

**EFEITO DE UMA COMUNIDADE BACTERIANA
SINTÉTICA PARA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE
PLANTAS DE SOJA (*Glycine max* L. Merr.)**

GABRIELA AZEVEDO ALVES SOUZA

**UNIVERSIDADE ESTADUAL
DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
UENF - 2024**

**EFEITO DE UMA COMUNIDADE BACTERIANA
SINTÉTICA PARA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE
PLANTAS DE SOJA (*Glycine max* L. Merr.)**

GABRIELA AZEVEDO ALVES SOUZA

“Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Vegetal”.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Lopes Olivares

Co-orientadora: Gabriela Petroceli Mota

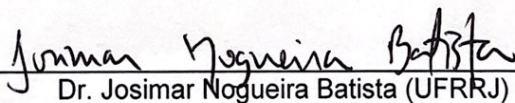
**EFEITO DE UMA COMUNIDADE BACTERIANA
SINTÉTICA PARA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE
PLANTAS DE SOJA (*Glycine max* L. Merr.)**

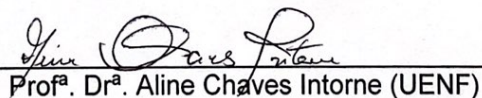
GABRIELA AZEVEDO ALVES SOUZA

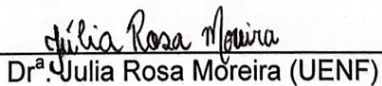
Dissertação apresentada ao Centro
de Biociências e Biotecnologia da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte
das exigências para obtenção do título
de Mestre em Biotecnologia Vegetal.

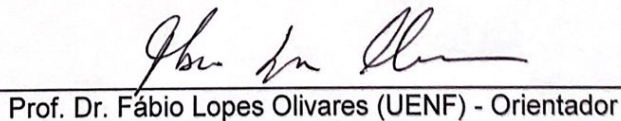
Aprovada em 31 de julho de 2024

Banca avaliadora:


Dr. Josimar Nogueira Batista (UFRRJ)


Prof^a. Dr^a. Aline Chaves Intorne (UENF)


Dr^a. Julia Rosa Moreira (UENF)


Prof. Dr. Fábio Lopes Olivares (UENF) - Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, ao programa de pós-graduação em Biotecnologia Vegetal e a todo corpo docente pela oportunidade de realização deste trabalho.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Fábio Olivares, por todos os ensinamentos, pela disponibilidade, por ter me guiado cientificamente e pela paciência com meu aprendizado. À minha co-orientadora, Gabriela Petroceli, por todo apoio e ajuda nesta caminhada.

A todos os meus amigos de laboratório, sem exceção, sem cada um deles no dia a dia, segurando minha mão, alegrando meus dias e me ensinando a fazer ciência, este trabalho não teria sido realizado.

A toda minha família e aos amigos que fiz nesta caminhada e os de longas datas por toda compreensão da ausência neste momento e pela torcida do meu sucesso.

Ao Rhuan, meu companheiro e namorado, que não mede esforços para estar ao meu lado, que me acompanhou em todo o processo, ajudando, aconselhando e vibrando por cada evolução.

Aos meus pais, Amélia e Sérgio, que são minha pedra fundamental, me formaram como pessoa e são minha base e minha segurança neste mundo. Aos meus irmãos, Sérgio Filho, por todo amor e irmandade, por ser uma das pessoas que me acompanhará por toda a minha jornada e vida; por fim, agradeço e dedico este trabalho ao meu irmão Gabriel, por todo o carinho, por toda proteção e por sempre acreditar em mim, e que hoje, do céu, ele continua a me acompanhar e ser a pessoa que mais acredita em mim, como sempre fez, e que em sua viagem celeste, ele receba toda a minha gratidão.

E agradeço a Deus, aquele que até aqui me sustentou e que continua a me sustentar. Toda honra e glória sempre a Ele, pois sem Ele eu nada poderia ser e fazer.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	10
1. Introdução	11
2. Revisão Bibliográfica	14
2.1 Bactérias diazotróficas	14
2.1.1 <i>Bradyrhizobium</i> spp.	16
2.1.2 <i>Azospirillum</i> spp.....	17
2.1.3 <i>Herbaspirillum</i> spp.	17
2.1.4 <i>Paraburkholderia</i> spp.....	18
2.2 Importância da co-inoculação e das comunidades microbianas sintéticas com BPCV	19
3. Objetivos	21
3.1 Objetivo Geral	21
3.2 Objetivos Específicos	21
4. Material e Métodos	22
4.1 Seleção de Microrganismos	22
4.2 Padronização do pré-inóculo e inóculo	23
4.3 Ensaio de compatibilidade <i>in vitro</i> entre as bactérias selecionadas.....	23
4.4 Análise do efeito da inoculação com bactérias individualmente, co-inoculadas e com o consórcio microbiano sintético	24
4.5 Análise preliminar do efeito de diferentes doses: Teste de germinação <i>in vitro</i> e em casa de vegetação sob efeito de duas doses diferentes da comunidade bacteriana sintética.....	25
4.5.1 Testes de germinação <i>in vitro</i>	25
4.5.2 Teste em casa de vegetação	27
4.5.3 Preparo para Microscopia Eletrônica de Varredura.....	27
4.6 Análise de Dados	28
5. Resultados e Discussão	29
5.1 Seleção das bactérias e padronização do pré-inóculo	29
5.2 Teste de compatibilidade <i>in vitro</i>	30
5.3 Efeito da inoculação com bactérias individualmente, co-inoculadas e com o consórcio microbiano sintético	31

5.4 Análise preliminar do efeito de diferentes densidades de inóculo	41
5.4.1 Germinação <i>in vitro</i>	41
5.4.2 Teste em casa de vegetação	43
5.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	49
6. Conclusão	54
7. Referências bibliográficas	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição das sementes para germinação <i>in vitro</i>	27
Figura 2: Cinética de crescimento do pré-inóculo em função do tempo, no cultivo de <i>B. japonicum</i> , <i>A. brasilense</i> , <i>P. silvatlantica</i> e <i>H. seropedicae</i>	30
Figura 3: Compatibilidade entre as cepas <i>A. brasilense</i> (1), <i>H. seropedicae</i> (2) e <i>P. silvatlantica</i> (3) contra <i>B. japonicum</i> (*).....	31
Figura 4: Área foliar (cm ³).....	33
Figura 5: Comprimento da Parte Aérea (cm ²).....	34
Figura 6: Volume Radicular (cm ³) (A) e comprimento radicular (B).....	36
Figura 7: Comprimento Total (cm ²).....	36
Figura 8: Biomassa das Plantas (g) - Matéria seca.....	39
Figura 9: Fotobiologia vegetal aferida com o MultispeQ PhotosynQ. (A) SPAD, (B) gH ⁺ , (C) LEF - ETR, (D) Phi2, (E) PhiNPQ e (F) vH ⁺	40
Figura 10: Média de germinação de sementes de soja <i>in vitro</i> em diferentes dosagens.	43
Figura 11: Sementes de soja <i>in vitro</i> germinadas em diferentes dosagens por 72 horas.	44
Figura 12: A) Altura da parte aérea (cm ²); B) Comprimento radicular (cm ²).	46
Figura 13: A) Matéria Fresca Total (g); B) Matéria Fresca Parte Aérea (g); C) Matéria Fresca Radicular (g).	47
Figura 14: A) Matéria Seca Total (g); B) Matéria Seca Parte Aérea (g); C) Matéria Seca Radicular (g).....	48
Figura 15: Plantas com 7 dias; Plantas com 15 dias.	49

Figura 16: Microscopia Eletrônica de raízes de soja tratadas <i>in vitro</i>	53
Figura 17: Microscopia Eletrônica de raízes de soja tratadas em casa de vegetação.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estirpes bacterianas, suas características fenotípicas testadas quanto à promoção do crescimento de plantas (PCP) e meios de cultura semi- seletivos.....	23
Tabela 2: Massa fresca das plantas (g).	37

RESUMO

A agricultura brasileira é um setor crucial para a economia nacional, mas enfrenta desafios ambientais significativos devido ao uso intensivo de produtos químicos poluentes e não-renováveis. A busca por sistemas de produção mais sustentáveis tornou-se urgente para mitigar os impactos negativos no solo e no meio ambiente. Embora exista um interesse crescente na co-inoculação, esta que envolve a inoculação de três ou mais microrganismos para promover o crescimento vegetal. Ainda são escassos os estudos que exploram essa combinação bactérias para uma aplicação conjunta. Compreender as interações complexas entre microrganismos em comunidades continua sendo um desafio significativo. O objetivo geral deste estudo é analisar o efeito do consórcio bacteriano composto por *Azospirillum brasilense*, *Herbaspirillum seropedicae* e *Paraburkholderia silvatlantica* no crescimento e desenvolvimento da soja BRS 7781 co-inoculada com *Bradyrhizobium*. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da UENF. Foram utilizados quatro isolados de bactérias diazotróficas endofíticas. Os testes incluíram análises de compatibilidade *in vitro*, cinética de crescimento e efeitos da inoculação em plantas de soja, utilizando parâmetros morfométricos e fotobiológicos. Os dados foram analisados utilizando ANOVA e outros testes estatísticos. Os resultados indicaram que a compatibilidade entre as bactérias selecionadas foi positiva, não apresentando antagonismo. As análises fotobiológicas mostraram que os parâmetros medidos não apresentaram diferenças significativas entre os grupos tratados e as testemunhas, exceto no fluxo de prótons (vH+), sugerindo um estímulo positivo dos microrganismos inoculados. A análise de doses diferentes do consórcio microbiano também destacou a importância da dosagem adequada para maximizar a eficiência. O estudo conclui que os consórcios microbianos têm um potencial significativo para promover o crescimento vegetal e aumentar a eficiência das plantas de soja. No entanto, é essencial considerar cuidadosamente as estratégias de inoculação e dosagem para otimizar os benefícios. Este trabalho contribui para a compreensão das interações microbianas e abre caminho para o desenvolvimento de biofertilizantes mais eficientes.

Palavras chaves: bioinoculante; soja; comunidade sintética; promoção de crescimento; bactéria endofítica.

ABSTRACT

Brazilian agriculture is a crucial sector for the national economy, but it faces significant environmental challenges due to the intensive use of polluting and non-renewable chemicals. The search for more sustainable production systems has become urgent in order to mitigate the negative impacts on the soil and the environment. Although there is growing interest in the co-inoculation of microorganisms to promote plant growth, studies exploring the combination of three or more bacteria for a joint application are still scarce. Understanding the complex interactions between microorganisms in communities remains a significant challenge. The general objective of this study is to analyze the effect of a bacterial consortium composed of *Azospirillum brasilense*, *Herbaspirillum seropedicae* and *Paraburkholderia silvatlantica* on the growth and development of BRS 7781 soybeans co-inoculated with *Bradyrhizobium*. The experiments were conducted at the Cell and Tissue Biology Laboratory at UENF. Four isolates of endophytic diazotrophic bacteria were used. The tests included analysis of in vitro compatibility, growth kinetics, and the effects of inoculation on soybean plants, using morphometric and photobiological parameters. The data was analyzed using ANOVA and other statistical tests. The results indicated that compatibility between the selected bacteria was positive, with no antagonism observed. The photobiological analyses showed that the parameters measured did not differ significantly between the treated groups and the control groups, except for the proton flow (vH+), suggesting a positive stimulus from the inoculated microorganisms. The analysis of different doses of the microbial consortium also highlighted the importance of the right dosage to maximize efficiency. The study concludes that microbial consortia have significant potential to promote plant growth and increase the efficiency of soybean plants. However, it is essential to carefully consider inoculation and dosing strategies to optimize the benefits. This work contributes to the understanding of microbial interactions and paves the way for the development of more effective biofertilizers.

Keywords: bioinoculant; soy; synthetic community; promoting growth; endophytic bacteria.

1. Introdução

A agricultura brasileira é competitiva e reconhecida por seu impacto global na produção de alimentos, sendo um dos setores que mais contribui para o crescimento do produto interno bruto nacional (Brasil, 2023). No entanto, a produção agrícola nacional tem enfrentado desafios decorrentes de condições ambientais desfavoráveis (Agência de Notícias do IBGE, 2023). Além disso, a agricultura industrial convencional, caracterizada pelo uso intensivo de produtos químicos nocivos contribuem para danos ambientais locais e globais. O solo é um recurso essencial para a vida e, é um dos mais afetados pelas práticas agrícolas convencionais (Pereira, 2019). Logo, a busca por sistemas de produção sustentável não é mais uma medida preventiva, mas sim de urgência, já que os recursos naturais não-renováveis estão sendo afetados. Nesse contexto, estão sendo exploradas alternativas inovadoras com o objetivo de assegurar a sustentabilidade ambiental (Embrapa, 2016).

Os microrganismos presentes no solo desempenham um papel fundamental na saúde dos agroecossistemas, contribuindo para a fertilidade do solo e crescimento das plantas. A diversidade microbiana é crucial nos processos essenciais, como ciclagem de nutrientes, fixação biológica de nitrogênio (FBN) e absorção de nutrientes essenciais pelas plantas (Baldani *et al.*, 1997; Miransari, 2013). Considerando os impactos negativos da agricultura industrial no solo e no clima, os bioinoculantes surgem como uma alternativa promissora para a agricultura moderna, visando mitigar esses efeitos nocivos. Esses produtos contêm microrganismos benéficos vivos com a capacidade de promover o crescimento das plantas (Santos, 2019) podendo substituir ou complementar o uso dos fertilizantes químicos (Oliveira, 2022).

Dentre as culturas exploradas, a soja (*Glycine max* L. Merr.) é a leguminosa considerada a principal *commodity* dentro da realidade de produção de alimentos no Brasil. Dados consolidados pela Embrapa (2023/24) apontam uma produção de 147,35 milhões de toneladas de grãos e ocupação 45,98 milhões de hectares, sendo o país com maior produção mundial na safra 2023/24, ficando à frente dos Estados Unidos da América (EUA).

O nitrogênio (N) é o elemento químico de maior demanda para o crescimento e desenvolvimento da soja, bem como o mais limitante para produção agrícola nos solos tropicais. Apesar da elevada disponibilidade de nitrogênio na atmosfera (78%), o mesmo se encontra em uma forma química não assimilável pela planta (gás N_2) (Munhoz, 2016). Algumas espécies da família das leguminosas são capazes de formar estruturas nodulares em suas raízes e que permitem a conversão do gás nitrogênio (N_2) em amônia (NH_3) pela atividade catalítica da enzima nitrogenase, através da simbiose com bactérias diazotróficas? (Bruxel, 2012). Este é um processo microbiano conhecido como fixação biológica de nitrogênio (FBN), capaz de suprir todo nitrogênio necessário para o crescimento e desenvolvimento de plantas de soja em diferentes agroecossistemas brasileiros, com impactos econômicos e ecológicos positivos, na geração de riquezas e mitigação de danos ambientais (Brasil, 2017). As bactérias que induzem a formação destes nódulos são chamadas de bactérias fixadoras de nitrogênio ou bactérias diazotróficas. Elas são conhecidas genericamente como rizóbios, e ao serem atraídas por exsudados radiculares específicos (flavonóides e isoflavonóides), induzem uma sinalização e reprogramação dos sistemas de tecido radiculares que resultam na formação dos nódulos radiculares e o estabelecimento de uma troca bidirecional de carbono e nitrogênio, caracterizando a simbiose (Embrapa, 2015; Hennecke, 1990; Stacey *et al.*, 1995). Neste contexto, a FBN é uma estratégia ideal para que a soja e outras leguminosas assimilem o nitrogênio e aumentem a produção (Munhoz, 2016). Através da comercialização de diferentes formulações de inoculantes microbianos essa estratégia de FBN pode ser utilizada agroecossistemas (Brasil, 2017; Embrapa, 2015; Hiltbold, 1980). Já as bactérias associativas (não indutoras de nódulos radiculares), também são capazes de promover o crescimento de plantas, assimilando uma menor quantidade de N_2 , mas podendo também disponibilizar macronutrientes essenciais para o desenvolvimento das plantas, como o fósforo (P), potássio (K) e enxofre (S) pela modificação da arquitetura radicular e bioquímica da absorção de nutrientes modulada pela produção de fitormônios (Florêncio *et al.*, 2022).

O inoculante microbiano é uma via de acesso dos rizóbios e das bactérias associativas nas plantas. Em 2014, a Embrapa lançou a tecnologia da co-inoculação que consiste na aplicação simultânea de inoculantes combinados com duas ou mais estirpes de bactérias promotoras do crescimento de plantas nas culturas vegetais (Hungria; Nogueira, 2017). Unir diferentes espécies bacterianas pode formar comunidades bacterianas sintéticas, resultando em consórcios capazes de combinar mecanismos complementares como fitoestimulantes, biofertilizantes e agentes de biocontrole (Martinez; Soto, 2018). A combinação de diferentes microrganismos representa uma nova abordagem para aprimoramentos das respostas da planta hospedeira a inoculantes microbianos, tendo como objetivo simular a microbiota natural do solo, aumentando a resiliência dos processos microbianos diante dos estresses ambientais, a eficiência e a complementaridade dos mecanismos de crescimento de plantas e a diversidade bacteriana, aproveitando as interações positivas entre as espécies (Embrapa, 2024). Além disso, os consórcios podem mitigar o estresse ambiental e reduzir o uso de pesticidas a partir de ações em conjunto que podem beneficiar o solo e a planta (Mascarenhas, 2024). Estatísticas da Embrapa Meio Ambiente (2024) mostram que 480 produtos biopesticidas foram registrados no Brasil e 83 foram a base do consórcio de microrganismos. No cenário agrícola atual, é entendido que o uso dessa tecnologia em questão é estratégica para a crescente sustentabilidade dos agroecossistemas. O Brasil é líder na aplicação de bioinoculantes, especialmente para culturas como a soja, onde os rizóbios são amplamente utilizados. De acordo com os dados de análises e estatísticas coletados em 2022 pela Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculante (ANPII), 85% da área plantada por cultura da soja utiliza os bioinoculantes (ANPII, 2024). Com o avanço das técnicas de biotecnologia e a crescente compreensão da microbiologia do solo, é possível desenvolver inoculantes eficazes e direcionados para diferentes culturas e condições de solo. Dessa forma, a pesquisa para explorar e aprimorar o uso de rizóbios e bactérias associadas é de extrema relevância.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Bactérias diazotróficas

A interação simbiótica entre as bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) e as plantas desempenha um papel crucial na biotecnologia agrícola, impulsionando o desenvolvimento de métodos inovadores para a inoculação de plantas, com impacto positivo na agricultura (Bulgarelli *et al.*, 2013). A interação das bactérias na rizosfera é influenciada pelos exsudatos radiculares, região onde o solo está intimamente em contato com as raízes (Embrapa, 2015).

