization in Populus. *Front Plant Sci.* <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.567918>

VERMA, G., KUMAR, A., SING, R., BABU, S. (2020). Impact of Fertility Levels and Biofertilizers on Root Architecture, Yield and Nutrient Uptake of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Crop. *International Journal Current Microbiology Aplicativo Science*, 9, 2018-2024. DOI:10.20546/ijcmas.2020.902.230

VIANA, A. R. S., PEGORARO, R. F., SAMPAIO, R. A., FERNANDES, L. A., FRAZAO, L. A., DA COSTA, C. A., & SOARES, V. A. S. F. (2025). Sewage sludge-based organomineral fertilizer: A pathway to enhanced soil fertility and chickpea production. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, 14(1).

WOLDE-MESKEL E, VAN HEERWAARDEN J, ABDULKADIR B, KASSA S, ALIYI I, DEGEFU T, WAKWEYA K, KANAMPIU F, GILLER KE. (2018) Additive yield response of chickpea (*Cicer arietinum* L.) to *Rhizobium* inoculation and phosphorus fertilizer across small holder farms in Ethiopia. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 261, 144-152.

Y, LYAMLOULI K, BARGAZ A (2020) Phosphate solubilizing rhizobacteria could have a stronger influence on wheat root traits and aboveground physiology than rhizosphere P solubilization. *Front Plant Sci* 11:979. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00979>

ZAW, M., JUDITH R.; RATHJEN; YI ZHOU; MAARTEN H. RYDER; MATTHEW D. DENTON. Symbiotic effectiveness, ecological adaptation and phylogenetic diversity of chickpea rhizobia isolated from a large-scale Australian soil collection. *Plant Soil* (2021) 469:49–71 <https://doi.org/10.1007/s11104-021-05119-0>

ZHANG, J.; WANG, N.; LI, S.; WANG, J.; FENG, Y.; WANG, E.; LI, Y.; YANG, T.; CHEN, W. The Effect of Different Rhizobial Symbionts on the Composition and Diversity of Rhizosphere Microorganisms of Chickpea in Different Soils. *Plants* **2023**, *12*, 3421. <https://doi.org/10.3390/plants12193421>

ZHU, L. Q.; CHEN, H. C.; ZHAO, L.; JIANG, W. X. Microscopic and ultramicroscopic anatomical characteristics of root nodules in *Podocarpus macrophyllus* during development. *Nordic Journal of Botany* **2022**: e03662, doi: 10.1111/njb.03662

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente tese teve como objetivo investigar e validar o potencial de bactérias promotoras de crescimento vegetal, nativas de regiões tropicais e semiáridas, aplicadas ao cultivo do grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) como estratégia para o desenvolvimento de práticas agrícolas mais sustentáveis e eficientes. Ao longo dos quatro capítulos que compõem este trabalho, foram exploradas diferentes abordagens, desde a diversidade microbiana associada ao sistema radicular da cultura até a avaliação anatômica de nódulos formados por bactérias inoculadas em condições tropicais.

Os resultados evidenciaram que bactérias simbióticas e não simbióticas desempenham papéis fundamentais na promoção do crescimento do grão-de-bico, sobretudo por meio da fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fósforo, produção de hormônios vegetais e melhora na absorção de macronutrientes. A coinoculação com microrganismos como *Bradyrhizobium japonicum*, *Azospirillum brasilense* e espécies de *Bacillus* resultou em ganhos significativos de biomassa da parte aérea e radicular.

A identificação de oito bactérias associadas às raízes do grão-de-bico, incluindo espécies com comprovada atividade promotora de crescimento, como *Kosakonia radicincitans*, *Enterobacter asburiae*, *Klebsiella variicola*, *Bacillus cereus* e *Rhizobium radiobacter*, *Mesorhizobium*, amplia as perspectivas para o desenvolvimento de inoculantes adaptados às condições edafoclimáticas do cerrado e do semiárido brasileiro. O uso dessas bactérias, isoladamente ou em consórcios, contribuiu para o aumento da nodulação, acúmulo de nitrogênio, fósforo e potássio, e incremento da biomassa vegetal.

De forma destacada, a associação de inoculantes com adubação orgânica apresentou resultados superiores à adubação mineral em diversos parâmetros avaliados. O tratamento que combinou o consórcio microbiano (Mix 1: *Klebsiella variicola*, *Bacillus cereus*, *Rhizobium radiobacter*, *Mesorhizobium* sp. 1) com composto orgânico foi responsável por aumentos expressivos em número e peso de nódulos (52% e 67%, respectivamente), massa seca total (30%), nitrogênio acumulado (42,11%), fósforo (46,67%) e potássio (21,43%) em comparação ao controle.

Esses achados reforçam o potencial dos bioinsumos como ferramentas estratégicas para a agricultura tropical, contribuindo não apenas para o aumento da produtividade do grão-de-bico, mas também para a redução da dependência de insumos minerais, recuperação da saúde do solo e mitigação de impactos ambientais. A adoção de inoculantes com formulações específicas para culturas como o grão-de-bico pode representar avanço importante na

consolidação de sistemas agrícolas mais resilientes, econômicos e sustentáveis no Brasil e em outras regiões de clima semelhante.

Os resultados obtidos nesta tese contribuem de forma relevante para o avanço da ciência nas áreas de microbiologia agrícola, fisiologia vegetal e manejo sustentável de culturas em regiões tropicais e semiáridas. As cepas identificadas e testadas representam um banco microbiano promissor para futuros programas de desenvolvimento de inoculantes comerciais específicos para o grão-de-bico e outras culturas. Perspectivas futuras incluem a realização de ensaios de campo em larga escala, estudos sobre a persistência dos microrganismos no solo ao longo dos ciclos agrícolas, formulações industriais estáveis e combinações sinérgicas entre bioinsumos e práticas sustentáveis. Além disso, este estudo abre caminhos para integrar biotecnologia, melhoramento de cultivares voltadas à ampliação do uso de microrganismos promotores de crescimento vegetal.