As bactérias diazotróficas desempenham um papel crucial nos processos de ciclagem e disponibilidade de nutrientes para as plantas, como por exemplo, na provisão de nitrogênio através da FBN (Moreira *et al.*, 2010). O N é um elemento essencial para a vida, compreendendo cerca de 78% da atmosfera terrestre. No entanto, sua forma gasosa não é diretamente assimilável pelas plantas (Döbereiner, 1997; Munhoz, 2016). Nesse contexto, os organismos diazotróficos desempenham um papel crucial na conversão do nitrogênio atmosférico em formas assimiláveis pelas plantas, pelo processo de FBN (Hungria, 2007). A FBN ocorre através da redução do nitrogênio (N_2) a amônia (NH_3), catalisada pela enzima nitrogenase, sendo essencial que haja a interação entre as plantas e as bactérias diazotróficas (Döbereiner, 1997).

As bactérias diazotróficas, podem ser classificadas como facultativas ou endofíticas obrigatórias. As facultativas podem viver de forma independente no solo ou em associação com plantas, onde melhoram a nutrição e promovem o crescimento vegetal. Já as endofíticas obrigatórias estabelecem uma relação simbiótica íntima com leguminosas, formando nódulos nas raízes das plantas, podendo suprir até 70% do N necessário para as plantas como soja e feijão. Nestes nódulos, elas fixam o nitrogênio e fornecem às plantas (Baldani *et al.*, 1997, Moreira *et al.*, 2010).

Ambos os tipos podem contribuir para o crescimento vegetal não só pelo fornecimento de nitrogênio, mas também por outros mecanismos de ação como produção de fitormônios, solubilização de fosfatos, antagonismo a fitopatógeno,

entre outros (Rodrigues, 2016). Estas interações são vitais para a saúde do solo e para a produtividade das culturas, evidenciando a importância dos microrganismos diazotróficos na agricultura e na sustentabilidade ambiental (Cardoso, 2016).

No Brasil, a contribuição da pesquisadora Johanna Döbereiner no estudo das interações entre bactérias e plantas, especialmente nos gêneros *Bradyrhizobium*, foi fundamental para o avanço das pesquisas atuais. Döbereiner foi a pioneira nos estudos de FBN em gramíneas, e suas descobertas tiveram um impacto significativo na produção e competitividade da soja brasileira. Seu trabalho permitiu que alimentos mais baratos e saudáveis chegassem a milhares de pessoas, uma contribuição tão relevante que resultou em uma indicação ao Prêmio Nobel em 1997 (Embrapa, 2016).

A busca por métodos diversificados para a inoculação destas bactérias em plantas e solos, tem se intensificado, refletindo o interesse crescente em práticas agrícolas inovadoras e sustentáveis (Embrapa, 2019). As bactérias diazotróficas e as bactérias que promovem o crescimento das plantas fazem parte do grupo conhecidas como “Plant Growth Promoting Bacteria” (PGPB) (Compant *et al.*, 2010). *Bradyrhizobium* spp., *Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* spp. e *Paraburkholderia* spp., são exemplos de gêneros que fazem parte desse grupo (Baldani, 1986; Perin, 2006).

2.1.1 *Bradyrhizobium* spp.

As cepas de *Bradyrhizobium* eram originalmente classificadas como *Rhizobium* e foram reclassificadas, apresentando apenas uma espécie definida, *Bradyrhizobium japonicum* (Jordan, 1982). Posteriormente, surgiu uma subdivisão entre *B. japonicum* e *B. elkanii*, e suas diferenças morfológicas e fisiológicas foram descritas por Vargas e Hungria (1997).

Essas bactérias são endofíticas diazotróficas e são frequentemente utilizadas como microrganismos modelo em pesquisas científicas, uma vez que possuem uma comunicação benéfica com as plantas. Além disso, são portadoras dos genes *nif* e *nod*, que as tornam capazes de realizar a FBN através da formação de nódulos radiculares (Teixeira, 1997; Tao, 2021; Zhang, 2023). Esta comunicação benéfica entre planta-bactéria ocorre por meio de sinais químicos, formando uma cascata de sinalização. A planta libera exsudatos por suas raízes que são reconhecidas pelas proteínas das bactérias, e esse reconhecimento induz a formação dos nódulos nas raízes de leguminosas (Embrapa, 2015; Hennecke, 1990; Stacey *et al.*, 1995). As bactérias recebem proteção e fontes de energia ao se abrigarem nos nódulos e em troca tornam o nitrogênio atmosférico (N₂) assimilável para a planta, concretizando assim a relação simbiótica (Prando, 2020).

Muitas espécies de leguminosas obtêm grande parte do N através deste processo, dispensando o uso dos fertilizantes nitrogenados (Prando, 2020). A inoculação destas bactérias tornou-se importante para a agricultura, pois promove o aumento do rendimento de culturas como soja, feijão e amendoim (Hungria *et al.*, 2017; Medici, 2024).

O uso de inoculantes a base de microrganismos cresce a cada ano. Em 2023, o setor de soja aplicou cerca de 142 milhões de doses de inoculantes biológicos na agricultura brasileira, resultando em um faturamento de 141 milhões. O *Bradyrhizobium* lidera as vendas, representando 57% do valor do mercado (Canal, 2024). Sem esse processo natural, seria necessário aplicar altas doses de nitrogênio mineral no solo, implicando custos elevados e causando danos ambientais, tornando a agricultura economicamente inviável (Hungria *et al.*, 2007). Em 2013, a Embrapa indicou a bactéria *Azospirillum*

brasiliense para ser usada juntamente com o *Bradyrhizobium*, em um processo denominado co-inoculação, a fim de potencializar o processo de inoculação (Hungria *et al.* 2013).

2.1.2 *Azospirillum* spp.

Esse gênero foi descrito por Beijerinck em 1925 como *Spirillum lipoferum* e foi reclassificado como *Azospirillum* em 1978 (Tarrand *et al.*, 1978). A *Azospirillum brasiliense* é uma bactéria diazotrófica que se destaca por seu papel como promotora do crescimento vegetal. Esses microrganismos estabelecem uma relação simbiótica com as plantas, contribuindo para a FBN, um processo vital para a nutrição vegetal (Santos *et al.*, 2018). O uso de *A. brasiliense* como biofertilizante representa uma estratégia promissora para promover práticas agrícolas mais sustentáveis, reduzindo tanto os custos ambientais quanto os econômicos e minimizando a dependência de fertilizantes sintéticos (Oliveira *et al.*, 2017). Além da FBN, estas bactérias são conhecidas por induzirem benefícios às plantas (Latef *et al.*, 2020). A co-inoculação com rizóbios e *A. brasiliense* na soja é exemplo do potencial dessa bactéria. Pesquisas recentes indicam que essa abordagem pode elevar significativamente tanto a produtividade quanto a qualidade dos grãos da soja (Hungria *et al.*, 2020).

2.1.3 *Herbaspirillum* spp.

O gênero *Herbaspirillum*, primeiramente identificado pela espécie *H. seropedicae*, é reconhecido por sua associação seletiva com gramíneas essenciais para a economia e nutrição, incluindo cultivos de forrageiras, trigo, milho, cana-de-açúcar, sorgo e arroz (Baldani *et al.*, 1986; Olivares *et al.*, 1996). É uma bactéria gram-negativa e móvel que apresenta dois a três flagelos em seus polos (Baldani *et al.*, 1984) e foi nomeada em homenagem ao local de seu isolamento inicial. Durante estudos para isolar *Azospirillum amazonense*, agora conhecida como *Nitrospirillum amazonense* (Lin *et al.*, 2015), foi descoberta que ela pertence à classe β -proteobacteria e sua caracterização é dada como endofítica diazotrófica (Olivares *et al.*, 1996). A capacidade endofítica foi

confirmada por Olivares *et al.* (1997) e James e Olivares (1998), que observaram a colonização nas raízes da cana-de-açúcar. Além disso, a espécie é capaz de se associar a diferentes partes vegetativas, como raízes, caules e folhas de cana-de-açúcar e arroz (Olivares *et al.*, 1996). *Herbaspirillum* é capaz de penetrar nas plantas hospedeiras através dos locais onde as raízes laterais emergem, transpondo as camadas celulares da epiderme. Essas rupturas servem como vias de acesso para que a bactéria alcance e se instale nos tecidos internos da planta (Olivares, 1997; James e Olivares, 1998; Monteiro *et al.*, 2012). A interação entre *H. seropedicae* e as plantas é mutualisticamente vantajosa, pois este microrganismo tem a capacidade de disponibilizar N em uma forma que as plantas são capazes de assimilar, favorecendo o crescimento vegetal e aumentando a produtividade agrícola (Baldani *et al.*, 2000). *H. seropedicae* contribui para a saúde das plantas pois produz fitohormônios que regulam o crescimento e tornam o fósforo inorgânico acessível através da solubilização (Bastián *et al.*, 1998; Estrada *et al.*, 2013).

2.1.4 *Paraburkholderia* spp.

O gênero *Paraburkholderia*, anteriormente *Burkholderia*, é classificado dentro da classe das β -proteobactérias e foi identificado pela primeira vez nos anos 50, por Walter Burkholder, e a descreveu como um agente causador da podridão da cebola (Burkholder, 1950; Pratama *et al.*, 2020). A reclassificação filogenética dividiu o antigo gênero *Burkholderia* em dois distintos: *Burkholderia* contendo espécies majoritariamente patogênicas para animais e plantas, e o outro, *Paraburkholderia*, abrangendo bactérias ambientais não patogênicas, incluindo várias com potencial biotecnológico promissor (Kaur, 2017). Essas bactérias são gram-negativas e possuem formato de bastonete, o gênero inclui mais de 30 espécies e podem ser encontradas em diversos nichos, principalmente no solo e na rizosfera, são bactérias que podem associar-se às raízes de diferentes culturas, como milho, trigo, arroz e soja (Coenye e Vandamme, 2001).

As *Paraburkholderia* possuem um grande potencial biotecnológico pois possuem uma versatilidade nutricional, podendo ser cultivadas em mais de

duzentos compostos orgânicos (Coenye e Vandamme, 2003). Essa capacidade aumenta a chance dessa bactéria sobreviver em diversos ambientes, sendo capaz de ter mais sucesso na colonização nas raízes (Dalmastri, *et al.*, 1999). Marcon (2007) e Rossetto (2008) isolaram e caracterizaram cepas de *Paraburkholderia* spp. endofíticas em cana de açúcar, demonstrando a capacidade de fixar nitrogênio biologicamente, produzir ácido indolacético, sideróforos, e solubilização de fosfato inorgânico.

Esse gênero tem ganhado destaque nos estudos que envolvem a FBN, pois, algumas espécies, como a *Paraburkholderia silvatlantica*, estão sendo descritas como bactérias diazotróficas, o que significa que são capazes de fixar o nitrogênio atmosférico e torná-lo disponível para as plantas por meio de uma eficaz associação simbiótica, impulsionando o desenvolvimento vegetal devido a ações de biocontrole e promoção do crescimento (Yabuuchi, *et al.*, 1992; Gutiérrez, 2019).

Desta forma, é evidente a importância de realizar mais estudos com esse gênero, considerando seu potencial para bioproteção e promoção do crescimento de culturas de interesse econômico.

2.2 Importância da co-inoculação e das comunidades microbianas sintéticas com BPCV

(faltou trazer exemplos de comunidades microbianas sintéticas, quais trabalhos tem estudo sobre comunidades

A co-inoculação é uma prática agrícola que envolve a aplicação simultânea de dois ou mais microrganismos benéficos para as plantas (Korber, 2021). Essa tecnologia, lançada pela Embrapa (2014), tem ganhado destaque devido aos estudos que demonstram a sua capacidade de otimizar a produção vegetal e promover a sustentabilidade agrícola. Os inoculantes à base de bactérias diazotróficas têm sido recomendados para diversas culturas, incluindo a soja (Hungria; Nogueira, 2013).

A interação de co-inoculação entre *Azospirillum brasilense* e *Bradyrhizobium* demonstra resultados positivos, como a fixação biológica de

nitrogênio, que supre toda a necessidade de nitrogênio da planta, podendo substituir o uso de fertilizantes nitrogenados (Hungria; Rubens, 2012). Além disso, outros benefícios como estímulo ao crescimento vegetal, a ampliação e volume do sistema radicular e a resistência a estresse também são observados (Santos, 2024). Com isso, compreender que os microrganismos atuam dentro de comunidades em interações complexas pode impulsionar o desenvolvimento de biofertilizantes a partir de construção de comunidades sintéticas capazes de remodelar o solo significativamente para aumentar a chances de uma melhor performance dos microrganismos inoculados (Wang *et al.*, 2021).

Na literatura científica, embora haja um crescente estudo sobre a co-inoculação, ainda são escassos os estudos que exploram a combinação de três ou mais bactérias para uma aplicação conjunta. Isso ocorre, pois compreender os microrganismos atuando em comunidades é um desafio, uma vez que possuem suas complexidades de comportamento. Estudos têm mostrado que a interação entre diferentes espécies microbianas em comunidades sintéticas pode resultar em comportamentos emergentes e imprevisíveis, devido às complexas redes de interações ecológicas e metabólicas que se formam (Widder *et al.*, 2016). Deste modo, vale salientar que estudos sobre as comunidades microbianas proporcionam um olhar para novas oportunidades de compreensão da interação microrganismo-solo-planta permitindo assim a simulação de comunidades com microrganismos de interesse. Estudos já indicam que os consórcios podem ser eficientes, uma vez que cada microrganismo pode atuar de forma específica para diferentes finalidades, demonstrando uma ampla diversidade metabólica, mais adaptabilidade aos ambientes e podem se tornar mais estáveis uma vez que dividem funções (Abdallah *et al.*, 2018; Shah, 2024).

A inovação dos consórcios chama a atenção, especialmente no contexto de mitigação dos impactos ambientais negativos causados pelo uso excessivo de agroquímicos. Ao explorar a interação entre bactérias presentes na rizosfera, pesquisadores buscam compreender melhor o funcionamento do solo e assim simular comunidades microbianas com os microrganismos de interesses, o que é chamado de consórcio microbiano sintético.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Analisar o efeito do consórcio bacteriano composto por *Azospirillum brasilense*, *Herbaspirillum seropedicae* e *Paraburkholderia silvatlantica* no crescimento e desenvolvimento da soja BR 7781 co-inoculada com *Bradyrhizobium*.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a compatibilidade *in vitro* das bactérias selecionadas para a comunidade bacteriana sintética para a co-inoculação com o *Bradyrhizobium japonicum*;
- Determinar a cinética individual de crescimento das bactérias no pré-inóculo;
- Avaliar o efeito de inoculação, co-inoculação com o *Bradyrhizobium japonicum* e da comunidade microbiana sintética em plantas de soja, na condição de casa de vegetação, na morfometria das plantas (área foliar, massa fresca e seca, comprimento da planta, volume e comprimento das raízes e biomassa);
- Avaliação da fotobiologia vegetal das plantas de soja cultivadas em condição de casa de vegetação com a utilização do aparelho MultispeQ PhotosynQ®;
- Avaliar o efeito de diferentes densidades de inóculo da comunidade microbiana sintética na germinação da soja *in vitro* e em condição de casa de vegetação;
- Avaliações microbiológicas das raízes de soja inoculadas por diferentes doses da comunidade microbiana sintética através da microscopia de varredura (MEV).

4. Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT) no setor de Ecofisiologia Microbiana, parte da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

4.1 Seleção de Microrganismos

Foram utilizadas quatro espécies de bactérias diazotróficas descritas na Tabela 1. As estirpes estão depositadas na Coleção Microbiana do LBCT/UENF. As culturas das bactérias foram armazenadas utilizando o método de vermiculita e ativadas em meio NB (Kasvi) (8 g.L^{-1}) suplementado com Glicerol (Dinâmica) (10 g.L^{-1}). Para esta ativação das culturas, uma alçada do estoque das bactéria em vermiculita foi inoculada em tubo de ensaio contendo 5 mL de meio, incubado a 30°C e sob agitação de 180 rpm. Posteriormente, uma alçada da cultura bacteriana líquida foi repicada em placa de Petri com meio sólido semi-específico (Tabela 1) para observar a pureza das estirpes e para realização do teste de compatibilidade. No caso de meio sólido, o meio foi suplementado com 15 g/L de ágar bacteriológico (Kasvi).

Tabela 1: Estirpes bacterianas, suas características fenotípicas testadas quanto à promoção do crescimento de plantas (PCP) e meios de cultura semi-seletivos

Identificação	Estirpe	Mecanismos de PCP	Meio de cultura semi-específico	Referências
<i>Azospirillum brasilense</i>	Ab-V5	FBN ¹ , SP ²	NFB	Tarrand <i>et al.</i> 1978
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	HUENF 19	FBN ¹ , SP ² , PF ³	JNFB	Baldani <i>et al.</i> , 1986
<i>Paraburkholderia silvatlantica</i>	UENF 117111	PF ³ , SP ²	JMV	Tavares, 2008
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	SEMIA 5079/5080	FBN ¹	YM	Kirchner, 1896

1 FBN = Fixação Biológica de N₂; 2 SP = Solubilização de Fosfatos; 3 PF = Produção de Fitohormônios.

4.2 Padronização do pré-inóculo e inóculo

Para o preparo do pré-inóculo, três alçadas da cultura bacteriana fresca em placa de Petri foram inoculadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio NB (Kasvi) (8 g.L^{-1}) suplementado com Glicerol (Dinâmica) (10 g.L^{-1}). Os frascos foram cobertos com manta feita de algodão e gaze, colocados em incubadora refrigerada com agitador orbital (*NT 735, Nova Técnica*) a 30°C e 180 rpm. A densidade ótica a 600 nm (DO_{600}) foi medida em intervalos de 2 horas com o uso do espectrofotômetro (*Microplate Reader, Kasuaki*) para avaliar o crescimento bacteriano até atingir a fase *midlog*. A avaliação do crescimento foi realizada em duplicata.

Já os inóculos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 2 L contendo 500 mL de meio NB (Kasvi) (8 g.L^{-1}) suplementado com Glicerol (Dinâmica) (10 g.L^{-1}), inoculados com uma alíquota de 5% v/v do pré-inóculo. As condições de cultivo foram as mesmas do pré-inóculo.

Para todos os ensaios, a preparação do pré-inóculo e inóculo seguiram a padronização determinada. Para os inóculos com diferentes diluições, após o crescimento de cada bactéria isolada nos Erlenmeyer de 2 L, 70 mL do inóculo de cada bactéria, foram transferidas para outro Erlenmeyer 2 L para a obtenção do inóculo da comunidade microbiana sintética total.

Em seguida, para a preparação do inóculo diluído, 10 mL desta solução concentrada, foi transferida para 90 mL de água destilada estéril, resultando assim em uma diluição de 10^{-1} em relação ao original. Desta diluição, 1 mL foi transferido para 99 mL de água destilada estéril, resultando em uma diluição de 10^{-3} em relação ao original. Assim, foram definidos, pré-inóculos, inóculos e inóculos diluídos (com diferentes densidades).

4.3 Ensaio de compatibilidade *in vitro* entre as bactérias selecionadas

Para o teste de compatibilidade, foi avaliado o crescimento de *A. brasilense*, *H. seropedicae* e *P. silvatlantica* com a cepa *B. japonicum* SEMIA 5079/5080, comumente usada nas formulações do inoculante comercial (Embrapa). Brevemente, 10 μL de cada suspensão bacteriana do pré-inóculo foi

semeada em uma gota contra a outra, na placa de Petri contendo meio sólido NB (Kasvi) (8 g.L⁻¹) suplementado com Glicerol (Dinâmica) (10 g.L⁻¹). Os testes foram realizados em triplicata e as placas foram incubadas a 30 °C por 24 h. Após esse período foi avaliada a formação da zona de compatibilidade ou efeito de inibição sobre o crescimento das bactérias (Selegato e Castro-Gamboa, 2023).

4.4 Análise do efeito da inoculação com bactérias individualmente, co-inoculadas e com o consórcio microbiano sintético

O ensaio foi conduzido em condições de casa de vegetação, utilizando um delineamento inteiramente casualizado (DIC). Cada tratamento obteve seis réplicas e foram inoculados com 15 mL de inóculo. Quando duas bactérias estavam presentes no tratamento, o inóculo foi dividido em proporções iguais (7,5 mL + 7,5 mL) e quando houve diluição dos tratamentos, a diluição foi realizada conforme descrito no tópico 4.2.

Os tratamentos avaliados incluíram: (a) bactérias inoculadas individualmente, (b) bactérias co-inoculadas com o *B. japonicum*, (c) consórcio microbiano sintético (todas bactérias selecionadas), (d) consórcio microbiano sintético co-inoculado com *B. japonicum*, (e) consórcio microbiano sintético diluído a 10⁻³ e (f) consórcio microbiano sintético diluído a 10⁻³ co-inoculado com *B. japonicum*.

As sementes de soja da cultivar BRS 7781 (*Glycine max*) foram previamente desinfestadas em solução de hipoclorito (NaClO) 2% e agitada levemente por aproximadamente 40 segundos para esterilização da superfície, em seguida, foram lavadas de três a cinco vezes em água destilada estéril até a remoção completa do NaClO.

Em seguida, três sementes foram semeadas em recipientes de 700 mL contendo o substrato Carolina Soil® e inoculadas no momento da semeadura. O desbaste ocorreu após a germinação e emergência das plântulas.

Após 20 dias, foi aplicado ¼ da solução nutritiva padrão de Hoagland & Arnon (1938). Após 30 dias da semeadura, o experimento foi coletado para análises de morfometria, a área foliar e a massa fresca foram analisadas no

momento da retirada das plantas da casa de vegetação e o conteúdo para a pesagem da massa seca foi colocada em uma estufa a 60 °C por 3 dias e assim pesado. As raízes foram submetidas às análises com o auxílio do programa *WinRHIZO*.

Para as análises fotobiológicas, o aparelho MultispeQ® PhotosynQ (Kuhlgert, 2016) foi utilizado, com base nas instruções do Manual Simplificado de Uso do Fluorímetro MultispeQ v 2.0 (PhotosynQ) (Ferreira *et al.*, 2023), com o protocolo “Photosynthesis Rides 2.0” na plataforma PhotosynQ (<http://www.photosynq.org>). O aparelho possui a funcionalidade de um fluorômetro, capaz de medir diversos parâmetros da planta e do ambiente. Neste trabalho, as análises dos resultados foram direcionadas para os parâmetros: gH+ (condutividade de prótons através da membrana do tilacóide), LEF (fluxo de elétrons linear), Phi2 (eficiência quântica efetiva do fotossistema 2), PhiNPQ (coeficientes de extinção não fotoquímica), índice de SPAD (teor relativo de clorofila) e vH+ (fluxo de prótons do estroma para o lúmen), pois já respondem questões sobre a saúde da planta.

As medições foram realizadas entre 8h e 9h da manhã. As plantas, já em seu estágio V3, foram medidas no terceiro nó de cada planta, na folha central trifoliada e completamente expandida, respeitando-se o ângulo da folha e sua localização. Análises de ANOVA foram realizadas na plataforma PhotosynQ, para confirmar que não ocorreu interferência das variáveis ambientais (temperatura ambiente, PAR e hora do dia) nos resultados obtidos.

4.5 Análise preliminar do efeito de diferentes doses: Teste de germinação *in vitro* e em casa de vegetação sob efeito de duas doses diferentes da comunidade bacteriana sintética

4.5.1 Testes de germinação *in vitro*

Os testes *in vitro* foram realizados com sementes de soja da cultivar BRS 7781, que foram desinfestadas em solução de hipoclorito (NaClO) 2% e agitada aproximadamente por 40 segundos para esterilização da superfície, em seguida, foram lavadas de três a cinco vezes em água destilada estéril até a remoção

completa do NaClO e colocadas para secar em papel estéril para a germinação. Foram definidos como condições experimentais: controle, e as concentrações de 10^{-1} e 10^{-3} , tratamento 1 e 2, respectivamente. Os inóculos foram cultivados conforme a padronização estabelecida no tópico 4.2.

Cada tratamento incluiu três réplicas, cada uma contendo dez sementes selecionadas aleatoriamente, colocadas sobre um papel estéril para germinação, e distribuídas em três placas de Petri estéreis para cada tratamento, conforme demonstrado na Figura 1. Para a inoculação, 3 mL de cada diluição foram aplicadas no papel estéril contido dentro da placa de Petri com 10 sementes e para a testemunha foi aplicado água destilada com o mesmo volume.



Figura 1: Distribuição das sementes para germinação *in vitro*

As placas foram então incubadas em estufa BOD (*Solab, incubadora bod com fotoperíodo sl - 224/210*) a uma temperatura de 27 °C e fotoperíodo de 12 horas por 7 dias. Os resultados da germinação *in vitro*, isto é, a emissão de radículas e, subsequentemente, a emergência, foram registrados após 24, 48 e 72 horas e com 7 dias. O comprimento das raízes foi medido com o auxílio do programa ImageJ.

As raízes foram preparadas para microscopia eletrônica de varredura (MEV) como descrito no tópico 4.5.4. A média de germinação foi calculada para cada tratamento: controle, tratamento 1 (10^{-1}) e tratamento 2 (10^{-3}).

4.5.2 Teste em casa de vegetação

Para os testes em condição de casa de vegetação, os inóculos utilizados foram os mesmos para a inoculação *in vitro*. Foram preparados seis tubetes de plástico para cada tratamento: controle, tratamento 1 (10^{-1}) e tratamento 2 (10^{-3}).

Os tubetes foram preenchidos com o substrato Carolina Soil® e semeadas três sementes de soja BRS 7781. No momento da semeadura, foram aplicados 5 mL de inóculo das diferentes concentrações, e água estéril para a testemunha.

Após o período de sete dias, foi realizado o desbaste, no qual foram mantidas apenas uma planta por tubete. No mesmo momento do desbaste, três tubetes foram selecionados para análises morfométricas, e preparação das raízes para microscopia de varredura (MEV) como descrito no tópico 4.5.3.

Após 15 dias da semeadura, os três tubetes restantes foram submetidos às mesmas análises das plantas retiradas com sete dias. A massa fresca foi pesada no momento da retirada das plantas da casa de vegetação e o conteúdo para a pesagem da massa seca foi colocada em uma estufa a 60 °C por 3 dias com posterior pesagem. As raízes foram submetidas às análises com o auxílio do programa *WinRHIZO*.

4.5.3 Preparo para Microscopia Eletrônica de Varredura

Para as análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), foram selecionados três segmentos de regiões anatômicas distintas (coifa, zona de alongamento e zona pilífera) para investigar o padrão de colonização das bactérias. O processamento das amostras seguiu o protocolo de (Baldotto *et al.*, 2011). Brevemente, o material foi fixado com glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4% e tampão fosfato 0,05 M, pH 7,1 por 48 horas. Após a fixação, o material foi lavado três vezes em tampão fosfato com intervalos de 40 min., desidratado em séries crescentes de álcool (15, 30, 50, 70 e 100%) por 40 min., seguido de ponto crítico em CO₂ (*Leica CPD300*). As amostras foram fixadas em suportes porta amostra de alumínio e metalizadas (*SCD050 BAL-*

TEC) com uma liga de ouro-paládio. O material foi visualizado no microscópio eletrônico de varredura EVO 40 (Zeiss) 15 kV.

4.6 Análise de Dados

Para a elaboração dos gráficos e análises estatísticas, foi utilizado o programa R (tópico 5.3 e 5.4) e para as análises de fotobiologia o Graphpad Prism versão 8.0.2 (tópico 5.3). Todos os dados foram verificados quanto à distribuição normal (Gaussiana) pelos testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. Para avaliar as diferenças entre as médias de cada tratamento, foi realizado o Teste de Médias de Tukey ($p < 0,05$).

5. Resultados e Discussão

5.1 Seleção das bactérias e padronização do pré-inóculo

As bactérias *A. brasilense*, *H. seropedicae* e *P. silvatlantica* empregadas no presente trabalho foram selecionadas por suas propriedades promotoras do crescimento vegetal, conforme avaliado em trabalhos anteriores. A cepa *B. japonicum*, depositada na coleção, foi isolada de um produto comercial (turfa) e ainda não havia sido avaliada previamente.

Na Figura 2, é apresentada a curva de crescimento das bactérias para obtenção do pré-inóculo. Conforme mostrado no gráfico, as espécies bacterianas possuem fases *midlog* distintas. As bactérias *B. japonicum* e *A. brasilense* atingiram a fase *midlog* em aproximadamente 6 h, *H. seropedicae* em 8h e *P. silvatlantica* em 10h de cultivo. Essa fase representa o crescimento ideal das células, sendo, portanto, adotada como o tempo de cultivo do pré-inóculo para teste de compatibilidade e preparação inóculo.

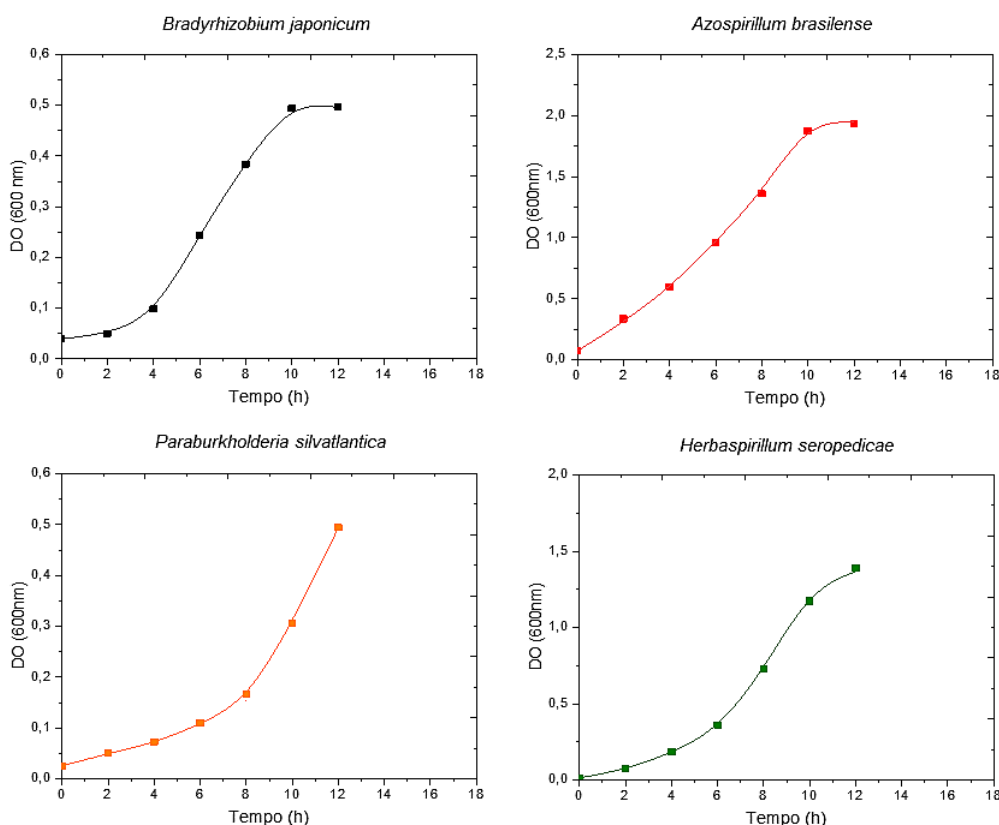


Figura 2: Cinética de crescimento do pré-inóculo em função do tempo, no cultivo de *B. japonicum*, *A. brasilense*, *P. silvatlantica* e *H. seropedicae*

5.2 Teste de compatibilidade *in vitro*

A compatibilidade entre as bactérias selecionadas não foi anteriormente testada *in vitro* ou em associação com plantas. Dessa forma, em teste *in vitro*, a avaliação de compatibilidade de crescimento entre as bactérias *A. brasilense*, *H. seropedicae* e *P. silvatlantica* em relação a *B. japonicum* não apresentou zonas de inibição após 24 horas de incubação, indicando que as culturas sobreviveram normalmente quando inoculadas em conjunto (Figura 3).

A ausência de antagonismo entre as cepas testadas indica que essas bactérias podem coexistir de forma cooperativa, potencializando os benefícios mútuos (Selegato e Castro-Gamboa, 2023). Ao contrário de uma cultura pura, em uma co-inoculação as interações entre microrganismos podem favorecer ou prejudicar as atividades de outras cepas presentes no ambiente (Bader *et al.*, 2010). Portanto, analisar previamente a compatibilidade entre dois ou mais microrganismos é essencial para avaliar o potencial uso simultâneo dessas bactérias nos ensaios de co-inoculação, visando melhorar a promoção de crescimento vegetal. Por exemplo, Cortés-Patiño *et al.* (2021) observaram que a co-inoculação de *Herbaspirillum* sp. e *Azospirillum brasilense* em *Lolium perenne* potencializaram os efeitos de promoção do crescimento vegetal.

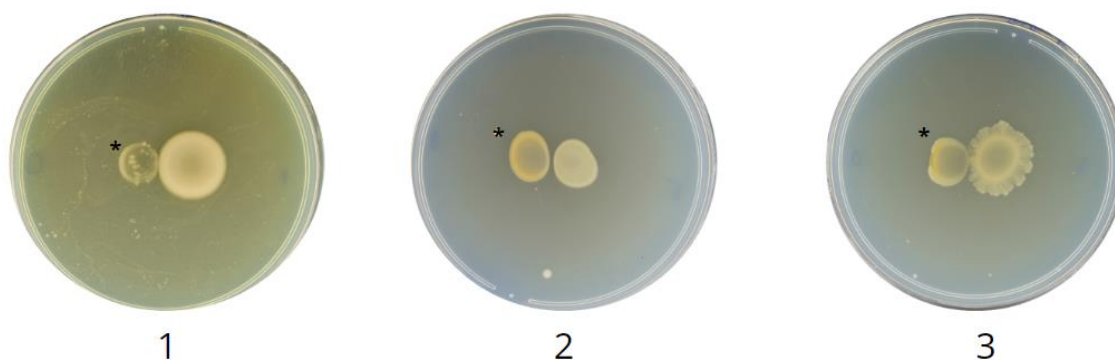


Figura 3: Compatibilidade entre as cepas *A. brasilense* (1), *H. seropedicae* (2) e *P. silvatlantica* (3) contra *B. japonicum* (*)

5.3 Efeito da inoculação com bactérias individualmente, co-inoculadas e com o consórcio microbiano sintético

A inoculação e a co-inoculação das bactérias foram realizadas na soja BR 7781, em sistema de casa de vegetação e analisadas após 30 dias da semeadura. Estudos anteriores demonstram que o uso de *B. japonicum* na soja pode melhorar a fixação de nitrogênio (N) e, conseqüentemente, o desenvolvimento da planta (Hungria, 2001). Portanto, incluímos tratamentos com e sem essa cepa para avaliar sua importância nas formulações futuras. Observou-se na análise da área foliar (Figura 4) que a testemunha absoluta (C) tem a menor média, com valores mais baixos entre os tratamentos. De modo geral, a diferença observada sugere que a inoculação bacteriana melhorou o desenvolvimento da soja em comparação com as plantas não inoculadas (C).

Em comparação a testemunha absoluta (C), a inoculação da soja com *B. japonicum* resultou em um aumento significativo na área foliar. No entanto, quando comparado aos demais tratamentos, incluindo as inoculações individuais e comunidade microbiana sintética (CMS) com as outras bactérias, não houve diferença significativa. Os tratamentos com as CMS diluídas (CMS 10^{-3} e CMS 10^{-3} + R) mostraram-se mais eficazes no aumento da área foliar, sendo maior em relação aos outros tratamentos e significativamente em relação a testemunha absoluta (C). Além disso, a inclusão do *B. japonicum* (CMS 10^{-3} + R) não fez diferença nesta análise comparado ao tratamento CMS 10^{-3} .

É relevante destacar que as plantas obtêm a maior parte de sua energia por meio da fotossíntese, e o tamanho e a forma das folhas podem variar em resposta a fatores ambientais, sendo assim, uma baixa área foliar pode limitar a produtividade da planta (Schmildt, 2023). Steiner *et al.* (2020), observaram que a inoculação e co-inoculação de *Rhizobium tropici* e *A. brasilense* em plantas de feijão resultaram em um aumento significativo na área foliar e produtividade dos grãos comparada às plantas não inoculadas.

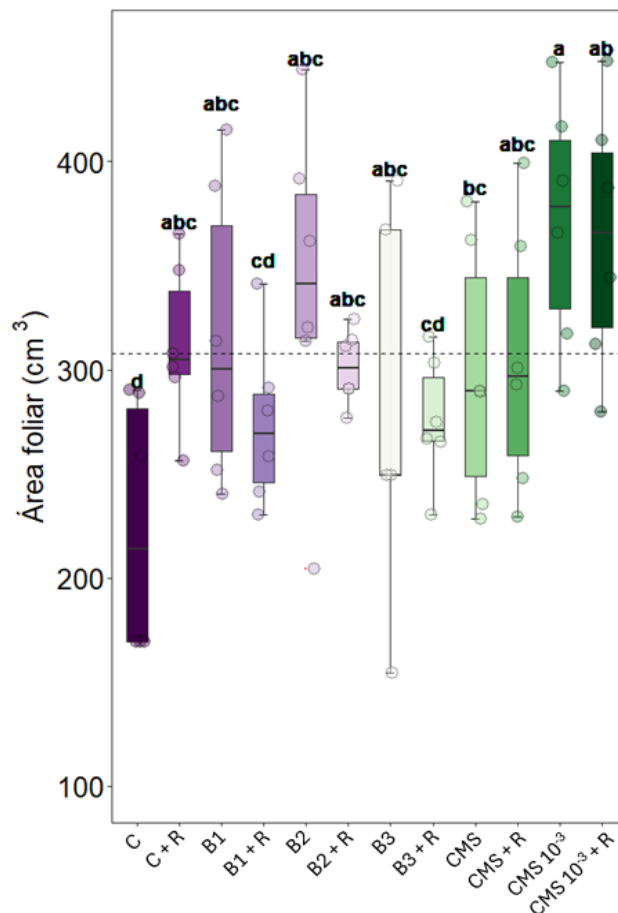


Figura 4: Área foliar (cm³): **C** - Testemunha absoluta; **C + R** - Testemunha + *B. japonicum*; **B1** - *A. brasilense*; **B1 + R** - *A. brasilense* + *B. japonicum*; **B2** - *P. silvatlantica*; **B2 + R** - *P. silvatlantica* + *B. japonicum*; **B3** - *H. seropedicae*; **B3 + R** - *H. seropedicae* + *B. japonicum*; **CMS** - Consórcio Microbiano Sintético; **CMS + R** - Consórcio Microbiano Sintético + *B. japonicum*; **CMS 10⁻³** - Consórcio Microbiano Sintético Diluído; **CMS 10⁻³ + R** - Consórcio Microbiano Sintético Diluído + *B. japonicum*

Ao analisar o comprimento da parte aérea (Figura 5), nota-se que a testemunha absoluta (C) obteve os valores mais altos. No entanto, mesmo com uma grande parte aérea, a testemunha absoluta (C) não apresentou uma área foliar que justifique o comprimento da parte aérea. Esse efeito pode ter ocorrido devido ao estiolamento e um balanço desproporcional no crescimento (Gommers *et al.*, 2013). Trabalhos como Carmo *et al.* (2018), apontam o estiolamento como uma tentativa de adaptação das plantas muitas vezes por busca de luminosidade, com isso a planta direciona suas reservas para o crescimento da haste principal. Esta resposta adaptativa pode resultar em uma maior altura da

planta, mas também pode comprometer as folhas e as raízes, devido à redistribuição das reservas de nutrientes (Gommers *et al.*, 2013).

A inoculação individual das plantas e a co-inoculação com *B. japonicum*, não apresentaram diferenças estatísticas significativas, mas podemos destacar que *H. seropedicae* (B3) apresentou a maior média no comprimento da parte aérea entre esses tratamentos (Figura 5).

O tratamento CMS apresentou a menor média de crescimento da parte aérea. Porém, quando combinado com *B. japonicum* (CMS + R), houve um aumento no crescimento. A parte aérea das plantas inoculadas com CMS diluída (CMS 10^{-3}) resultou em um comprimento maior, com o crescimento significativamente superior ao tratamento CMS (não diluído). Este aumento sugere, que a diluição pode ser mais favorável ao crescimento da planta (Figura 5).

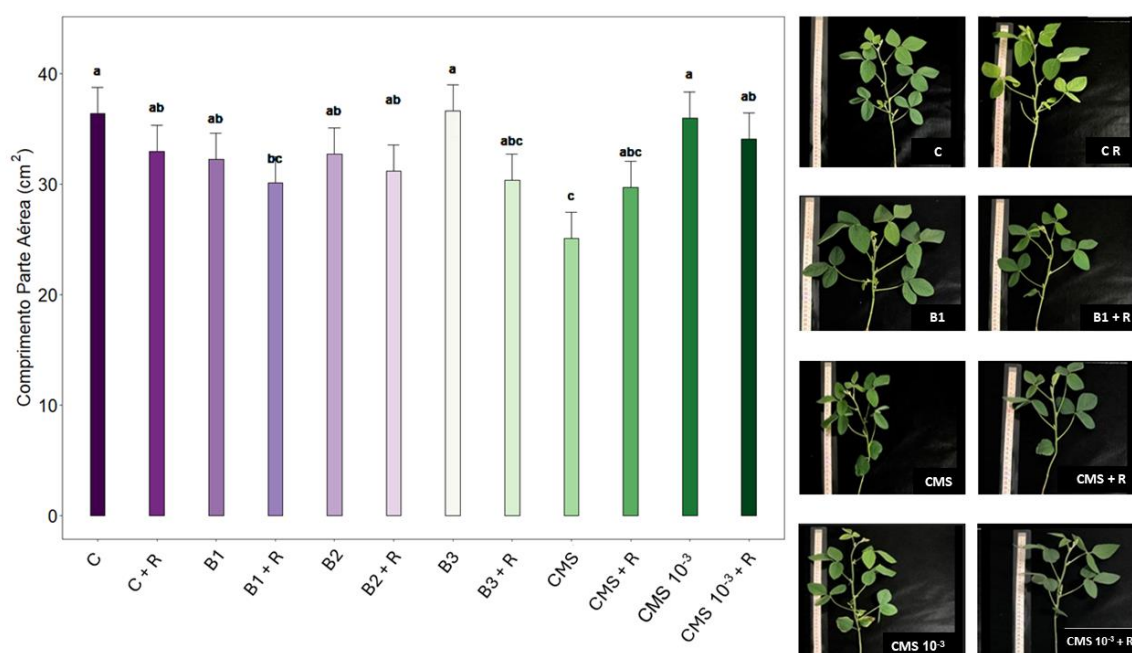


Figura 5: Comprimento da Parte Aérea (cm²): **C** - Testemunha absoluta; **C + R** - Testemunha + *B. japonicum*; **B1** - *A. brasilense*; **B1 + R** - *A. brasilense* + *B. japonicum*; **B2** - *P. silvatlantica*; **B2 + R** - *P. silvatlantica* + *B. japonicum*; **B3** - *H. seropedicae*; **B3 + R** - *H. seropedicae* + *B. japonicum*; **CMS** - Consórcio Microbiano Sintético; **CMS + R** - Consórcio Microbiano Sintético + *B. japonicum*; **CMS 10^{-3}** - Consórcio Microbiano Sintético Diluído; **CMS 10^{-3} + R** - Consórcio Microbiano Sintético Diluído + *B. japonicum*

O volume e comprimento radicular foram analisados através do programa *WinRHIZO* e registrou uma alta variação das médias entre os tratamentos. Em relação ao volume radicular (Figura 6 A), os tratamentos inoculados com as bactérias individuais apresentaram um volume maior quando comparado com as bactérias co-inoculadas com o *B. japonicum* (+ R). No entanto, ao comparar as comunidades sintéticas entre si, a resposta foi inversa com a adição do *B. japonicum*, ou seja, houve um aumento no volume radicular com a co-inoculação do *B. japonicum*. Santos (2019) mostrou um melhor desenvolvimento das raízes, apresentando que a inoculação pode trazer efeitos positivos para as plantas.

O comprimento radicular foi maior em todas as inoculações de comunidade microbiana sintética (CMS, CMS + R, CMS 10^{-3} e CMS 10^{-3} + R) quando comparadas às inoculações das bactérias individuais e em co-inoculação (Figura 6 B). Analisando o comprimento total (Figura 7), que é a somatória da parte aérea e a parte radicular, o tratamento CMS 10^{-3} obteve a maior média, diferentemente dos outros tratamentos. Visto que a inoculação com o tratamento CMS 10^{-3} teve um melhor desenvolvimento, pode-se inferir que essa inoculação pode ter promovido o crescimento das plantas, uma vez que as bactérias benéficas podem melhorar a absorção de nutrientes e desenvolvimento vegetal.

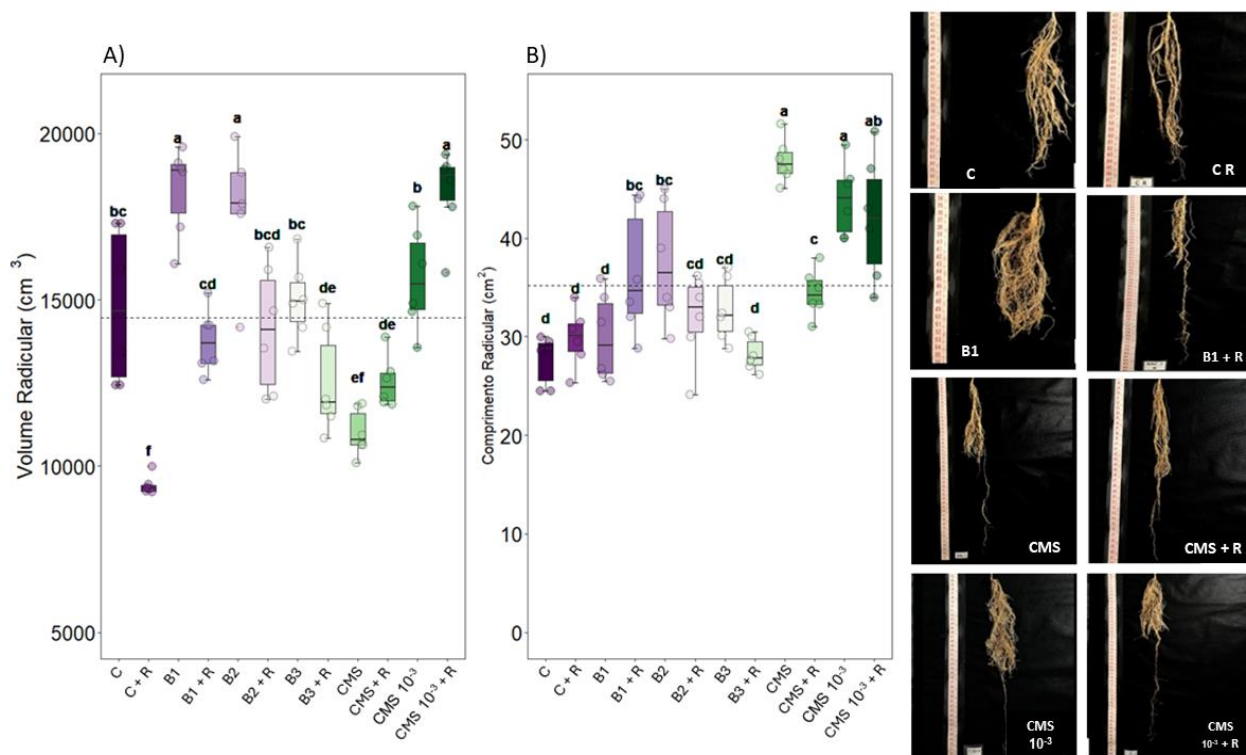


Figura 6: Volume Radicular (cm³) (A) e comprimento radicular (B): **C** - Testemunha absoluta; **C + R** - Testemunha + *B. japonicum*; **B1** - *A. brasilense*; **B1 + R** - *A. brasilense* + *B. japonicum*; **B2** - *P. silvatlantica*; **B2 + R** - *P. silvatlantica* + *B. japonicum*; **B3** - *H. seropedicae*; **B3 + R** - *H. seropedicae* + *B. japonicum*; **CMS** - Consórcio Microbiano Sintético; **CMS + R** - Consórcio Microbiano Sintético + *B. japonicum*; **CMS 10⁻³** - Consórcio Microbiano Sintético Diluído; **CMS 10⁻³ + R** - Consórcio Microbiano Sintético Diluído + *B. japonicum*

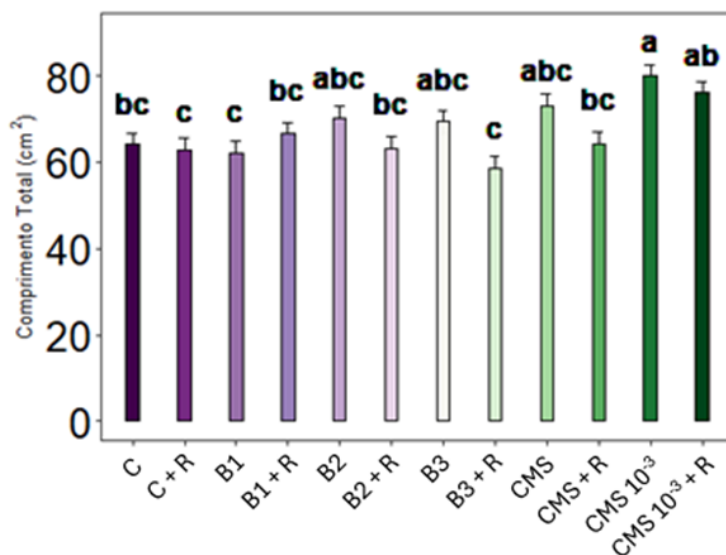


Figura 7: Comprimento Total (cm): **C** - Testemunha absoluta; **C + R** - Testemunha + *B. japonicum*; **B1** - *A. brasilense*; **B1 + R** - *A. brasilense* + *B. japonicum*; **B2** - *P. silvatlantica*; **B2 + R** - *P. silvatlantica* + *B. japonicum*; **B3** - *H. seropedicae*; **B3 + R** - *H. seropedicae* + *B. japonicum*; **CMS** - Consórcio Microbiano Sintético; **CMS + R** - Consórcio Microbiano Sintético + *B. japonicum*; **CMS 10⁻³** - Consórcio Microbiano Sintético Diluído; **CMS 10⁻³ + R** - Consórcio Microbiano Sintético Diluído + *B. japonicum*

Foram mensuradas as matérias frescas e secas da parte aérea e das raízes das plântulas e o número de folhas das plantas.

A massa fresca corresponde à massa da planta em seu estado natural, contendo toda a água presente nos tecidos vegetais. Essa medida é essencial para avaliar o peso total da planta antes da remoção de água, refletindo a condição fisiológica e o conteúdo de água da planta no momento da colheita.

A análise estatística (Tabela 2) indica a variação dos valores médios para cada tratamento e o coeficiente de variação (CV) mostra a variabilidade dos dados. Para matéria fresca da parte aérea (MFPA) o tratamento CMS 10^{-3} apresentou o maior valor médio (12.12), significativamente superior aos demais, exceto ao CMS 10^{-3} + R (11.88). O controle (C), combinado com o rizóbio também apresentou valores elevados (9.54). Os tratamentos com as bactérias isoladas (B1, B2, B3) mostraram resultados medianos, com valores entre 6.96 e 8.01. Para matéria fresca da raiz (MFR) o maior valor foi observado no tratamento B3 (8.30), seguido pelo tratamento CMS 10^{-3} (7.76). O tratamento CMS obteve o menor valor (5.85). A matéria fresca total (MFT) apresentou novamente o tratamento CMS 10^{-3} com o maior valor (9.94), sendo significativamente superior aos demais. O controle (C) e B3 também apresentaram valores elevados (8.57 e 8.07, respectivamente). O CMS apresentou o menor valor (5.80).

Para os números de folhas CMS 10^{-3} e CMS 10^{-3} + R apresentaram os maiores valores (7.83), indicando um aumento no crescimento vegetativo. Os tratamentos sem o rizóbio com as bactérias individuais, mostraram os menores valores.

Os resultados indicam que a aplicação de bactérias diluídas promoveu um aumento significativo de matéria fresca e no número de folhas das plantas de soja, possivelmente devido à maior fixação de nitrogênio e melhoria na absorção de nutrientes. Os tratamentos combinados com rizóbio também apresentaram melhor desempenho, ressaltando a interação entre microrganismos na promoção do crescimento vegetal.

Tabela 2: Massa fresca das plantas (g). **C** - Testemunha absoluta; **C+R** - Testemunha + *B. japonicum*; **B1** - *A. brasilense*; **B1+R** - *A. brasilense* + *B. japonicum*; **B2** - *P. silvatlantica*; **B2+R** - *P. silvatlantica* + *B. japonicum*; **B3** - *H. seropedicae*; **B3+R** - *H. seropedicae* + *B. japonicum*; **CMS** - Consórcio Microbiano Sintético; **CMS+R** - Consórcio Microbiano Sintético + *B. japonicum*; **CMS 10⁻³** - Consórcio Microbiano Sintético Diluído; **CMS 10⁻³+R** - Consórcio Microbiano Sintético Diluído + *B. japonicum*. MFPA - massa fresca parte aérea; MFR - massa fresca raiz; MFT - massa fresca total; NF - Número de folhas.

TRATAMENTOS	MFPA	MFR	MFT	NF
C	7.48 cd	5.12 d	6.30 ef	5.33 b
C+R	9.54 b	7.61 ab	8.57 bc	6.83 ab
B1	8.01 bcd	6.64 bc	7.32 de	5.66 b
B1 + R	6.96 de	7.10 abc	7.03 de	5.50 b
B2	7.98 bcd	7.56 ab	7.77 cd	6.16 ab
B2 + R	8.73 bc	6.94 bc	7.83 cd	5.33 b
B3	7.85 bcd	8.30 a	8.07 cd	5.66 b
B3 + R	8.62 bcd	6.85 bc	7.74 cd	5.50 b
CMS	5.76 e	5.85 cd	5.80 f	5.83 b
CMS + R	8.59 bcd	7.44 ab	8.02 cd	6.16 ab
CMS 10⁻³	12.12 a	7.76 ab	9.94 a	7.83 a
CMS 10⁻³ + R	11.88 a	7.54 ab	9.71 ab	7.83 a
CV	17.12%	15.36%	13.17%	23.71%

A matéria seca corresponde a massa da planta após a remoção completa da água, obtida por meio da secagem dos tecidos vegetais. Essa medida é fundamental para estimar a quantidade real de matéria orgânica presente, ou seja, representa a biomassa da planta. Na análise da matéria seca (Figura 8), é possível observar que as inoculações individuais e as co-inoculações com *B. japonicum* (+R) não apresentaram diferença significativa entre esses tratamentos. Mas, podemos observar um incremento de biomassa superior a testemunha absoluta (C) em B1 + R, B2 e B2 + R.

Além disso, a inoculação com o tratamento diluído e acrescido de *B. japonicum* (CMS 10⁻³ + R) apresentou aumento significativo no peso seco em relação à testemunha absoluta (C), exceto no tratamento com CMS (não diluído) que obteve o menor acúmulo de biomassa (Figura 8).

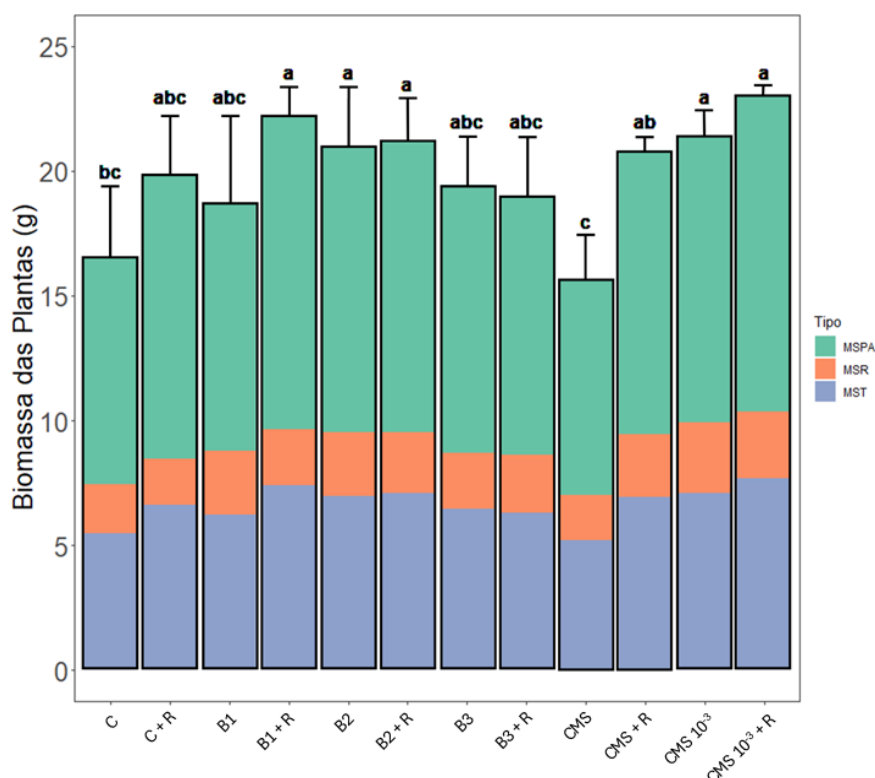


Figura 8: Biomassa das Plantas (g) - Matéria seca: **C** - Testemunha absoluta; **C + R** - Testemunha + *B. japonicum*; **B1** - *A. brasilense*; **B1 + R** - *A. brasilense* + *B. japonicum*; **B2** - *P. silvatlantica*; **B2 + R** - *P. silvatlantica* + *B. japonicum*; **B3** - *H. seropedicae*; **B3 + R** - *H. seropedicae* + *B. japonicum*; **CMS** - Consórcio Microbiano Sintético; **CMS + R** - Consórcio Microbiano Sintético + *B. japonicum*; **CMS 10⁻³** - Consórcio Microbiano Sintético Diluído; **CMS 10⁻³ + R** - Consórcio Microbiano Sintético Diluído + *B. japonicum*. MSPA - massa seca parte aérea; MSR - massa seca raiz; MST - massa seca total

Para as análises fotobiológicas das plantas, foram realizadas medições dos parâmetros de índice SPAD, gH⁺, LEF, Phi2, PhiNPQ e vH⁺ (Figura 9). Os resultados indicaram que esses parâmetros não apresentaram diferenças significativas entre os grupos de tratados e as testemunhas. No entanto, observou-se que no parâmetro de vH⁺ (fluxo de prótons do estroma para o lúmen), a testemunha absoluta (C) obteve a menor média em relação aos tratados. Isso sugere que os microrganismos inoculados podem ter estimulado o fluxo de prótons para o lúmen dos tilacóides. A fotossíntese desempenha um papel crucial na produtividade vegetal e é um aspecto relevante no funcionamento ecofisiológico vegetal. A transferência de prótons através da membrana do tilacóide durante a fotossíntese cria um gradiente de prótons que é utilizado pela ATP-sintase para a produção de ATP. Este processo é

fundamental para a eficiência energética da planta, pois maximiza a produção de ATP necessário para o ciclo de Calvin e outras reações metabólicas (Kramer e Evans, 2011; Driever e Baker, 2011).

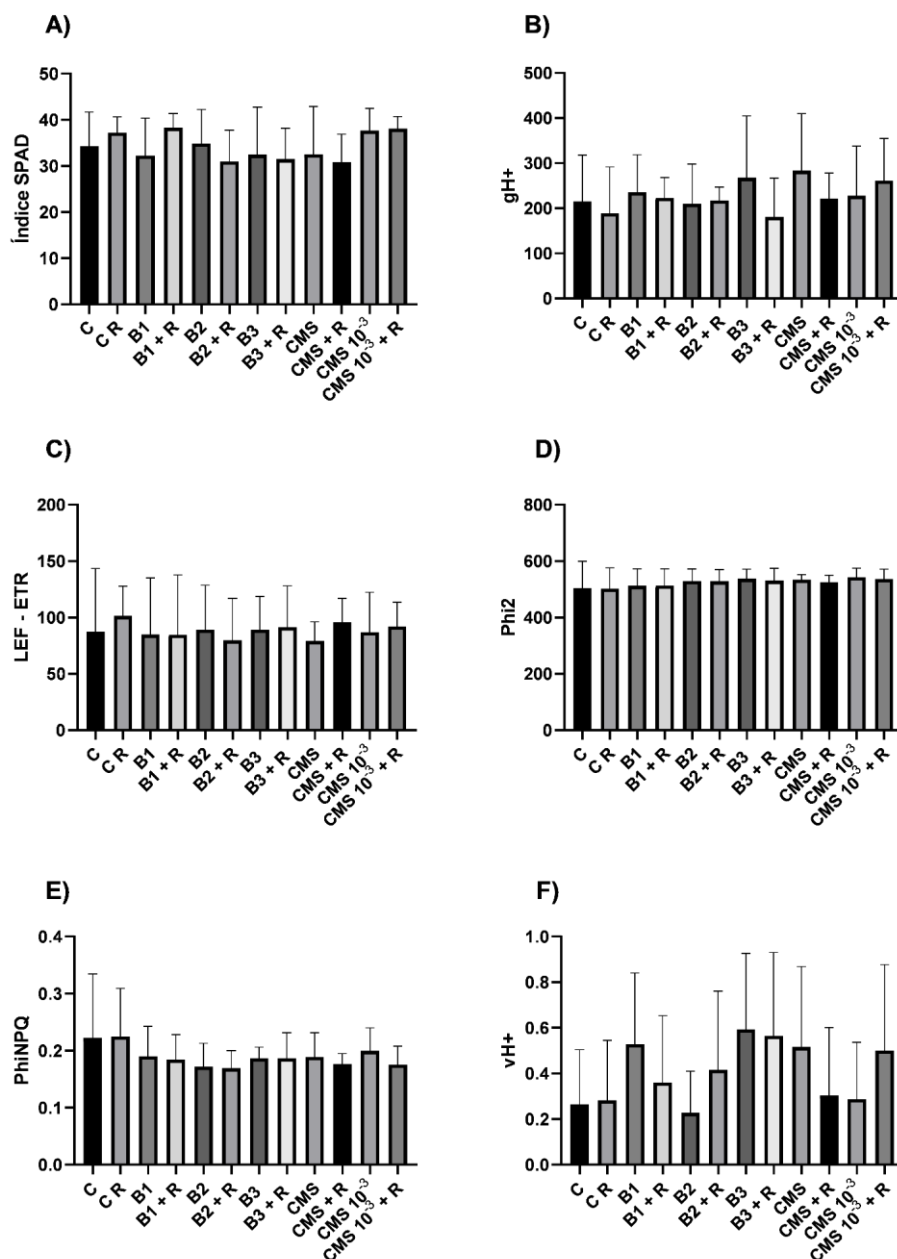


Figura 9: Fotobiologia vegetal aferida com o MultispeQ PhotosynQ. (A) SPAD, (B) gH+, (C) LEF - ETR, (D) Phi2, (E) PhiNPQ e (F) vH+. **C** - Testemunha absoluta; **C + R** - Testemunha + *B. japonicum*; **B1** - *A. brasilense*; **B1 + R** - *A. brasilense* + *B. japonicum*; **B2** - *P. silvatlantica*; **B2 + R** - *P. silvatlantica* + *B. japonicum*; **B3** - *H. seropedicae*; **B3 + R** - *H. seropedicae* + *B. japonicum*; **CMS** - Consórcio Microbiano Sintético; **CMS + R** - Consórcio Microbiano Sintético + *B. japonicum*; **CMS 10⁻³** - Consórcio Microbiano Sintético Diluído; **CMS 10⁻³ + R** - Consórcio Microbiano Sintético Diluído + *B. japonicum*. Teste de médias de Tukey ($p < 0,5$)

Os resultados obtidos indicam que a inoculação das bactérias promoveu o crescimento vegetal, resultando em um aumento da área foliar, volume e comprimento radicular e massa seca, em comparação com as plantas não inoculadas. Isso corrobora com a ideia de que os inoculantes microbianos representam uma alternativa promissora para reduzir a dependência dos fertilizantes químicos (Hungria *et al.*, 2022).

Os dados também destacam as vantagens de se utilizar o CMS. Observamos que o CMS diluído e co-inoculado com *B. japonicum* se destacaram por melhorar o desenvolvimento da soja, incluindo aumento da área foliar, comprimento da parte aérea, volume radicular e massa seca. Em contraste, o CMS concentrado levou à redução do comprimento da parte aérea, volume radicular e massa seca. A alta densidade de bactérias inoculadas no momento da semeadura pode ter reduzido a eficiência dessas bactérias, possivelmente devido à competição por nichos e espaço na planta (Lopes *et al.*, 2021). Estudos demonstram que a formulação de comunidades microbianas sintéticas possui potencial para otimizar o crescimento e a saúde das plantas. Wang *et al.* (2021) avaliaram diferentes formulações de CMS e observaram um crescimento vegetal significativo, aumento na aquisição de N e P, além de um incremento no rendimento da soja. Além disso, essa prática pode promover sinergismo entre os microrganismos presentes na rizosfera (Schwaab, 2019).

A co-inoculação de *B. japonicum* tem demonstrado grande potencial no crescimento e desenvolvimento da soja, incluindo peso seco e volume radicular (Moretti *et al.*, 2019). Verificamos que o CMS diluído co-inoculado com *B. japonicum* apresentou incremento no volume radicular, sendo significativamente superior ao controle e ao CMS diluído sem *B. japonicum*. O desenvolvimento da raiz é de suma importância para o uso de recursos disponíveis no solo (Giehl *et al.*, 2014).

Esses dados destacam a importância de considerar cuidadosamente as estratégias de inoculação bacteriana em sistemas agrícolas, como dosagens e as características do solo (Carvalho, 2009). Portanto, torna-se necessário confirmar os efeitos dos tratamentos nas variáveis analisadas. Isso pode ser

realizado por meio de ajustes nos protocolos, visando obter uma aplicação mais eficiente desses microrganismos na cultura da soja.

5.4 Análise preliminar do efeito de diferentes densidades de inóculo

5.4.1 Germinação *in vitro*

Para avaliar o efeito de doses do inóculo e a taxa média de germinação de sementes de soja BR 7781, foram realizadas três réplicas contendo 10 sementes em placas de Petri, mantidas em câmara BOD. O gráfico (Figura 10) demonstra a média de germinação das sementes ao longo do tempo (24, 48 e 72 horas) para três condições experimentais: controle, tratamento 1 (10^{-1}) e tratamento 2 (10^{-3}).

Inicialmente, observa-se que o grupo controle apresentou uma taxa média de aproximadamente 6 sementes germinadas após 24 horas. Esta taxa aumentou para cerca de 8 sementes em 48 horas, mantendo-se estável até 72 horas, demonstrando uma rápida germinação em condições controladas.

As sementes submetidas ao tratamento 1 (10^{-1}), mostraram uma taxa de germinação de aproximadamente 3 sementes após 24 horas. No entanto, houve um aumento significativo para cerca de 7 sementes em 48 horas, aproximando-se ao grupo controle e permanecendo constante até 72 horas.

As sementes submetidas ao tratamento 2 (10^{-3}), apresentam uma taxa inicial semelhante ao tratamento 1, com aproximadamente 3 sementes após 24 horas. A germinação aumentou de forma constante, atingindo aproximadamente 5 sementes em 48 horas e continuando a germinar até atingir uma média de 7 sementes em 72 horas.

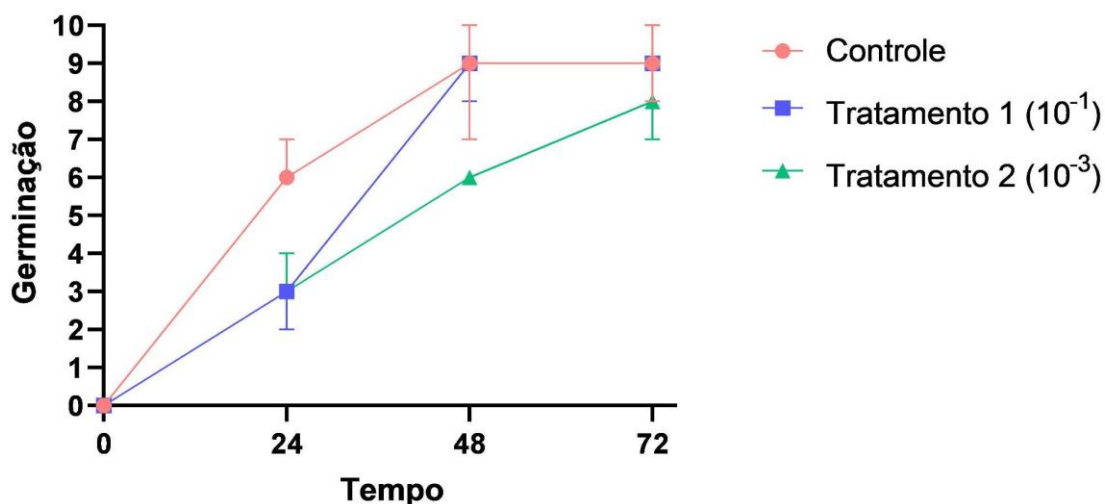


Figura 10: Média de germinação de sementes de soja *in vitro* em diferentes dosagens. C - Controle; T1 - Diluição de 10^{-1} ; T2 - Diluição de 10^{-3}

Estudos anteriores reforçam a eficácia da inoculação de bactérias promotoras de crescimento na germinação e no desenvolvimento inicial das plantas de soja (Pacentchuk, 2020; Meert, 2020). O tratamento 1 é mais eficaz a curto prazo, promovendo uma rápida germinação e atingindo taxas semelhantes ao controle em 48 horas. O tratamento 2 apresenta um aumento mais gradual na taxa de germinação, mas alcança o controle e o tratamento 1 em 72 horas. Essa diferença nas dinâmicas de germinação pode ser atribuída às diferentes interações entre as bactérias inoculadas e as sementes de soja.

Os resultados finais da taxa média de sementes germinadas não mostraram diferenças significativas entre os tratamentos, sugerindo que a presença dessas bactérias não influencia na germinação. Esses resultados são consistentes com o estudo de Cassán et al. (2009), que observaram que a inoculação e co-inoculação de *A. brasilense* e *B. japonicum* não aumentaram a taxa de germinação significativamente em sementes de milho e soja, mas contribuíram para o crescimento inicial das plantas. Isso sugere que, embora as bactérias não influenciem a germinação, elas podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento inicial das plantas. No entanto, a resposta específica das sementes pode variar dependendo das cepas bacterianas utilizadas e dos métodos de aplicação, onde neste caso havia mais de uma

bactéria e com densidades de inóculo diferentes, podendo afetar o ponto inicial de indução de emissão da radícula.

Na figura 11 é possível ver uma diferença do tamanho das raízes e da quantidade de raízes laterais após 72 horas de germinação, sugerindo que as bactérias no tratamento 2 podem ter atuado para emissões de raízes laterais mais rápido do que o controle e o tratamento 1.



Figura 11: Sementes de soja *in vitro* germinadas em diferentes dosagens por 72 horas. **C** - Controle; **T1** - Diluição de 10^{-1} ; **T2** - Diluição de 10^{-3}

5.4.2 Teste em casa de vegetação

A inoculação da comunidade microbiana sintética foi realizada em casa de vegetação em tubetes e com o substrato Carolina Soil®, utilizando sementes de soja BRS 7781. As análises foram realizadas com 7 e 15 dias para o estudo prévio do efeito de diferentes densidades de inóculos, preparados conforme descrito no tópico 4.2. Nestas análises, as letras minúsculas denotam a diferença significativa das médias do mesmo tratamento em relação ao tempo ($p < 0,05$), enquanto as letras maiúsculas referem-se à diferença dos diferentes tratamentos no mesmo tempo de coleta ($p < 0,05$), pelo teste LSD de Fisher a 5% de probabilidade.

Na figura 12, podemos observar a altura da parte aérea (cm^2) das plantas submetidas a diferentes tratamentos aos 7 e 15 dias após a inoculação. Aos 7

dias, as plantas apresentaram uma altura de aproximadamente 6 cm² (bA), não sendo significativamente diferentes entre os tratamentos. No entanto, aos 15 dias, observa-se um aumento significativo na altura da parte aérea para todos os tratamentos. O controle (C) aumentou para aproximadamente 8 cm² (aB), indicando uma resposta natural de crescimento ao longo do tempo. Além disso, as plantas inoculadas (T1 e T2) apresentaram aumentos significativos na altura da parte aérea em relação ao controle, alcançando aproximadamente 9 cm² (aA) cada. Esses resultados e estudos anteriores indicam que a inoculação de bactérias benéficas pode melhorar o crescimento e desenvolvimento das plantas de soja (Prando, 2020). As bactérias podem ter melhorado a disponibilidade de nutrientes ou promovido hormônios de crescimento, resultando em uma maior altura da parte aérea (Naseem, 2014). Isso pode sugerir que a inoculação com o consórcio utilizado nos tratamentos T1 e T2 promoveu um crescimento da parte aérea das plantas, quando comparado ao crescimento natural observado no controle. Além disso, a ausência de diferença significativa entre T1 e T2 sugere que ambos os tratamentos bacterianos podem ter atuado na promoção do crescimento da parte aérea da soja.

A avaliação do comprimento radicular (Figura 12) indicou que aos 7 dias o controle (C), o tratamento 1 (T1) e tratamento 2 (T2) apresentaram um comprimento radicular de aproximadamente de 6 cm² (bA), não sendo significativamente diferentes entre eles. Aos 15 dias, é possível observar um aumento significativo no comprimento radicular em todos os tratamentos. As plantas apresentaram um comprimento de aproximadamente 17 cm² (aA) e ao comparar os diferentes tratamentos, observa-se que não há diferenças significativas entre eles.

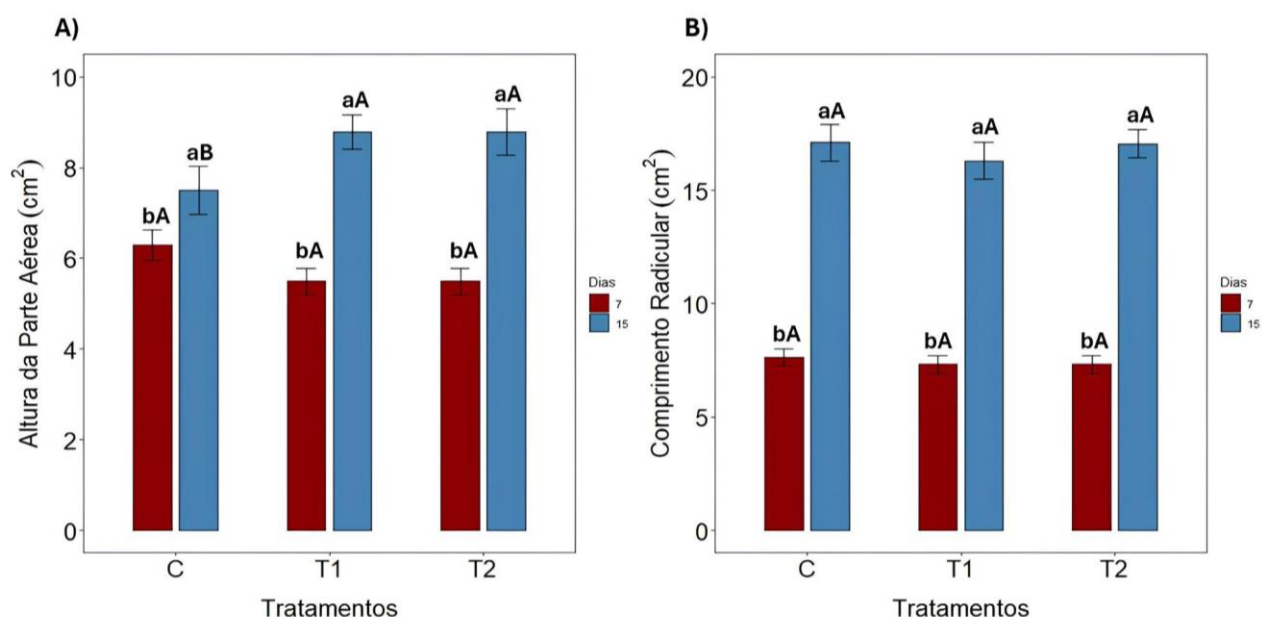


Figura 12: A) Altura da parte aérea (cm²); B) Comprimento radicular (cm²).
C - Controle; **T1** - Diluição de 10^{-1} ; **T2** - Diluição de 10^{-3}

Os gráficos apresentados na figura 13 demonstram a massa fresca total (A), a massa fresca da parte aérea (B) e a massa fresca radicular (C) de plantas de soja com diferentes tratamentos de inoculação bacteriana (C, T1 e T2) aos 7 e 15 dias após a inoculação.

Os dados de massa fresca total (Figura 13A) mostram um aumento significativo de 7 para 15 dias em todos os tratamentos (C, T1, T2). Aos 7 dias, não houve diferenças significativas entre os tratamentos, mas aos 15 dias, T1 e T2 apresentaram uma massa fresca total significativamente maior do que o controle.

A massa fresca da parte aérea (Figura 13B) também aumentou significativamente de 7 para 15 dias em todos os tratamentos. Aos 15 dias, T1 e T2 apresentaram uma massa fresca da parte aérea significativamente maior do que o controle.

De maneira semelhante, a massa fresca radicular (Figura 13C) aumentou significativamente de 7 para 15 dias em todos os tratamentos. Aos 15 dias, T1 e T2 apresentaram uma massa fresca radicular significativamente maior do que o controle.

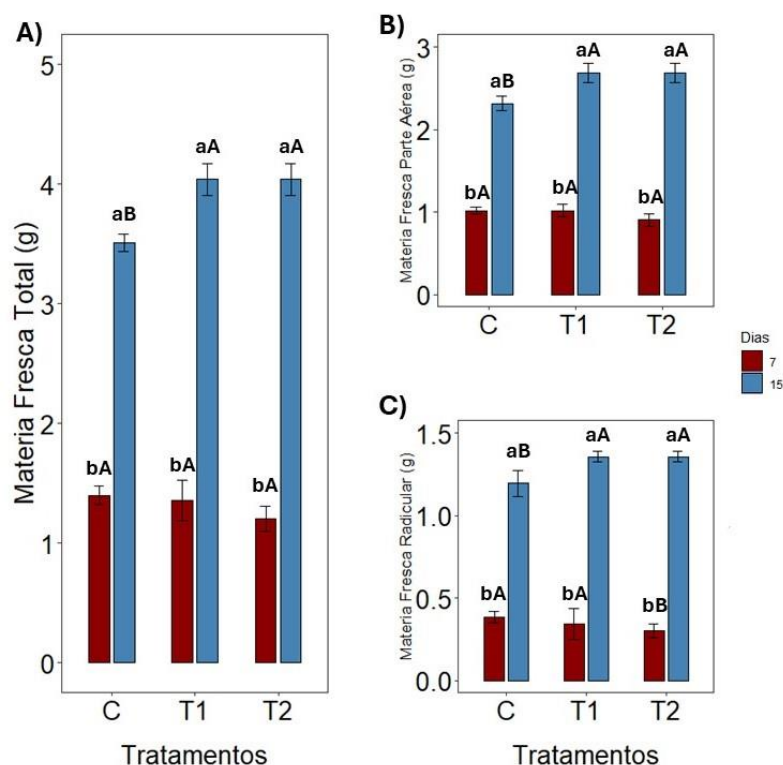


Figura 13: A) Matéria Fresca Total (g); B) Matéria Fresca Parte Aérea (g); C) Matéria Fresca Radicular (g). **C** - Controle; **T1** - Diluição de 10^{-1} ; **T2** - Diluição de 10^{-3}

Os dados de matéria seca total, apresentados na Figura 14A, mostram um aumento significativo de 7 para 15 dias em todos os tratamentos (C, T1, T2). Aos 7 dias, não houve diferenças significativas entre os tratamentos, mas aos 15 dias, T1 e T2 apresentaram uma matéria seca total significativamente maior do que o controle.

A matéria seca da parte aérea (Figura 14B) também aumentou significativamente de 7 para 15 dias em todos os tratamentos. Aos 15 dias, T1 e T2 apresentaram uma matéria seca da parte aérea significativamente maior do que o controle. A matéria seca radicular (Figura 14C) aumentou significativamente de 7 para 15 dias em todos os tratamentos. Aos 15 dias, T1 e T2 apresentaram uma matéria seca radicular significativamente maior do que o controle.

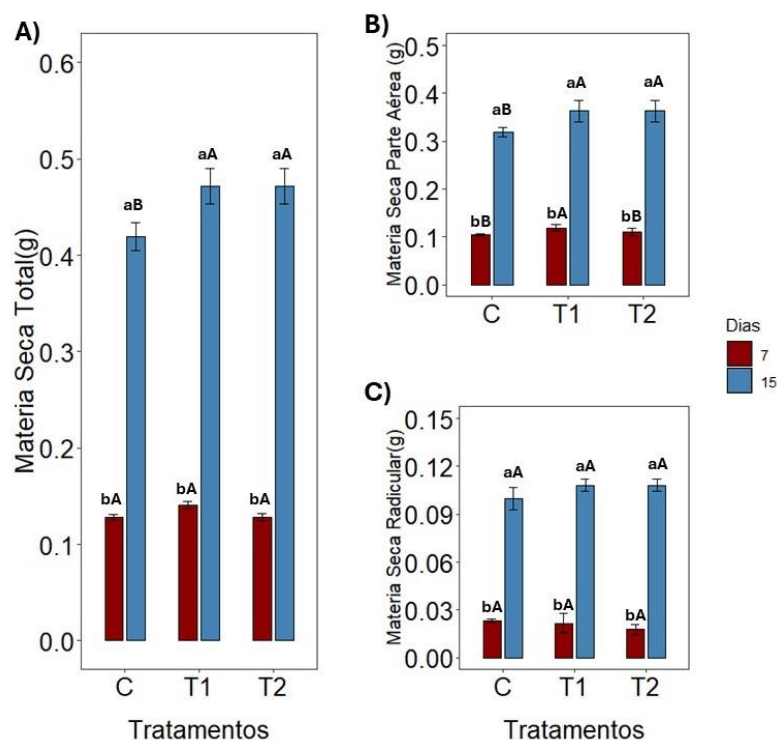


Figura 14: A) Matéria Seca Total (g); B) Matéria Seca Parte Aérea (g); C) Matéria Seca Radicular (g). **C** - Controle; **T1** - Diluição de 10^{-1} ; **T2** - Diluição de 10^{-3}

Na figura 15 é possível observar que o tratamento 2, aos 7 dias, promoveu uma emissão mais rápida e uma maior quantidade de raízes laterais em comparação aos outros tratamentos. Essa resposta radicular pode fornecer uma vantagem competitiva inicial, facilitando um melhor acesso a nutrientes e água, o que pode ser crucial para o crescimento e desenvolvimento inicial da planta (Postma, 2011). No entanto, aos 15 dias, correlacionando com as análises anteriores e como é observado na figura 15, não houve uma diferença significativa entre as inoculações. Isso pode ter ocorrido por limitação de espaço, sugerindo que o efeito da inoculação pode ter se estabilizado com o decorrer do tempo.

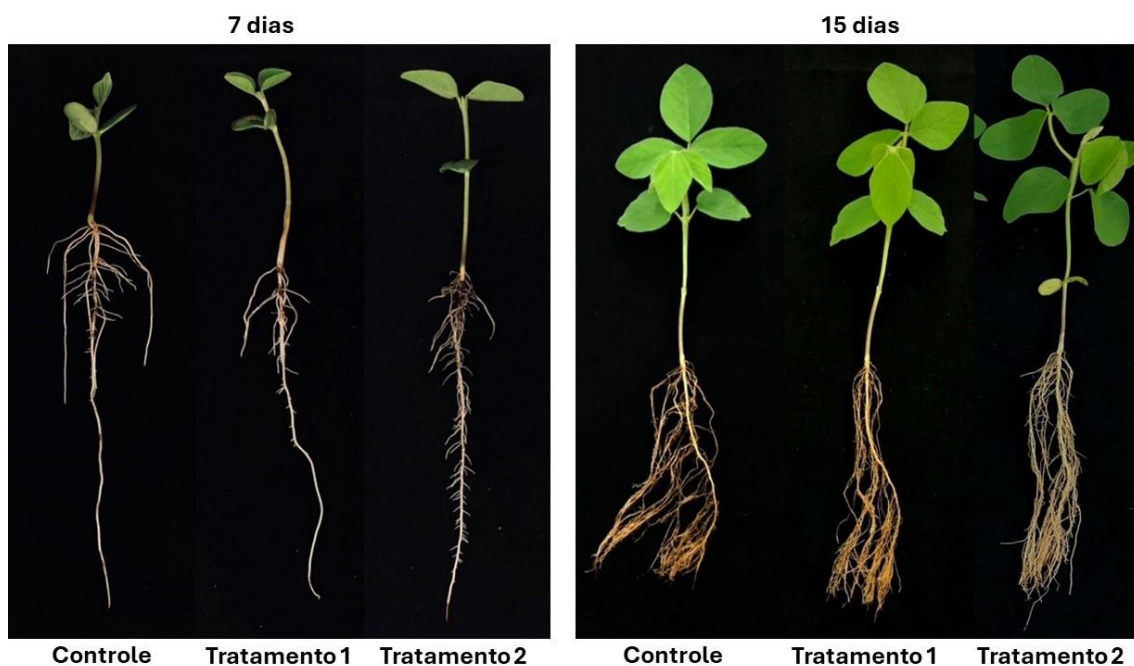


Figura 15: Plantas com 7 dias; Plantas com 15 dias.
C - Controle; T1 - Diluição de 10^{-1} ; T2 - Diluição de 10^{-3}

Estes resultados indicam que a inoculação bacteriana não só aumentou a massa fresca, mas também a matéria seca, reforçando a eficácia dos tratamentos bacterianos na promoção do crescimento e acúmulo de biomassa na soja. Isso é consistente com os estudos que demonstram os efeitos benéficos das bactérias promotoras de crescimento na soja, com o possível aumento na absorção de nutrientes e produção de hormônios vegetais que estimulam o crescimento das plantas (Silva, 2022). Logo, trabalhos semelhantes com inoculações bacterianas e comunidades sintéticas sugerem que as bactérias promotoras de crescimento podem ser utilizadas como uma prática agrícola sustentável para aumentar a produtividade e a sustentabilidade das culturas de importância econômica (Abdallah et al., 2018; Shah, 2024). Além disso, essas comunidades podem ser construídas para se adaptar a diferentes condições ambientais e tipos de solo em comparação com os inoculantes tradicionais, sendo assim, a investigação sobre a eficácia das comunidades microbianas sintéticas, é essencial para o desenvolvimento de práticas agrícolas mais sustentáveis e produtivas (Shayanthan, 2022).

5.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens de MEV das raízes de soja tratadas com diferentes densidades de inóculo, foram obtidas após 7 dias para investigar o padrão de colonização e comportamento das bactérias em três segmentos de regiões anatômicas distintas (coifa, zona de alongamento e zona pilífera). As imagens estão em três linhas correspondentes às condições experimentais e em três colunas representando diferentes regiões da raiz (Figura 16 e Figura 17).

Na figura 16, estão as imagens de microscopia das plantas crescidas no teste de germinação *in vitro* (item 5.4.1). Na raiz do grupo controle, observamos a coifa com uma superfície sem interação microbiana. Na zona de alongamento, com células vegetais organizadas em fileiras longitudinais, não foram apresentados sinais de atividade microbiana. A zona pilífera apresentou pêlos radiculares (root hairs) sem colonização microbiana, indicando pouca interação com os microrganismos nesta região.

A raiz tratada com o tratamento 1, apresentou pouca atividade microbiana em sua coifa. Na zona de alongamento, observou-se um aumento na atividade microbiana, com uma superfície ocupada por estruturas microbianas aderidas em monocamadas, indicando que há interação microbiana. Na zona pilífera, houve uma densa colonização microbiana ao redor dos pêlos radiculares, indicando interação entre os microrganismos e os pêlos radiculares.

A raiz tratada com o tratamento 2, apresentou uma coifa com uma atividade microbiana maior em comparação ao tratamento 1. A superfície da raiz na zona de alongamento mostrou presença visível de estruturas microbianas, sendo mais evidente do que no controle. Em comparação ao tratamento 1, as bactérias estão mais espaçadas na superfície do que em monocamadas. Na zona pilífera, a colonização microbiana foi evidente, sendo mais densa e em mais superfícies do que no tratamento 1 e no controle, indicando uma interação significativa com os pêlos radiculares que pode promover a saúde e o crescimento da planta.

O inóculo do tratamento 1 obteve uma maior densidade de bactéria em sua preparação, obtendo uma diluição de 10^{-1} em relação ao inóculo inicial (Tópico 4.2), o que pode ter gerado um estresse microbiano e na planta uma

maior disputa por nichos, podendo acarretar em uma perda de densidade. O tratamento 2, com uma diluição de 10^{-3} , pode ter aberto a possibilidade de diferentes nichos para as bactérias, promovendo uma oportunidade de maior proliferação.

Os resultados obtidos indicam que os tratamentos com microrganismos promovem uma colonização significativa das raízes de soja, com destaque na zona pilífera. A variação na densidade dos inóculos entre os diferentes tratamentos pode explicar as dinâmicas distintas observadas na germinação.

O controle e o tratamento 1 demonstraram um efeito mais imediato na germinação em comparação com o tratamento 2, este que apresentou uma maior densidade de microrganismos após os 7 dias de inoculação. No entanto, é importante destacar que, apesar da germinação mais lenta do tratamento 2, o crescimento foi próximo entre os tratamentos ao final das 72 horas de germinação, sugerindo que as bactérias podem ter contribuído para esse impulso.

Na figura 17, são apresentadas as imagens de microscopia das plantas de soja cultivadas em casa de vegetação. Na coifa das raízes, tanto nas amostras controle quanto nos tratamentos 1 e 2, não foram observadas interações e colonização microbiana. Na zona de alongamento, o controle e o tratamento 2 não apresentaram bactérias. No entanto, no tratamento 1, foi possível observar algumas aglomerações bacterianas. Na zona pilífera, foi observada a ausência de microrganismos no grupo controle, enquanto nos tratamentos 1 e 2 houve a presença de bactérias. No tratamento 1, as bactérias se encontram aglomeradas e mais próximas aos pêlos radiculares, já no tratamento 2, as bactérias estavam distribuídas em mais regiões ao longo da raiz. Dessa forma, os tratamentos 1 e 2 demonstraram uma maior colonização microbiana na zona pilífera em relação ao controle.

Os resultados obtidos indicam que a colonização microbiana das raízes de soja é mais pronunciada na zona pilífera, especialmente nos tratamentos com inoculação bacteriana. A ausência de microrganismos na coifa e na zona de alongamento pode ser atribuída a fatores fisiológicos e bioquímicos dessas regiões que não favorecem a adesão inicial dos microrganismos, ou até mesmo

a interação com o substrato utilizado. Estudos anteriores demonstram que a zona pilífera é uma região crítica para a interação planta-microrganismo devido à exsudação de compostos orgânicos que atraem e sustentam populações microbianas, a presença de pêlos radiculares fornece uma maior superfície de contato para a adesão microbiana (Sharma, 2023).

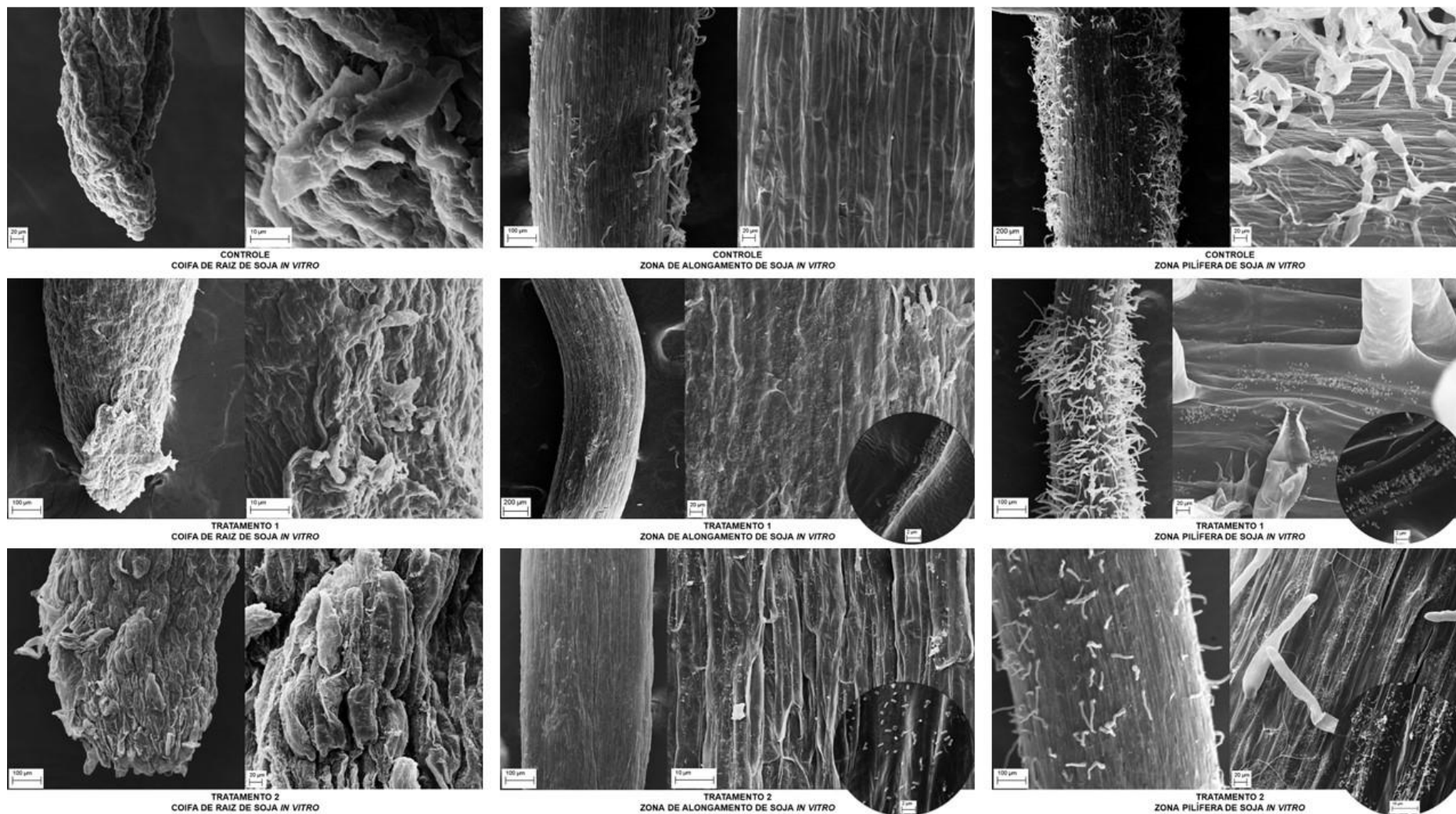


Figura 16: Microscopia Eletrônica de raízes de soja tratadas *in vitro*. **C** - Controle; **T1** - Diluição de 10⁻¹; **T2** - Diluição de 10⁻³

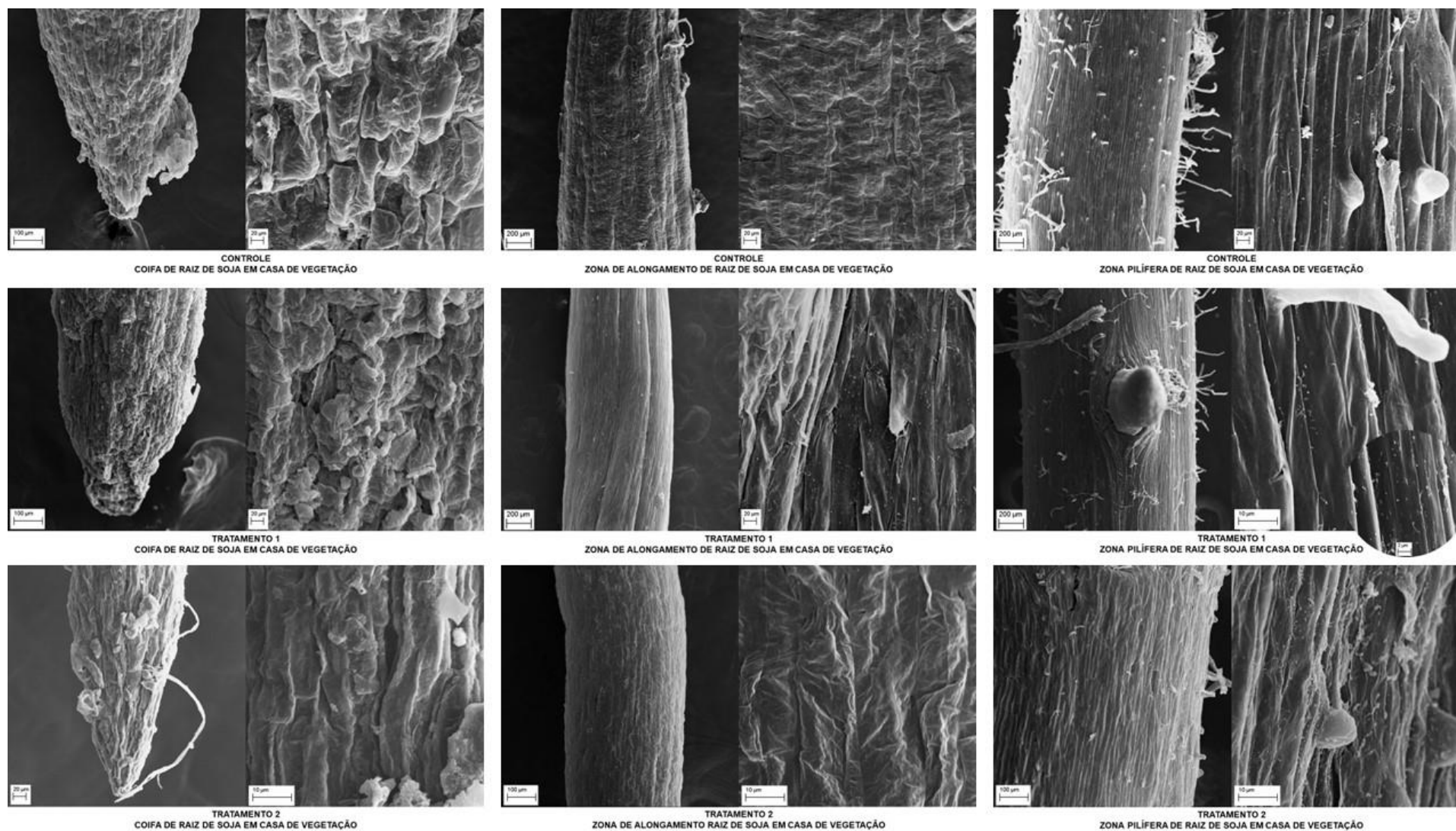


Figura 17: Microscopia Eletrônica de raízes de soja tratadas em casa de vegetação. **C** - Controle; **T1** - Diluição de 10^{-1} ; **T2** - Diluição de 10^{-3}

6. Conclusão

- A cinética de crescimento determinada para o pré-inóculo demonstrou que *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* atingiram a fase *midlog* em aproximadamente 6 horas, *Herbaspirillum seropedicae* em 8 horas e *P. silvatlantica* em 10 horas de cultivo.
- No teste de compatibilidade *in vitro* das bactérias selecionadas, foi observado que entre *A. brasilense*, *H. seropedicae*, *P. silvatlantica* e *B. japonicum* não apresentou zonas de inibição após 24 horas de incubação, indicando que essas culturas podem coexistir com o *B. japonicum* sem antagonismo.
- A inoculação, co-inoculação e o consórcio bacteriano sintético (CMS) mostraram que a testemunha absoluta (C) obteve a menor média de área foliar. Os tratamentos com CMS diluído (CMS 10^{-3} e CMS 10^{-3} + R) foram os mais eficazes, superando os demais. O comprimento da parte aérea foi maior com *H. seropedicae* (B3). A CMS diluída (CMS 10^{-3}) destacou-se em volume e comprimento radicular, matéria fresca e seca. A análise fotobiológica não mostrou diferenças significativas, exceto para o parâmetro vH+, com melhorias nos tratamentos inoculados. O tratamento CMS 10^{-3} e CMS 10^{-3} + R foram os mais eficazes em geral, promovendo crescimento e desenvolvimento significativos das plantas de soja.
- A análise preliminar das densidades de inóculo mostrou que o tratamento 1 (10^{-1}) foi mais rápido na germinação das sementes de soja BRS 7781, enquanto o tratamento 2 (10^{-3}) promoveu desenvolvimento radicular com mais raízes laterais. Ambos tratamentos foram eficazes na promoção do crescimento da parte aérea aos 15 dias. A matéria fresca e seca foi maior nos tratamentos 1 e 2 comparados ao controle. O tratamento 2 destacou-se na resposta radicular aos 7 dias. A microscopia eletrônica de varredura revelou maior colonização na zona pilífera com o tratamento 2 apresentando maior atividade microbiana.

7. Referências bibliográficas

Agência de Notícias do IBGE, 2023. Estimativa de janeiro aponta safra 3,8% menor em 2024, refletindo os problemas climáticos de 2023. Disponível em: Agência de Notícias.

ANPII, 2024. Estatísticas. Disponível em: <https://www.anpii.org.br/estatisticas/>.

Bader, J., Mast-Gerlach, E., Popović, M.K., Bajpai, R., Stahl, U., 2010. Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*, 109(2), 371–387.

Baldani J, Baldani D, Seldin L, Döbereiner J., 1986. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 36(1), 86-93.

Baldani, J.I., Baldani, V.L.D., Döbereiner, J., 1984. Genus *Azospirillum*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1, 275-294.

Baldani, J.I., Reis, V.M., Baldani, V.L.D., Döbereiner, J., 1997. A importância da fixação biológica de nitrogênio associada ao uso de gramíneas forrageiras tropicais. In: *Anais do 2º Simpósio sobre Gramíneas Forrageiras*. Campo Grande, MS: EMBRAPA-CNPGC, 1-10.

Baldani, V.L.D., Baldani, J.I., Döbereiner, J., 2000. Genus *Herbaspirillum*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1, 437-446.

Baldotto, L.E.B., Olivares, F.L., Bressan-Smith, R., 2011. Structural interaction between GFP-labeled diazotrophic endophytic bacterium *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 and pineapple plantlets «Vitória». *Brazilian Journal Microbiology*, 42, 114–125.

Bastián, F., Cohen, A.C., Piccoli, P. N., 1998. Production of indole-3-acetic acid by *Azospirillum brasilense* and its relationship with indole-3-acetyl-L-aspartic acid. *Research in Microbiology*, 149(9), 744-7561.

Brasil, 2023. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Agricultura brasileira em números 2022. Brasília, DF: MAPA. Disponível em: Artigo - A evolução da agricultura do Brasil - Portal Embrapa.

Brasil, 2017. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Fixação Biológica de Nitrogênio. Brasília, Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sustentabilidade/plano-abc/arquivo-publicacoes-plano-abc/fixacao-biologica-do-nitrogenio.pdf/view>>.

Bruxel, M, 2012. Comparação e desenvolvimento de metodologias para identificação molecular das estirpes recomendadas para a produção de inoculantes para a soja, milho e trigo. Dissertação (mestrado) — Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, RS. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/79513>>.

Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., Van Themaat, E.V.L., Schulze-Lefert, P., 2013. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 807-838.

Burkholder, W., 1950. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology*, 40, 115-118.

Canal, 2024. Disponível em: <https://www.canalrural.com.br/agricultura/projeto-soja-brasil/soja-protagonista-setor-de-inoculantes-fatura-r-441-milhoes-em-2023/>

Cardoso, E.J.B.N., Andreote, F.D., 2016. *Microbiologia do Solo*. 2ª ed. Piracicaba/SP: ESALQ, 221p.

Carmo, E.L., Braz, G.B.P., Simon, G.A., Silva, A.G., Rocha, A.G.C., 2018. Desempenho agrônomo da soja cultivada em diferentes épocas e distribuição de plantas. *Revista Ciência Agroveterinária*, 17, 61 – 69.

Carvalho, F.C.Q., da Silva, J.R., de Jesus Carvalho, L.N., Carvalho, R.S., da Paz, C.D., 2009. Métodos de bacterização e promoção de crescimento em melancia com utilização de bactérias. *Revista Brasileira de Agroecologia*.

Cassán, F., Perrig, D., Sgroy, V., Masciarelli, O., Penna, C., Luna, V., 2009. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *European Journal of soil biology*, 45(1), 28-35.

Coenye, T., Vandamme, P., Govan, J.R.W., Lipuma, J.J., 2001. Minireview: taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* Complex. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, 39, 3427-3436.

Compant, S., Clément, C., Sessitsch, A, 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization mechanisms, and prospects for utilization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(4), 967-975.

Cortés-Patiño, S., Vargas, C., Álvarez-Flórez, F., Bonilla, R., Estrada-Bonilla, G., 2021. Potential of Herbaspirillum and Azospirillum consortium to promote growth of perennial ryegrass under water deficit. Microorganisms, 9(1), 91.

Dalmastri, C., Chiarini, L., Cantale, C., Bevivino, A., Tabacchiorini, S., 1999. Soil type and maize cultivar affect the genetic diversity of maize root-associated *Burkholderia cepacia* populations. Microbiology Ecology, 38, 273-284.

Döbereiner, J., 1997. A importância da fixação biológica de nitrogênio para a agricultura sustentável. Biotecnologia Ciência, 1, 2-3.

Döbereiner, J., Baldani, V.L.D., Baldani, J.I., 1996. Genus Azospirillum. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1, pp. 275-294.

Egamberdiyeva, D., 2007. The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. Applied Soil Ecology, 36 (2-3), 184-189.

Embrapa, 2024. Uso de grupos de microrganismos é a nova fronteira em bioinsumos. Disponível em: <Uso de grupos de microrganismos é a nova fronteira em bioinsumos - Portal Embrapa>.

Embrapa, 2016. Agência de Informação Tecnológica. Métodos de inoculação. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/soja/producao/inoculacao-e-inoculante/metodos-de-inoculacao>. Acesso: [18/06/2021].

Embrapa, 2019. Técnicas de inoculação de bactérias aumentam produtividade da soja. Portal Embrapa Notícias. Disponível em: Embrapa - Técnicas de inoculação de bactérias.

Embrapa, 2016. Visão de futuro do agro brasileiro. Disponível em: Visão de Futuro - Portal Embrapa.

Embrapa, 2015. Rizóbio: a bactéria do bem. Disponível em:<<https://www.embrapa.br/contando-ciencia/solos>>.

Estrada, B., Mavingui, P., Cournoyer, B., Fontaine, F., Balandreau, J., 2013. Endophytic colonization of rice (*Oryza sativa* L.) by the diazotroph *Azoarcus* sp. strain BH72. Applied and Environmental Microbiology, 79(8), 2638-26462.

Ferreira, A.L., Duarte, H.M., Zandonadi, D.B., Santos, M.P., 2023. Manual Simplificado de Uso do Fluorímetro MultispeQ V 2.0 (PhotosynQ). 1ª ed. Nupem Editora.

- Florencio, C., Bortoletto-Santos, R., Favaro, C.P., Brondi, M.G., Velloso, C.C., Klaic, R., Ribeiro, C., Farinas, C.S., Mattoso, L.H.C., 2022. Avanços na produção e formulação de inoculantes microbianos visando uma agricultura mais sustentável. *Química Nova*, 45(9), 1133–1145.
- Giehl, R.F., Gruber, B.D., von Wirén, N., 2014. It's time to make changes: modulation of root system architecture by nutrient signals. *Journal of Experimental Botany*, 65(3), 769-778.
- Gommers, C.M., Visser, E.J., St Onge, K.R., Voesenek, L.A., Pierik, R., 2013. Shade tolerance: when growing tall is not an option. *Trends in plant science* 18(2), 65-71.
- Gupta, G., Ndiaye, A., Filteau, M., 2021. Leveraging experimental strategies to capture different dimensions of microbial interactions. *Frontiers in Microbiology*, 12, 700752.
- Gutiérrez, M.F., 2019. Draft genome sequence of *Paraburkholderia tropica* Ppe8 strain, a sugarcane endophytic diazotrophic bacterium. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(2), 335–338.
- Hennecke, H., 1990. Nitrogen fixation genes involved in the *Bradyrhizobium japonicum*-soybean symbiosis. *FEBS letters*, 268(2), 422-426.
- Hiltbold, A.E., Thurlow, D.L., Skipper, H.D., 1980 Evaluation of Commercial Soybean Inoculants by Various Techniques 1. *Agronomy Journal*, 72(4), 675-681.
- Hungria, M., Nogueira, M.A., 2017. Coinoculação da soja com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*: uma tecnologia ambientalmente sustentável e economicamente bem sucedida. *Resumos expandidos da XXXVI - Reunião de Pesquisa de Soja*.
- Hungria, M., Nogueira, M.A., 2022. Fixação biológica do nitrogênio. In: Meyer, M.C., Bueno, A.F., Mazaro, S.M., Silva, J.C. (Org.). *Bioinsumos na cultura da soja*. 1 ed. Brasília, DF: Embrapa (1), 143-162.
- Hungria, M., Rubens, J.C., Nogueira, M.A., 2012. A pesquisa em Fixação Biológica do Nitrogênio na Embrapa Soja: passado, presente e perspectivas futuras. *Anais. XVI Relare. Londrina-PR*.
- Hungria, M.. 2007. A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro/ Mariangela Hungria, Rubens José Campo, Iêda Carvalho Mendes. – Londrina: Embrapa Soja: Embrapa Cerrados.

Hungria, M., Campo, R.J., Mendes, I.D.C., 2001. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. Londrina: Embrapa Soja, 48p. – Circular técnica/Embrapa Soja, ISSN 1516-7860, n.35 e Embrapa Cerrados, ISSN 1517-0187; n.13.

James, E.K., Olivares, F. L., 1998. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 17(1), 77-1191.

Jordan, D.C., 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 32(1), 136-139.

Kaur, C., Selvakumar, G., Ganeshamurthy, A.N., 2017. Burkholderia to Paraburkholderia: The Journey of a Plant-Beneficial-Environmental Bacterium. In: Shukla P (ed) Recent advances in applied microbiology. Springer, Singapore, 213–2282.

Korber, L.P.P., Korber, A.H.C., Grange, L., Klahold, C.A., 2021. Eficiência de produtos biológicos na coinoculação de sementes de soja. *South American Sciences*, 2(2), e21109.

Kramer, D.M., Evans, J.R., 2011. The importance of energy balance in improving photosynthetic productivity. *Annual Review of Plant Biology*, 62, 207-230.

Kuhlgert, S., Austic, G., Zegarac, R., Osei-Bonsu, I., Hoh, D., Chilvers, M.I., Roth, M.G., Bi, K., Avast, D.T., Weebaddee, P., Kramer, D. M., 2016. MultispeQ Beta: a tool for large-scale plant phenotyping connected to the open PhotosynQ network. *Royal Society open science*, 3, 160592.

Latef, A.A.H.A., Hashem, A., Abd_Allah, E.F., Alqarawi, A.A., Egamberdieva, D., 2020. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and abiotic stress in plants: A review. *Journal of Plant Growth Regulation*, 39(3), 679-700.

Lin, S. Y., Hameed, A., Shen, F.T., Liu, Y.C., Hsu, Y.H., Shahina, M., Lai, W., Young, C.C., 2015. Description of *Niveispirillum fermenti* gen. nov., sp. nov., isolated from a fermentor in Taiwan, transfer of *Azospirillum irakense* (1989) as *Niveispirillum irakense* comb. nov., and reclassification of *Azospirillum amazonense* (1983) as *Nitrospirillum amazonense* gen. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 105, 1149-1162.

Lopes, M.J.S., Dias-Filho, M.B., Gurgel, E.S.C., 2021. Successful plant growth-promoting microbes: inoculation methods and abiotic factors. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 105, 1149-1162.

Marcon, J., 2007. Efeito de cana-de-açúcar geneticamente modificada sobre comunidades bacterianas. Doutor em Biotecnologia - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo.

Cano, B.M., Zarazúa, G.M.S., 2018. Aplicación de consorcios microbianos en la agricultura. *Perspectivas de la Ciencia y la Tecnología*, 1(2), 54–61. Disponível em: <https://revistas.uaq.mx/index.php/perspectivas/article/view/178>.

Mascarenhas, G., 2024. Consórcios microbianos aumentam produtividade e sustentabilidade na agricultura. *Revista Cultivar*. Disponível em: <https://revistacultivar.com.br/noticias/consorcios-microbianos-aumentam-produtividade-e-sustentabilidade-na-agricultura>.

Medici, I.F., Bartrolí, L., Guaimas, F., Fulgenzi, F.R., Molina, C.L., Sánchez, I.E., Comerci, D.J., Mongiardini, E., Soler-Bistué, A., 2024. The distinct cell physiology of *Bradyrhizobium* at the population and cellular level. *BMC Microbiology*, 24, 129.

Meert, L., Muller, M.M.L., Genú, A.M., Espindola, J.S., Aragão, G.N., Figueiredo, A.S.T., 2020. Diferentes inoculantes, formas de inoculação e seus efeitos nas características agronômicas da cultura da soja. *Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento*, 9(10), e2969108499. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/8499>.

Miransari, M., 2013. Use of microbes for the alleviation of soil stresses, nutrient uptake and yield enhancement in plants. In: *Microbes for Legume Improvement*. Springer, Dordrecht, 287-308.

Driever, S.M., Baker, N.R., 2011. The water-water cycle in leaves is not a major alternative electron sink for dissipation of excess excitation energy when CO₂ assimilation is restricted. *Plant, Cell & Environment*, 34(5):837–846.

Moreira, F.M.S., Silva, K., Nóbrega, R.S.A., Carvalho, F., 2010. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. *Comunicata Scientiae*, 1 (2), 74-99.

Moretti, L.G., Crusciol, C.A., Kuramae, E.E., Bossolani, J.W., Moreira, A., Costa, N.R., Alves, C.J., Pascoaloto, I.M., Rondina, A.B., Hungria, M., 2020. Effects of growth-promoting bacteria on soybean root activity, plant development, and yield. *Agronomy Journal*, 112(1), 418-428.

- Munhoz, A.T., 2016. Técnicas de inoculação com bactérias de fixação de nitrogênio na cultura da soja. 49 p. TCC (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina. Campus Curitibanos, SC. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/165898?show=full>>.
- Naseem, H., Bano, A., 2014. Role of plant growth-promoting rhizobacteria and their exopolysaccharide in drought tolerance of maize. *Journal of Plant Interactions*, 9(1), 689-701.
- Olivares, F.L., Baldani, V.L.D., Reis, V.M., Baldani, J.I., Döbereiner, J., 1997. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. *Biology and Fertility of Soils*, 24(3), 139-143.
- Olivares, F.L., Baldani, V.L.D., Reis, V.M., Baldani, J.I., Döbereiner, J., 1996. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of Gramineae. *Biology and Fertility of Soils*, 21, 197–200.
- Oliveira, A.L.M., Santos, J.M., Silva, F.S.B., 2017. Biofertilizantes: oportunidade de acelerar o agronegócio sustentável. Sebrae
- Oliveira, A.M., Costa, M.R., Graziotti, P.H., Abreu, C.M., Bispo, N.S., Roa, J.P. B., Silva, D.M., Miranda, J.M.M., 2022. Brazilian scenario of inoculant production: A look at patents. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 46, e0210081.
- Pacientchuk, F., Gomes, J.M., Lima, V.A., Mendes, M.C., Sandini, I.E., Jadoski, S.O., 2020. Efeito da co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal na cultura da soja. *Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento*, 9(12), e39291211360.
- Pereira, D.G.C., Santana, I.A., Megda, M.M., Megda, M.X.V., 2019. Potassium chloride: impacts on soil microbial activity and nitrogen mineralization. *Ciência Rural*, 49(5), e20180556.
- Perin, L., 2006. O gênero *Burkholderia*; um importante componente da comunidade microbiana / Jean Luiz Simões-Araújo, Verônica Massena Reis. Seropédica: Embrapa Agrobiologia.
- Postma, J.A., Lynch, J.P., 2011. Root cortical aerenchyma enhances the growth of maize on soils with suboptimal availability of nitrogen, phosphorus, and potassium. *Plant Physiology*, 156(3), 1190-1201.
- Prando, A.M., Oliveira, A.B., Lima, D., Possamai, E.J., Reis, E.A., Nogueira, M.A., Hungria, M., Conte, O., 2020. Coinoculação da soja 166 com

Bradyrhizobium Azospirillum 2019/2020 no Paraná. Circular Técnica 166, Embrapa Soja.

Pratama, A.A., Jiménez, D.J., Chen, Q., Bunk, B., Spröer, C., Overmann, J., van Elsas, J.D., 2020. Delineation of a Subgroup of the Genus *Paraburkholderia*, Including *P. terrae* DSM 17804T, *P. hospita* DSM 17164T, and Four Soil-Isolated Fungiphiles, Reveals Remarkable Genomic and Ecological Features—Proposal for the Definition of a *P. hospita* Species Cluster. *Genome Biology and Evolution*, 12(4), 325–344.

Rodrigues, P.S.L., 2016. Caracterização molecular e de promoção de crescimento de plantas por bactérias diazotróficas associadas a frutíferas tropicais - Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes, RJ.

Rossetto, P.B., 2008. Interações entre cana-de-açúcar e bactérias associadas. 148 f. Tese de Doutorado - Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Santos, A.C.F., Leão, P.A.R., Lima, R.P., 2024. A importância da inoculação da semente na cultura da soja. *Revista Multidisciplinar do Nordeste Mineiro*, 4(1). Disponível em: *Revista Multidisciplinar do Nordeste Mineiro*. Acesso em: 10 jul.

Santos, M. S.; Nogueira, M. A.; Hungria, M.; 2019. Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. *Embrapa Soja (CNPSO)*.

Schmidt, E.R., Oliveira, V.S., Dousseau-Arantes, S., 2023. Modelagem da área foliar individual (1ª ed.). São José dos Pinhais, PR: Brazilian Journal Editora.

Schwaab, E.F., Aguiar, C.G., 2019. Interação de inoculantes nitrogenados com *Bacillus megaterium* e *Bacillus subtilis* em soja. *Revista Cultivando o Saber*. V edição especial, 24-32.

Selegato, D.M., Castro-Gamboa, I., 2023. Enhancing chemical and biological diversity by co-cultivation. *Frontiers in microbiology*, 14, 1117559.

Shah, T., Khan, Z., Asad, M., D’amato, R., Alsahli, A.A., Ahmad, P., 2024. Synthetic bacterial community derived from *Astragalus mongholicus* and plant-plant interactions inhibit cadmium uptake by modulating gene expression, antioxidant system and carbohydrate metabolism under cadmium contaminated soil. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 12(1), 111619.

Sharma, I., Kashyap, S., Agarwala, N., 2023. Biotic stress-induced changes in root exudation confer plant stress tolerance by altering rhizospheric microbial community. *Frontiers in plant science*, 14, 1132824.

Shayanthan, A., Ordoñez, P.A.C., Oresnik, I.J., 2022. The role of synthetic microbial communities (SynCom) in sustainable agriculture. *Frontiers in Agronomy*, 4, 896307.

Stacey, G., Sanjuan, J., Luka, S., Dockendorff, T., Carlson, R.W., 1995. Signal exchange in the *Bradyrhizobium*-soybean symbiosis. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(4-5), 473-483.

Steiner, F., da Silva Oliveira, C.E., Zoz, T., Zuffo, A.M., de Freitas, R.S., 2020. Co-Inoculation of common bean with *Rhizobium* and *Azospirillum* enhance the drought tolerance. *Russian Journal of Plant Physiology*, 67, 923-932.

Tarrand, J.J., Krieg, N.R., Döbereiner, J., 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov., and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Canadian Journal of Microbiology*, 24, 967-980

Teixeira, K.R.S., 1997. Bases moleculares e genética da fixação de nitrogênio. Seropédica: Embrapa-CNPAB, 26p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 32).

Tao, J., Wang, S., Liao, T., Luo, H., 2021. Evolutionary origin and ecological implication of a unique *nif* island in free-living *Bradyrhizobium* lineages. *The ISME Journal*, 15(11), 3195-3206.

Vargas, M.A.T., HUNGRIA, M., 1997. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. In: VARGAS, M.A.T. & HUNGRIA, M., eds. *Biologia dos solos dos cerrados*. Planaltina, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, p.297-360.

Wang, C., Li, Y., Li, M., Zhang, K., Ma, W., Zheng, L., Xu, H., Cui, B., Liu, R., Yang, Y., Zhong, Y., Liao, H., 2021. Functional assembly of root-associated microbial consortia improves nutrient efficiency and yield in soybean. *Journal of Integrative Plant Biology*, 63(6), 1021-1035.

Widder, S., Allen, R.J., Pfeiffer, T., Curtis, T.P., Wiuf, C., Sloan, W.T., ... Picioreanu, C., 2016.. Challenges in microbial ecology: building predictive understanding of community function and dynamics. *The ISME Journal*, 10(11), 2557-2568.

Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., 1992. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species

Burkholderia cepacia (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. Microbiology and Immunology, 36(12), 1251–1275.

Zhang, N., Jin, C.Z., Zhuo, Y., Li, T., Jin, F.J., Lee H.G., Jin, L., 2023. Genetic diversity into a novel free-living species of *Bradyrhizobium* from contaminated freshwater sediment. Frontiers in Microbiology, 14, 1295854.